

СПІВЗАСНОВНИКИ

Національна академія медичних наук України •
Державна установа «Інститут фармакології та токсикології
Національної академії медичних наук України» •
Державне підприємство «Державний експертний центр
Міністерства охорони здоров'я України» •
Всеукраїнська громадська організація «Асоціація фармакологів України»

ФАРМАКОЛОГІЯ ТА ЛІКАРСЬКА ТОКСИКОЛОГІЯ PHARMACOLOGY AND DRUG TOXICOLOGY

Науково-практичне видання

Журнал заснований у серпні 2007 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

ISSN 2227-7943 (Print)

ISSN 2524-2563 (Online)

Том 13, № 6/2019

Volume 13, № 6, 2019

<https://doi.org/10.33250/13.06>

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ

Т. А. Бухтіарова (головний редактор)
Г. С. Григор'єва (заст. головного редактора)
А. І. Соловійов (заст. головного редактора,
науковий редактор)

Н. В. Літвінова (науковий редактор)
С. О. Мисливець (відповідальний секретар)

П. Б. Антоненко
(*м. Одеса*)

І. Ф. Беленічев
(*м. Запоріжжя*)

Л. С. Бобкова
(*м. Київ*)

Л. Б. Бондаренко
(*м. Київ*)

Н. І. Волощук
(*м. Вінниця*)

В. В. Годован
(*м. Одеса*)

А. М. Демченко
(*м. Київ*)

Т. О. Дев'яткіна
(*м. Полтава*)

Т. І. Єрмоленко
(*м. Київ*)

В. І. Жилюк
(*м. Дніпро*)

Г. В. Зайченко
(*м. Київ*)

І. І. Заморський
(*м. Чернівці*)

В. М. Коваленко
(*м. Київ*)

Л. І. Ковтун
(*м. Київ*)

М. І. Козлов
(*м. Київ*)

О. П. Колядич
(*м. Київ*)

О. М. Олещук
(*м. Тернопіль*)

С. В. Павлов
(*м. Запоріжжя*)

Н. М. Серединська
(*м. Київ*)

С. С. Таніна
(*м. Київ*)

С. М. Тишкін
(*м. Київ*)

О. О. Хавич
(*м. Київ*)

Г. М. Шаяхметова
(*м. Київ*)

Л. М. Шеремета
(*м. Івано-Франківськ*)

С. Ю. Штриголь
(*м. Харків*)

О. Є. Ядловський
(*м. Київ*)

РЕДАКЦІЙНА РАДА

М. Я. Головенко
(*м. Одеса*)

Алан Калуєв
(*м. Новий Орлеан,
Луїзіана, США*)

С. В. Кириченко
(*м. Кембридж,
Массачусетс, США*)

І. В. Кізуб
(*м. Аврора, Колорадо,
США*)

В. Й. Кресюн
(*м. Одеса*)

І. Г. Купновицька
(*м. Івано-Франківськ*)

В. Д. Лук'янчук
(*м. Київ*)

В. Й. Мамчур
(*м. Дніпро*)

М. А. Мохорт
(*м. Київ*)

С. Б. Парій
(*м. Кишинів, Молдова*)

Б. Петерлін
(*м. Любляна, Словенія*)

Д. Петровіч
(*м. Любляна, Словенія*)

К. А. Посохова
(*м. Тернопіль*)

Н. І. Шарикіна
(*м. Київ*)

Журнал зареєстрований Державною реєстраційною службою України
Свідоцтво про державну реєстрацію друкованого засобу масової інформації
Серія КВ № 19717-9517ПР від 25.02.2013

Журнал зареєстрований у серпні 2007 року (свідоцтво Серія КВ № 13093-1977Р від 23.08.2007 Міністерства юстиції України)

Журнал включено до Переліку наукових фахових видань України (біологічні, медичні, фармацевтичні науки)
Наказ Міністерства освіти і науки України від 04.07.2014 р. № 793

Журнал № 6 (67)/2019 рекомендований до друку вченою радою ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» (протокол від 17.12.2019 р. № 8)

Видавець ТОВ "Видавничий дім «Авіцена» – Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи до Державного реєстру видавців, виготовників і розповсюджувачів видавничої продукції ДК № 2726 від 18.12.06.

Формат 70×108 1/16. Папір офсетний № 1. Ум. друк. арк. 6,65. Наклад 200 прим. Зам. № 67

Адреса редакції: ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Антона Цедка, 03057, м. Київ.
Тел.: + 38 0 44 456-42-56, 456-40-22. Електронна пошта: ift.regedit@gmail.com

ЗМІСТ

ОГЛЯДИ

Вринчану Н. О., Дудікова Д. М., Гринчук Н. І., Недашківська В. В. Біоплівки.
Сучасний стан та перспективи антимікробної терапії.....311

У НАУКОВИХ ЛАБОРАТОРІЯХ

Бондаренко Л. Б., Карацуба Т. А., Хавич О. О., Шаяхметова Г. М.,
Шарикіна Н. І., Коваленко В. М., Стратійчук Р. О., Коновалов А. А.,
Калачінська М. М. Вплив Іфітинібу на складові хроматину та стан
антиоксидантної системи в карциномі Герена та незмінених тканинах матки..... 322

Demchenko S. A., Fedchenkova Yu. A., Bukhtiarova T. A., Bobkova L. S.,
Sukhoveev V. V., Demchenko A. M. Synthesis and anticancer activity of
1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-
diazacyclopenta[cd]azulene-2-carboxylic acid arylamides against PC-3 prostate
cancer cells..... 331

Капелька І. Г., Штриголь С. Ю. Скринінгове дослідження фригопротекторних
властивостей нестероїдних протизапальних препаратів за гострого загального
охолодження..... 338

Novodvorskyi Y. N., Bahlai O. Y., Komarov I. V., Demchenko A. M. Synthesis and
antioxidant activity of derivatives of 8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-ones 344

Темірова О. А., Хайтович М. В., Бурлака А. П., Вовк А. В. Модифікуючий
вплив N-ацетилцистеїну, мелатоніну та їхнього поєднання на стан електронно-
транспортного ланцюга мітохондрій та антиоксидантної системи в головному
мозку щурів за експериментального цукрового діабету 1 типу..... 353

КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ

Маркова С. О., Ващенко Л. К., Пісоченко К. В., Зацаринська О. І., Прийма Т. В.,
Чижавко О. Ю., Войтенко Г. М., Курділь Н. В. Клінічний випадок успішного
лікування токсичного гепатиту, зумовленого гострим отруєнням парацетамолом..... 363

ІНФОРМАЦІЯ ДЛЯ ДОСЛІДНИКІВ

Непролиферативные и пролиферативные поражения женской
репродуктивной системы крыс и мышей..... 367

ОСОБИСТОСТІ

Пам'яті члена-кореспондента НАН і НАМН України, професора,
доктора медичних наук Івана Сергійовича Чекмана..... 375

СОДЕРЖАНИЕ..... 379

CONTENT..... 380

Н. О. Вринчану, Д. М. Дудікова, Н. І. Гринчук, В. В. Недашківська

Біоплівки. Сучасний стан та перспективи антимікробної терапії

Державна установа «Інститут фармакології та токсикології
Національної академії медичних наук України», м. Київ

Ключові слова: біоплівки,
антибіотикорезистентність,
Quorum sensing, персистери

Одне з величних досягнень ХХ століття – упровадження в клінічну практику антибіотиків та антимікробних препаратів. Застосування пеніциліну та інших антибіотиків у десятки разів зменшило летальність як від особливо небезпечних захворювань (чума, дифтерія, тиф), так і від таких розповсюджених тяжких інфекційних хвороб, як пневмонія, ендокардит, менінгіт, туберкульоз, сепсис, сприяло зниженню захворюваності на гонорею, сифіліс тощо.

У ХХ столітті в клінічну практику впроваджено значну кількість антимікробних препаратів (АМП), а за відкриття та розробки, пов'язані з інфекційною патологією, отримано 23 Нобелівські премії. Значні досягнення в антиінфекційній терапії стали підґрунтям для вислову: «Настав час закрити книгу інфекційних хвороб і перевести національні ресурси на боротьбу з онкологічними захворюваннями та хворобами серця» (В. Стюарт, 1967 р.) [1]. Проте практично одночасно з використанням антибіотиків були виявлені стійкі до їхньої дії штами збудників [2]. Так, резистентні до пеніциліну штами стафілококу були виявлені вже через 2 роки після впровадження в клінічну практику (1943 р.), до дії даптоміцину та цефтароліну – через рік (2004 і 2010 р. відповідно). Згідно з даними GLASS (Глобальна система нагляду за стійкістю до антимікробних препаратів), опублікованими в 2017 році, щорічно антибіотикорезистентні штами зумовлюють гнійно-запальні процеси в 500 тис. осіб [3], а витрати

на лікування пацієнтів у країнах ЄС сягають 7 млрд євро, у США – 6,5 млрд доларів США [4–6]. За прогнозами аналітиків, до 2050 року смертність від інфекційних хвороб у Європі може скласти 400 тис. осіб, в Азії – близько 5 млн осіб щорічно [7].

Причиною виникнення стійкості збудників до АМП є не лише їхнє нерациональне використання, але й обмаль даних щодо особливостей життєвого циклу мікроорганізмів, їхніх структурних і фізіологічних особливостей, соціальної поведінки, здатності до контактного та дистанційного спілкування, взаємозв'язків з макроорганізмом.

Упродовж тривалого часу мікроорганізми сприймалися як планктонні одноклітинні без'ядерні організми, які розмножуються поділом клітин. Саме з урахуванням такої форми існування мікроорганізмів були встановлені механізми дії антибактеріальних препаратів, схеми та режими їхнього застосування. Сучасна лабораторна техніка та методи дослідження дозволили розширити уявлення про структуру та фізіологічні особливості мікроорганізмів. Виявлено, зокрема, наявність фізичного контакту між мікроорганізмами, що забезпечує горизонтальний перенос генетичної інформації, у тому числі генів резистентності, та хімічної комунікації – основи соціальної поведінки бактерій і грибів у мікробних спільнотах [8].

Мета дослідження – узагальнити дані щодо структури бактеріальних біоплівок, механізмів їхньої стійкості до антимікробних засобів та пошуку нових активних речовин з антибіоплівковою активністю.

Структура та властивості біоплівки. Біоплівки (агрегати, скупчення) – структурована спільнота клітин бактерій

і грибів, оточених полімерних матриксом, прикріпленням до поверхні. Основними складовими матриксу біоплівки є: вода (до 97 %), клітини мікроорганізмів (до 5 %), полісахариди, білки та нуклеїнові кислоти (до 2 % кожного компоненту) [9]. Цикл розвитку біоплівки складається з декількох етапів: адгезії планктонних клітин до поверхні, формування моношару та дозрівання біоплівки з утворенням усіх її структур. Завершується розвиток біоплівки розривом матриксу та дисемінацією планктонних клітин з наступною колонізацією ними нових поверхонь.

Бактерії в біоплівках набувають особливої форми антибіотикорезистентності, що проявляється в підвищеній стійкості до антимікробних агентів, дезінфектантів та імунного захисту макроорганізму. Мікроорганізми виживають за концентрацій перекису водню або молочної кислоти в 4–8 разів більших, ніж необхідно для пригнічення росту окремих бактерій поза плівкою, а також у присутності антибіотиків у 500–1000 разів вищих дозах, ніж їхні мінімальні інгібуючі концентрації відносно планктонних клітин [10]. Крім відомих механізмів стійкості мікроорганізмів до антибактеріальних засобів (модифікація структури мішені, інактивація антибіотика ферментами, гіперактивність ефлюксних помп, зниження проникності клітинної мембрани) біоплівці притаманні специфічні механізми захисту, зокрема: 1) низька проникність матриксу, 2) активація системи *Quorum sensing* (QS) та 3) утворення клітин-персистерів зі сповільненим метаболізмом.

Матрикс біоплівок. Матрикс біоплівки є позаклітинною полімерною субстанцією, сформованою полісахаридами, білками, ліпідами та нуклеїновими кислотами [9]. Складові матриксу забезпечують стабільність об'ємної структури біоплівок, регулюють їхню здатність прикріплюватися до поверхні, визначають обмін поживних речовин, рідин і газів, молекул і клітин між навколишнім середовищем і біоплівкою. Транспортні властивості матриксу обумовлені фізико-хімічними

властивостями його компонентів, а також будовою каналів. Унаслідок стержневих перешкод або можливої взаємодії антимікробних речовин з компонентами матриксу (сорбція до матриксу, інактивація антибіотика) проникність останнього знижується, терапевтичні (ефективні) концентрації антимікробних речовин всередині біоплівки не досягаються [11].

Система *Quorum sensing*. Процес формування біоплівки регулюється складними механізмами міжклітинної комунікації *Quorum sensing* (QS), яка вперше описана К. Н. Nealson (1970 р.) як система регуляції біоломінесценції в морської бактерії *Vibrio fischeri*. Система QS регулює вірулентність бактерій, синтез токсинів, антибіотиків, ферментів, процес споруляції, формування мікробних угруповань (рисунк), взаємодію між мікроорганізмами та організмом господаря.

Сигнальна система QS включає два обов'язкові компоненти: низькомолекулярний регулятор (автоіндуктор – AI), який легко дифундує через клітинну мембрану та рецепторний регуляторний білок, з яким зв'язується AI. У разі досягнення певної щільності популяції AI накопичуються до необхідного порогового значення та взаємодіють із відповідними регуляторними білками з утворенням комплексу «AI-рецепторний білок», який зв'язується з промоторними ділянками генів-мішеней, що викликає різку індукцію експресії певних генів, відповідальних за синтез альгінату, ДНК та інших речовин. Використовуючи QS, мікроорганізми здійснюють внутрішньовидову, міжвидову комунікацію, взаємодіють з вищими еукаріотами, забезпечують виживаність за несприятливих умов, зокрема, впливу агресивних речовин – антибіотиків і дезінфектантів [13–14].

У бактерій виділяють декілька типів (видів) AI:

– похідні N-ацил-гомосеринлактону (автоіндуктор-1, AI-1) синтезуються грамнегативними бактеріями, сьогодні налічується близько 40 видів AI-1. Рецепторні білки, з якими зв'язуються AI-1, та їхні синтази,

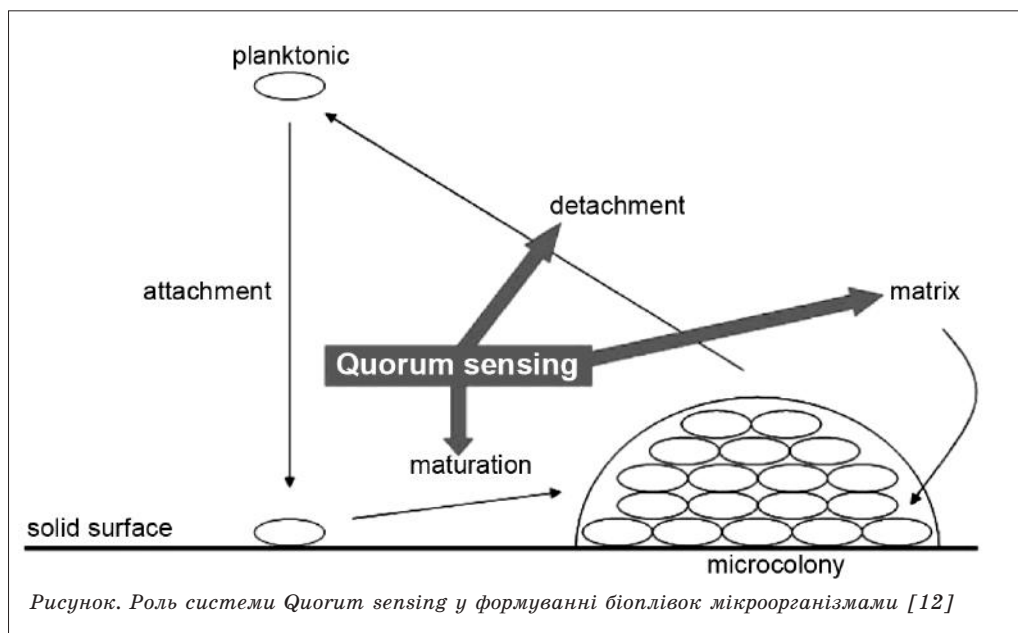


Рисунок. Роль системи Quorum sensing у формуванні біоплівки мікроорганізмами [12]

гомологічні LuxI і LuxR білкам *Vibrio fischeri*. Наприклад, у *Pseudomonas aeruginosa* описано 2 типи QS-систем – LasI-LasR і RhlI-RhlR. Система LasI-LasR регулює синтез факторів вірулентності (еластаз, протеаз, ендотоксинів) та активує другу систему QS. Синтаза LasI відповідає за продукцію N-(3-оксододеканоїл)-гомосеринлактону (3-охо-C12-HSL). Система RhlI-RhlR забезпечує виживаність синьогнійної палички в навколишньому середовищі, контролює експресію генів вірулентності та синтез піоціаніну. RhlI-синтаза визначає синтез N-бутирил-гомосеринлактону (C4-HSL);

- фуранозил-боратдієфір (автоіндуктор 2, AI-2) синтезується грамположитивними та грамнегативними бактеріями, регулює синтез факторів вірулентності у *Vibrio cholerae* та *Escherichia coli*, споруляцію у *Bacillus subtilis*. Синтаза AI-2 – LuxS – кодується генами *luxS*;
- AI ароматичної природи (автоіндуктор-3, AI-3) виявлені в *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Shigella*, *Salmonella* та *Klebsiella*. AI-3 характерні для системи QS, яка регулює процеси адгезії мікроорганізмів до епітеліальних клітин, активує експресію генів *flhDC*-оперона, що контролюють синтез джгутиків у бактерій.

Системи QseCB та QseEF, окрім синтезу AI-3, впливають на продукцію організмом господаря катехоламінових гормонів, зокрема, епінефрину/норепінефрину (адреналіну/норадреналіну);

- пептидні AI – сигнальні молекули з тіолактонним кільцем, які синтезуються грамположитивними бактеріями. Найвивченішою є QS система *Staphylococcus aureus*, що контролює процеси адгезії та колонізації мікроорганізмів, синтез токсинів, ферментів тощо. У стафілококів виявлено 4 типи пептидних AI. Цікавим є факт, що кожен тип AI, активуючи власний специфічний рецепторний білок, пригнічує активацію трьох інших типів [12–14].

Встановлено, що один вид бактерій може використовувати та розпізнавати різні типи сигнальних молекул, а сама система QS може бути мішенню дії антимікробних лікарських препаратів.

Пошук сполук з вираженою антибіоплівковою активністю, здатних порушувати QS-регуляцію патогенних бактерій, є важливим прикладним аспектом фундаментальних досліджень. Можливими механізмами впливу на систему QS може бути пригнічення синтезу AI, порушення зв'язування AI з рецепторними білками, розщеплення

сигнальних молекул, антагоністична дія відносно АІ тощо. Натепер відомо, що азитроміцин та аспірин здатні впливати на експресію генів QS, інгібувати фактори вірулентності бактерій, рухливість і плівкоутворення *P. aeruginosa* в умовах *in vitro* та *in vivo* [15–17]. Порушення біосинтезу урацилу 5-фторурацилом попереджує плівкоутворення синьогнійної палички, пригнічує синтез QS-факторів патогенності [18–19]. Нітрогліцерин запобігає зв'язуванню АІ з рецептором, що призводить до пригнічення плівкоутворення *P. aeruginosa*, синтезу піоціаніну та протеаз [20]. Похідні фуранонів виявляють антагоністичну активність відносно АІ бактерій [13–14]. Протимікробні властивості виявлено також у антигельмінтного препарату ніклозаміду (інгібує синтез QS – залежних сигнальних молекул AHL у *P. Aeruginosa*) [18, 21].

Клітини-персистери. За стресових умов частина мікробної популяції переходить у метаболічно інертний стан, який зумовлює стійкість біоплівки до антимікробних препаратів [22]. Субпопуляція клітин-персистерів за генотипом відповідає батьківській і виявляється в будь-якій мікробній популяції в невеликій кількості (0,1–1,0 %), незалежно від наявності стрес-факторів [23, 24]. Натепер запропоновано два можливих механізми переходу клітин мікроорганізмів у стан персистенції.

Перший з них обумовлений сигнальною системою загальної стресової відповіді (SOS-відповідь) з вторинним месенджером (алармоном) гуанозину поліфосфатом – (p)ppGp. Внаслідок ушкодження мікробних клітин сублетальними концентраціями антимікробних засобів активується зазначена сигнальна система, збільшується внутрішньоклітинний рівень (p)ppGp, що стимулює перехід клітин у персистуючий стан [25].

Другий механізм полягає в синтезі клітиною певного токсину (білок), який порушує трансляцію інших білків або деградацію РНК і блокує його дії – антитоксину (РНК або білок). Система «токсин-антитоксин» (ТА) контролює ріст і метаболізм бактерій. Так, Lon-

протеаза розпізнає та зумовлює деградацію агрегованих білків, сприяє деградації антитоксинів білкової природи й активації мРНК-ендонуклеаз [26].

За дії антимікробного агента (чи іншого стресора) активується синтез токсину, пригнічується синтез антитоксину та блокується певна мішень – метаболічний процес, що призводить до переходу клітин у стан спокою [22, 27, 28]. Так, гіперпродукція токсину RelE супроводжується збільшенням клітин-персистерів у популяції в 10 000 разів (з 0,1 % до 100 %) [29]. За відсутності стресора синтез антитоксину поновлюється, токсин інактивується, що призводить до відновлення росту бактерій [26].

ТА-система активується під впливом стресу, відповідь на який розповсюджується за допомогою «алармону» (p)ppGpp, що синтезується в разі активації токсинів RelA і SpoT. За його взаємодії з РНК-полімеразою відбувається зміна транскрипції та пригнічення синтезу білка. Також (p)ppGpp безпосередньо пригнічує реплікацію ДНК у клітинах мікроорганізмів [22, 25]. Недоліком гіпотез щодо участі ТА-систем в утворенні клітин-персистерів є одночасне набуття стійкості до багатьох антибактеріальних факторів, у тому числі й до фізико-хімічних. Тому формуванню персистентності має забезпечуватись або токсином, який блокує дуже велику кількість мішеней, або кількома ТА-системами одночасно [28].

Стимулюють утворення клітин-персистерів речовини, що знижують метаболічну активність клітин, серед яких інгібітори синтезу білка (тетрациклін, рифампіцин), метаболізму фосфатів, синтезу АТФ і дихання клітин [30]. Саме з цим пов'язана увага науковців на дослідження антибіоплівкової дії нових сполук і препаратів, здатних впливати на енергетичні або метаболічні процеси в клітинах, а також на речовини, що не потребують метаболічно активної мішені. Прикладом є протитуберкульозний препарат піразинамід (PZA), цистеїн, ретиноїди. Встановлено, що піразинамід виснажує енергію мембрани *Mycobacterium tuberculosis* та

інгібує транс-трансляцію в клітинах-персистерях [31], цистеїн і деякі тиол-вмісні сполуки – стимулюють дихання бактеріальних клітин [32], ретиноїди (похідні вітаміну А) – виявляють активність щодо персистерів за рахунок зв'язування з фосфоліпідами мембран грампозитивних бактерій, що призводить до порушення структури мембрани [33]. Експериментально доведено, що деякі сполуки сприяють реверсії персистерів грамнегативних бактерій у метаболічно активні клітини за рахунок посилення активності дихання, зміни структури білків і підвищення експресії окремих генів. Такі властивості виявлено в цис-2-деканової (або деценової) кислоти [34]. Встановлено, що підвищувати чутливість персистерів до дії антимікробних засобів здатні фуранони – інгібітори QS [35]. Перспективними антимікробними засобами можуть бути комбінації відомих АМП з пептидами. Так, тобраміцин, модифікований Реп-пептидом, викликає загибель клітин-персистерів, обумовлену порушенням структури мембрани [36].

З метою подолання стійкості біоплівки окрім пошуку таргетних молекул також розглядають можливість застосування неантимікробних препаратів, створення молекул, подібних до білків людини та мікроорганізмів, а також застосування вірусів бактерій – бактеріофагів.

Активність неантимікробних препаратів відносно біоплівки бактерій. Неантимікробні препарати, зокрема, нестероїдні протизапальні засоби, протипухлинні, антигельмінтні, гіполіпідемічні препарати в терапевтичних концентраціях окрім первинного фармакодинамічного ефекту здатні виявляти антимікробну дію щодо планктонних мікроорганізмів і біоплівки. Специфічна антибіоплівкова дія цих лікарських засобів пов'язана з порушенням рухливості й адгезії.

Так, антибіоплівкова активність виявлена також у муколітичного засобу N-ацетилцистеїну. Механізм антибіоплівкової активності зумовлений впливом на матрикс біоплівки (порушення синтезу екзополісахариду). Встановлено, що до дії N-ацетилцистеїну чутливі

як метицилін-чутливі, так і метицилін-резистентні штами *Staphylococcus epidermidis* [37]. Ацетилцистеїн збільшує ефективність цiproфлосацину відносно катетер-асоційованих біоплівок синьогнійної палички [38].

Саліцилова кислота та її похідні інгібують рухливість і плівкоутворення *P. aeruginosa* [38, 39], у терапевтичних дозах – запобігають адгезії бактерій, у разі збільшення концентрації – пригнічують синтез адгезинів *S. epidermidis*, продукцію фімбрії і гемаглютиніну *E. coli* [38, 40, 41].

Протизапальний препарат диклофенак натрію виявляє широкий спектр антибактеріальної дії, зокрема й антибіоплівкову активність, пригнічує синтез факторів вірулентності та різні типи рухливості *P. aeruginosa* [42–44].

Ібупрофен характеризується активністю відносно біоплівки *S. aureus* і *E. coli*, пригнічує плівкоутворення на катетерах [44, 45] та значно зменшує адгезію *E. coli* до клітин епітелію сечових шляхів, що пов'язане з впливом на продукцію фімбрії і зміною гідрофобності кишкової палички [40].

Протипухлинний засіб з групи антиметаболітів 5-фторурацил виявляє антимікробну дію відносно *S. aureus* і *S. epidermidis*, пригнічує синтез факторів вірулентності, рухливість і плівкоутворення *P. aeruginosa* та *E. coli*, застосовується для обробки катетерів у разі катетер-асоційованих інфекцій [18, 19].

Симвастатин (препарат, який знижує рівень холестерину та тригліцеридів) виявляє бактерицидну та бактеріостатичну активність щодо метицилін-чутливих (MSSA) і метицилін-резистентних (MRSA) штамів *S. aureus*, пригнічує адгезію, продукцію екзополісахаридів і плівкоутворення в стафілококів [46], проявляє антибіоплівкову активність відносно *P. aeruginosa* [18], *Candida spp.* і *Cryptococcus spp.* [47].

Нейролептик групи похідних фенотіазину – хлорпромазин здатен інгібувати ефлюксні помпи та плівкоутворення *E. coli*, *P. aeruginosa* та *S. aureus* [48].

Взаємодія імунної системи та біоплівки. Мікроорганізми в складі біоплівки характеризуються стійкістю до

ефекторів імунної системи організму. Позаклітинний матрикс біоплівки перешкоджає розпізнаванню патогенів, фагоцитозу та активації імунних клітин [49].

Імунна система макроорганізму характеризується складною взаємодією з біоплівками мікроорганізмів, сьогодні спостерігаються лише окремі випадки двостороннього «нападу» і «захисту», які неможливо спрогнозувати [50]. Клітини імунної системи здатні розпізнавати компоненти матриксу біоплівки *P. aeruginosa*, позаклітинну ДНК і сигнальні молекули QS – гомосеринлактони [51]. У дослідженнях *in vitro* встановлено, що лейкоцити здатні проникати всередину молодих і зрілих біоплівок *S. aureus* [52, 53], нейтрофіли – попереджувати плівкоутворення та руйнувати матрикс зрілих стафілококових біоплівок [50], макрофаги – активні відносно біоплівки *P. aeruginosa*, у матриксі яких відсутній альгінат [51].

З другого боку, імунна відповідь організму господаря може сприяти росту та дозріванню біоплівок, а також стати причиною пошкодження тканин макроорганізму. Наприклад, нейтрофіли адгезуються на поверхні біоплівки зі збереженням фагоцитарної активності, проте, фагоцитоз супроводжується зниженою інтенсивністю «респіраторного вибуху», що перешкоджає руйнуванню мікробних біоплівок і сприяє некрозу імунних клітин. Мікроорганізми можуть використовувати залишки некротизованих клітин як субстрат, що призводить до стимуляції плівкоутворення та збільшення кількості бактеріальних клітин.

Окрім імунної системи від негативної дії збудників організм людини захищають понад 100 антимікробних пептидів і білків у тканинах та органах, основними з яких є кателіцидини, дефензини, дермцидини, гепцидини, РНКазиди та гістатини [54, 55].

Так, кателіцидин LL-37 виявляє активність щодо бактерій і грибів, вірусів і паразитів; регулює імунну відповідь і загоювання ран; у низьких концентраціях пригнічує адгезію та плівкоутворення біоплівок стафілококів [56].

Антимікробні пептиди. Антимікробні пептиди характеризуються широким спектром активності, низькою частотою виникнення бактеріальної резистентності та специфічним механізмом дії, який включає утворення пор у цитоплазматичній мембрані. Їхня ефективність підтверджена в моделях *in vivo*, терапевтичне застосування забезпечується стабільністю в широкому діапазоні рН і температур, низькою токсичністю для еукаріотичних клітин.

Пептиди виявляють антибіоплівкову активність у низьких концентраціях, їхній механізм дії пов'язаний з впливом на адгезію та рухливість, із модуляцією імунної відповіді макроорганізму на формування біоплівок і впливом на систему QS. За взаємодії пептидів з поверхнею бактерій порушується міжклітинна комунікація, з компонентами матриксу – структура біоплівки. Антимікробні пептиди можуть впливати на еДНК, альгінат (компонент матриксу *P. aeruginosa*), PIA/PNAG і *Vap*-білок (компоненти матриксу *S. aureus*).

Сьогодні АМП вивчаються в доклінічних і клінічних випробуваннях для застосування за умов катетер-асоційованих і ранових інфекцій, а також муковісцидозу, а саме:

- даптоміцин (препарат «Кубіцин») – ліпопептид, зареєстрований в Україні в 2014 році для застосування в разі інфекцій, спричинених грампозитивними мікроорганізмами, ендокартиту, інфекцій шкіри та м'яких тканин, бактеріємії, у комбінованій терапії;
- оритаванцин, напівсинтетичний ліпоглікопептид застосовується в разі тяжких інфекційних процесів, викликаних грампозитивною флорою, активний відносно метицилінчутливих (MSSA), метицилінрезистентних (MRSA) і ванкоміцинрезистентних штамів (VRSA) *S. aureus*;
- оміганан – розробляється як препарат для застосування при дерматитах, акне, розацеа (фаза II і III);
- пексиганан – синтетичний пептид, був розроблений як новий місцевий антибіотик широкого спектра дії для лікування пацієнтів з легким і помірним перебігом інфекцій в осіб з син-

дромом діабетичної стопи (фаза III);
– поліміксини – пептидні антибіотики, які використовуються як препарати останньої лінії за бактеріальних інфекцій, викликаних грамнегативними бактеріями [57, 58].

Пептидні антибіотики даптоміцин (ліпопептид) і тейкопланін (глікопептид) у дослідженнях *in vitro* показали синергічний ефект з антибіотиками відносно біоплівки, сформованих MRSA: даптоміцин з тейкопланіном, азитроміцином, лінезолідом і ципрофлоксацином; тейкопланін з ципрофлоксацином й азитроміцином. Синергічна дія пептидів та антибіотиків може бути зумовлена різними механізмами дії препаратів [59].

Бактеріофаги. Бактеріофаги є вірусами, які можуть інфікувати бактерії двома різними шляхами: літичним і лізогенним. Антибактеріальні властивості бактеріофагів пов'язують з літичним циклом, який закінчується загибеллю бактерій-господарів внаслідок лізису й вивільненням нових фагів. У лізогенному циклі генетичний матеріал фага вбудовується в бактеріальну хромосому (профаг) з наступним виживанням клітин-господарів [60].

Бактеріофаги по-іншому діють на бактеріальні біоплівки, ніж хімічні препарати або біоциди. За допомогою літичних ферментів бактеріофаги здатні швидко руйнувати клітинну стінку бактерій і проникати в біоплівки [61].

Механізми взаємодії бактеріофагів з біоплівками наступні:

– бактеріофаги реплікуються в клітинах-хазяїна, що призводить до локалізованого збільшення кількості бактеріофагів (ампліфікація). Розмножуючись всередині біоплівки та

усуваючи бактерії, що продукують EPS, бактеріофаги поступово її руйнують і зменшують потенціал для регенерації;

– бактеріофаги проникають і залишаються всередині клітин-персистерів, активуються після реверсії бактерій до метаболічно активного стану та призводять до їхньої загибелі [62];
– віруси можуть вловлювати, інтерпретувати сигнали QS-системи (фаг VP882) та запускати літичний цикл у відповідь на певні хімічні сигнали [63].

Таким чином, проведений аналіз літературних джерел дозволив зробити висновок, що біоплівка є гетерогенною багатоклітинною структурою, стійкість якої до впливу зовнішніх факторів (у тому числі антимікробних речовин) визначається будовою позаклітинного матриксу, наявністю сигнальної системи (*Quorum sensing*), а також здатністю до переходу в метаболічно неактивний стан. Для підвищення ефективності антимікробної терапії біоплівкових інфекцій перспективними є речовини, які руйнують позаклітинний матрикс або підвищують його проникність, впливають на систему *Quorum sensing*, на метаболічно неактивні клітини або викликають їхню реверсію до активного стану. Нині здійснюється оцінка антибіоплівкової активності препаратів різних фармако-терапевтичних груп.

Цей огляд може бути підґрунтям для дослідників, які прагнуть досліджувати антибіоплівкові властивості нових речовин і розробляти потенційні лікарські засоби.

1. Gould I. M., Bal A. M. New antibiotic agents in the pipeline and how they can help overcome microbial resistance. *Virulence*. 2013. V. 4, № 2. P. 185–191.
2. Qin W., Panunzio M., Biondi S. β -Lactam antibiotics renaissance. *Antibiotics*. 2014. V. 3, № 2. P. 193–215.
3. Устинов В. А. Новый доклад ВОЗ по антибиотикорезистентности [Електронний ресурс]. *Український медичний часопис*. 2018. URL: <http://www.umj.com.ua/article/120095/novyj-doklad-voz-po-antibiotikorezistentnosti>
4. Салманов А. Г., Руденко А. В. Антимікробна резистентність провідних збудників інфекцій сечових шляхів у Києві (Україна). *International Journal of Antibiotics and Probiotics*. 2017. V. 1, № 2. P. 48–60.
5. European Union's action against antimicrobial resistance 2017 [Електронний ресурс]. URL: https://ec.europa.eu/health/amr/antimicrobial-resistance_en.

6. Thorpe K. E., Joski P., Johnston K. J. Antibiotic-resistant infection treatment costs have doubled since 2002, now exceeding \$2 billion annually. *Health Affairs*. 2018. – V. 37, № 4. P. 662–669.
7. Йовенко І. А., Балака І. В. Програма «Antimicrobial Stewardship» – стратегія антимікробного контролю в ОІТ в епоху антибіотикорезистентності. *Гострі та невідкладні стани у практиці лікаря*. 2017. № 5. С. 5–14.
8. Грузина В. Д. Коммуникативные сигналы бактерий. *Антибиотики и химиотерапия*. 2003. Т. 48, № 10. С. 32–39.
9. Sutherland I. W. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in microbiology*. 2001. V. 9, № 5. P. 222–227.
10. Пребиотическая коррекция при бактериальном вагинозе. А. Л. Тихомиров, В. В. Казенашев, С. И. Сарсания, К. С. Тускаев. *Медицинский совет*. 2017. № 2. С. 66–68.
11. Material properties of biofilms – a review of methods for understanding permeability and mechanics [Електронний ресурс]. N. Billings, A. Birjiniuk, T. S. Samad et al. *Reports on Progress in Physics*. 2015. V. 78, № 3. Art. 036601. 17 p. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/78/3/036601>.
12. Irie Y., Parsek M. R. *Quorum sensing* and microbial biofilms. *Bacterial biofilms*: ed. T. Romeo. Berlin : Springer, 2008. P. 67–84.
13. *Quorum sensing* и коммуникация бактерий. И. А. Хмель, А. С. Белик, Ю. В. Зайцева, Н. Н. Данилова. *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология*. 2008. № 1. С. 28–35.
14. Li Y. H., Tian X. *Quorum sensing* and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors*. 2012. V. 12, № 3. P. 2519–2538.
15. Imperi F., Leoni L., Visca P. Antivirulence activity of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* [Електронний ресурс]. *Frontiers in microbiology*. 2014. V. 5. P. 178. <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00178>.
16. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa quorum sensing* by subinhibitory concentrations of curcumin with gentamicin and azithromycin. S. Bahari, H. Zeighami, H. Mirshahabi et al. *Journal of global antimicrobial resistance*. 2017. V. 10. P. 21–28.
17. Aspirin is an efficient inhibitor of *quorum sensing*, virulence and toxins in *Pseudomonas aeruginosa*. S. A. El-Mowafy, K. H. El Galil, S. M. El-Messery, M. I. Shaaban. *Microbial pathogenesis*. 2014. V. 74. P. 25–32.
18. Drug repurposing as an alternative for the treatment of recalcitrant bacterial infections [Електронний ресурс]. A. Rangel-Vega, L. R. Bernstein, E. A. Mandujano Tinoco et al. *Frontiers in microbiology*. 2015. V. 6. Art. 282. <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00282>.
19. Repurposing of anticancer drugs for the treatment of bacterial infections. V. W. C. Soo, B. W. Kwan, H. Quezada et al. *Current topics in medicinal chemistry*. 2017. V. 17, № 10. P. 1157–1176.
20. Abbas H. A., Shaldam M. A. Glyceryl trinitrate is a novel inhibitor of *quorum sensing* in *Pseudomonas aeruginosa*. *African health sciences*. 2016. V. 16, № 4. P. 1109–1117.
21. New life for an old drug: the anthelmintic drug niclosamide inhibits *Pseudomonas aeruginosa Quorum Sensing*. F. Imperi, F. Massai, C. R. Pillai et al. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013. V. 57, № 2. P. 996–1005.
22. Wood T. K., Knelbel S. J., Kwan B. W. Bacterial persister cell formation and dormancy. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. V. 79, № 23. P. 7116–7121.
23. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat. Rev. Microbiol.* 2007. V. 5. P. 48–56.
24. Niepa T. H., Gilbert J. L., Ren D. Controlling *Pseudomonas aeruginosa* persister cells by weak electrochemical currents and synergistic effects with tobramycin. *Biomaterials*. 2012. V. 33, № 30. P. 7356–7365.
25. Harms A., Maisonneuve E., Gerdes K. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure [Електронний ресурс]. *Science*. 2016. V. 354, № 6318. aaf4268. <https://dx.doi.org/10.1126/science.aaf4268>.
26. Bacterial persistence by RNA endonucleases. E. Maisonneuve, L. J. Shakespeare, M. Jorgensen, K. Gerdes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011. V. 108, № 32. P. 13206–13211.
27. Page R., Peti W. Toxin–antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nature chemical biology*. 2016. V. 12, № 4. P. 208–214.
28. Плакунов В. К., Стрелкова Е. А., Журина М. В. Персистенция и адаптивный мутагенез в биопленках. *Микробиология*. 2010. Т. 79, № 4. С. 447–458.
29. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. I. Keren, D. Shah, A. Spoering et al. *J. Bacteriol.* 2004. V. 186, № 24. P. 8172–8180.
30. Fisher R. A., Gollan B., Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nature Reviews Microbiology*. 2017. V. 15, № 8. P. 453–464.
31. Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. W. Shi, X. Zhang, X. Jiang et al. *Science*. 2011. V. 333, № 6049. P. 1630–1632.

32. Enhanced respiration prevents drug tolerance and drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. C. Vilcheze, T. Hartman, B. Weinrick et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017. V. 114, № 17. P. 4495–4500.
33. Hurdle J. G., Deshpande A. Bacterial persister cells tackled. *Nature*. 2018. V. 556, № 7699. P. 40–41.
34. The fatty acid signalling molecule cis-2-decenoic acid increases metabolic activity and reverts persister cells to an antimicrobial-susceptible state. C. N. Marques, A. Morozov, P. Planzos, H. M. Zelaya. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80, № 22. P. 6976–6991.
35. Reverting antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 persister cells by (Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-methylfuran-2(5H)-one [Электронный ресурс]. J. Pan, A. A. Bahar, H. Syed, D. Ren. *PLoS One*. 2012. V. 7, № 9. e45778. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045778>.
36. Engineering persister-specific antibiotics with synergistic antimicrobial functions. N. W., S. Schmidt Deshayes, S. Hawker et al. *ACS Nano*. 2014. V. 8, № 9. P. 8786–8793.
37. Kirmusaoglu S., Yurdugu S., Kocoglu M. E. The effect of N-acetylcysteine on growth and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* strains. *Turk. J. Med. Sci.* 2012. V. 42, № 4. P. 689–694.
38. Evaluation of the combination of N-acetylcysteine and or sodium salicylate with ciprofloxacin on bacterial adhesion and biofilm formation on urinary catheters [Электронный ресурс]. A. A. Abd El-Aziz, T. El-Banna, F. I. Sonbol et al. *The International Arabic Journal of Antimicrobial Agents*. 2012. V. 2, № 1. 4 p. <https://doi.org/10.3823/708>.
39. Salicylic acid affects swimming, twitching and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*, resulting in decreased biofilm formation. S. Chow, K. Gu, L. Jiang, A. Nassour. *Journal of experimental microbiology and immunology*. 2011. V. 15. P. 22–29.
40. Zimmermann P., Curtisa N. Antimicrobial effects of antipyretics [Электронный ресурс]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017. V. 61, № 4. e02268-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02268-16>.
41. The effect of aspirin on adherence of slime-producing, coagulase-negative *Staphylococci* to vascular grafts. M. K. Demirag, S. Esen, M. Zivalioglu et al. *Ann. Surg.* 2007. V. 21, № 4. P. 464–467.
42. Ulusoy S., Bosgelmez-Tinaz G. Nonsteroidal antiinflammatory drugs reduce the production of *Quorum Sensing* regulated virulence factors and swarming motility in human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Research*. 2013. V. 63, № 8. P. 409–413.
43. Abbas H. A. Inhibition of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by diclofenac sodium. *Roum. Arch. Microbiol. Immunol.* 2015. V. 74, № 3–4. P. 79–85.
44. Reslinski A., Dabrowiecki S., Glowacka K. The impact of diclofenac and ibuprofen on biofilm formation on the surface of polypropylene mesh. *Hernia*. 2015. V. 19, № 2. P. 179–185.
45. Anti-biofilm activity of ibuprofen and diclofenac against some biofilm producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* uropathogens. R. Baldiris, V. Teheran, R. Vivas-Reyes et al. *African Journal of Microbiology Research*. 2016. V. 10, № 40. P. 1675–1684.
46. Statins and antimicrobial effects: simvastatin as a potential drug against *Staphylococcus aureus* biofilm [Электронный ресурс]. T. S. Graziano, M. C. Cuzzullin, G. C. Franco et al. *PLoS one*. 2015. V. 10, № 5. e0128098. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128098>.
47. Simvastatin inhibits planktonic cells and biofilms of *Candida* and *Cryptococcus species*. R. S. N. Brillhantea, E. P. Caetano, J. S. Oliveira et al. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2015. V. 19, № 5 P. 459–465.
48. Inhibition of multidrug efflux as a strategy to prevent biofilm formation. S. Baugh, C. R. Phillips, A. S. Ekanayaka et al. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013. V. 69, № 3. P. 673–681.
49. Biofilm switch and immune response determinants at early stages of infection. J. Valle, C. Solano, B. Garcia et al. *Trends in microbiology*. 2013. V. 21, № 8. P. 364–371.
50. Чеботарь И. В. Механизмы антибиопленочного иммунитета. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2012. Т. 67, № 12. С. 22–29.
51. How biofilms evade host defenses [Электронный ресурс]. E. Roilides, M. Simitsopoulou, A. Katragkou, T. J. Walsh. *Microbiology spectrum*. 2015. V. 3, № 3. – MB-0012. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0012-2014>.
52. Глушанова Н. А., Блинов А. И., Алексеева Н. Б. Бактериальные биопленки в инфекционной патологии человека. Медицина в Кузбассе. 2015. Спецвыпуск 2. С. 30–35.
53. Targeting the bacterial protective armour; challenges and novel strategies in the treatment of microbial biofilm. N. Kamaruzzaman, L. Tan, K. Mat Yazid et al. *Materials*. 2018. V. 11, № 9. P. 1705.
54. Wang G., Li X., Wang Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res*. 2009. V. 37, Suppl. 1. P. D933–D937.
55. Wang G. Human antimicrobial peptides and proteins. *Pharmaceuticals*. 2014. V. 7, № 5. P. 545–594.
56. Mishra B., Golla R. M., Lau K. Anti-staphylococcal biofilm effects of human cathelicidin peptides. *ACS medicinal chemistry letters*. 2015. V. 7, № 1. P. 117–121.
57. Chung P. Y., Khanum R. Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multidrug-resistant bacteria. *Journal of microbiology, immunology and infection*. 2017. V. 50, № 4. P. 405–410.

58. *Batoni G., Maisetta G., Esin S.* Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*. 2016. V. 1858, № 5. P. 1044–1160.
59. *Mataraci E., Dosler S.* *In vitro* activities of antibiotics and antimicrobial cationic peptides alone and in combination against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012. V. 56, № 12. P. 6366–6371.
60. Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry [Електронний ресурс]. D. Gutierrez, L. Rodriguez-Rubio, B. Martinez et al. *Frontiers in microbiology*. 2016. V. 7. P. 825. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00825>.
61. Дрюккер В. В., Горшкова А. С. Бактериофаги и их функционирование в биопленках. *Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология*. 2012. Т. 5, № 3. С. 8–16.
62. Bacteriophages and Biofilms. D. R. Harper, H. M. R. T. Parracho, J. Walker et al. *Antibiotics*. 2014. V. 3, № 3. P. 270–284.
63. *Silpe J. E., Bassler B. L.* A host-produced *quorum-sensing* autoinducer controls a phage lysis-lysogeny decision. *Cell*. 2019. V. 176, № 1–2. P. 268–280.

Н. О. Врынчану, Д. М. Дудікова, Н. І. Гринчук, В. В. Недашківська **Біоплівки. Сучасний стан і перспективи антимікробної терапії**

Огляд присвячений аналізу сучасних даних щодо механізмів стійкості біоплівок до антимікробних засобів та пошуку нових активних речовин з антибіоплівковою активністю.

Проведений аналіз літературних джерел показав, що біоплівка є гетерогенною багатоклітинною структурою, стійкість якої до впливу зовнішніх факторів (у т. ч. антимікробних речовин) визначається будовою позаклітинного матриксу, наявністю сигнальної системи (*Quorum sensing*), а також здатністю до переходу в метаболічно неактивний стан. Для підвищення ефективності антибіоплівкової терапії як перспективні розглядають речовини, які: 1) руйнують позаклітинний матрикс або підвищують його проникність; 2) впливають на систему *Quorum sensing* і синтез аутоіндукторів; 3) впливають на метаболічно неактивні клітини або викликають їхню реверсію до активного стану. З метою подолання стійкості біоплівок окрім пошуку таргетних молекул також розглядають можливість застосування не антимікробних препаратів, створення молекул, подібних до білків людини та мікроорганізмів, а також застосування вірусів бактерій – бактериофагів.

Цей огляд може бути підґрунтям для дослідників, які прагнуть вивчати антибіоплівкові властивості нових речовин і розробляти потенційні лікарські засоби.

Ключові слова: біоплівки, антибіотикорезистентність, *Quorum sensing*, персистери

Н. А. Врынчану, Д. М. Дудикова, Н. И. Гринчук, В. В. Недашковская **Биопленки. Современное состояние и перспективы антимикробной терапии**

Обзор посвящен анализу современных данных о механизмах устойчивости биопленок к антимикробным средствам и поиску новых веществ, активных в отношении биопленок.

Проведенный анализ литературных источников показал, что биопленка является гетерогенной многоклеточной структурой, устойчивость которой к внешним факторам (в том числе антимикробным веществам) определяется строением внеклеточного матрикса, наличием сигнальной системы (*Quorum sensing*), а также способностью переходить в метаболически неактивное состояние. Для повышения эффективности антибиопленочной терапии как перспективные рассматривают вещества, которые: 1) разрушают внеклеточный матрикс либо повышают его проницаемость; 2) ингибируют систему *Quorum sensing* и влияют на синтез аутоиндукторов; 3) влияют на метаболически неактивные клетки либо вызывают их реверсию в активное состояние. С целью преодоления устойчивости биопленок кроме таргетных молекул также рассматривают возможность применения не антимикробных препаратов, создание молекул, подобных белкам человека и микроорганизмов, а также использование вирусов бактерий – бактериофагов.

Данный обзор адресован исследователям, которые изучают антибиопленочные свойства новых веществ и разрабатывают потенциальные лекарственные средства.

Ключевые слова: биопленки, антибиотикорезистентность, *Quorum sensing*, персистери

N. O. Vrynchanu, D. M. Dudikova, N. I. Hrynchuk, V. V. Nedashkivska **Biofilms. The current status and prospects of antimicrobial therapy**

The review focuses on the analysis of current data on the mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents and the search for new substances with antibiofilm activity.

Based on data in the literature we showed that biofilm is heterogeneous multicellular structure, whose resistance to external factors (including antimicrobial substances) is due to the structure of the extracellular matrix, the presence of a signal system (*Quorum sensing*), and the level of metabolic activity inside the biofilm. The effectiveness of antibiofilm therapy could be increased by substances that (1) destroy the extracellular matrix or increase its permeability; (2) inhibit the *Quorum sensing* system and affect the

synthesis of autoinductors; (3) are active against the metabolically inactive cells or cause their reversion to an active state. In order to overcome the resistance of bacterial biofilms the targeted molecules are used. In addition, other means are also being considered: the non-antimicrobial agents, the molecules similar to human proteins and microorganisms, and the bacteriophages.

This review can serve as a useful starting point for researchers who study the antibiofilm properties of new substances and develop potential drugs.

Key words: biofilms, antibiotic resistance, Quorum sensing, persisters

Надійшла: 30 серпня 2019 р.

Прийнята до друку: 16 жовтня 2019 р.

Контактна особа: Вринчану Ніна Олексіївна, доктор медичних наук, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМНУ», буд. 14, вул. Антона Цедіка, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 44 456 78 62.

Л. Б. Бондаренко¹, Т. А. Карацуба¹, О. О. Хавич¹,
Г. М. Шаяхметова¹, Н. І. Шарикіна¹, В. М. Коваленко¹,
Р. О. Стратійчук², А. А. Коновалов², М. М. Калачінська³

Вплив Іфітинібу на складові хроматину та стан антиоксидантної системи в карциномі Герена та незмінених тканинах матки

¹Державна установа «Інститут фармакології та токсикології
Національної академії медичних наук України», м. Київ

²Навчально-науковий центр «Інститут біології і медицини»
Київського національного університету ім. Т. Г. Шевченка, м. Київ

³Відкритий міжнародний університет розвитку людини «Україна», м. Київ

Ключові слова: Іфітиніб, карцинома Герена, ДНК, РНК, фрагментація, антиоксидантна система

Одне з провідних місць серед існуючих методів лікування онкологічних хворих займає хіміотерапія [1]. Її застосовують як самостійний метод або як компонент комплексного лікування. Інтенсивний пошук нових високоефективних протипухлинних препаратів є однією з найнагальніших проблем сучасної онкофармакології.

Однак призначення протипухлинних засобів пов'язане з низкою суттєвих проблем [2]. Одна з них полягає в неспецифічності дії протипухлинних препаратів і високій токсичності щодо органів і тканин, неуражених пухлиною [3, 4], зокрема, наявністю в них серйозної кардіо-, нефро- та нейротоксичності [5]. Ситуація ускладнюється тією обставиною, що більшість досліджень з онкофармакології традиційно фокусувалось на виявленні специфічної дії протипухлинних засобів стосовно тканин саме пухлин, тоді як на стан прилеглих тканин, які не були захоплені інвазією пухлини, звертали мало уваги. Вивчення біохімічних змін у цих тканинах проводилось не системно, наявні розрізнені дані, в основному одержані в ході токсикологічних випробувань.

У той самий час навіть наявні результати [3–5] свідчать, що неспецифічна дія протипухлинної хіміотерапії на

прилегли до пухлини тканини сама по собі здатна погіршити стан організму додатково до наслідків розвитку неопластичного процесу в ньому і, навіть, справити вирішальну роль у виживанні організму.

У зв'язку з усім вищезгаданим актуальним є проведення паралельних досліджень впливу нових протипухлинних засобів на етапі доклінічних випробувань як на пухлини, так і на тканини того самого організму, які не уражені неопластичними змінами, для подальшої оптимізації хіміотерапії.

Мета дослідження – вивчити вплив Іфітинібу на ДНК, РНК, білки хроматину, процеси фрагментації ДНК, вміст небілкових і пов'язаних з білками SH-груп у карциномі Герена та незмінених тканинах матки.

Матеріали та методи. Дослідження впливу Іфітинібу проводили на білих щурах-самицях лінії Вістар масою 150–250 г, вирощених у віварії ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМНУ». Тварин утримували на стандартному харчовому раціоні за умов вільного доступу до води. План досліджень був розглянутий і схвалений Комітетом з біоетики ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМНУ». Усі процедури, що пов'язані з гуманним поводженням із тваринами та їхнім використанням у експериментах, були дотримані. Тварин розподіляли на групи за методом рандомізації з попереднім карантинном протягом 7 діб.

Іфітиніб було синтезовано у відділі медичної хімії ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМНУ».

Вплив Іфітинібу на складові хроматину та стан антиоксидантної системи вивчали за умов експериментальної моделі карциноми Герена, яку одержували шляхом трансплантації тваринам за стандартними методами [6]. Тварини були розподілені за методом рандомізації на 3 групи по 6 тварин у кожній: 1 – інтактні щури; 2 – негативний контроль (карцинома Герена); 3 – карцинома Герена + 29,93 мг/кг Іфітинібу. Структурну формулу Іфітинібу надано на рисунку 1.

Тваринам III групи перорально вводили Іфітиніб, а щурам I і II груп – відповідний об'єм 0,9 % водного розчину хлориду натрію. Введення проводили кожні 48 год, розпочинаючи з наступної доби після трансплантації карциноми Герена, протягом двох тижнів. На 15 добу експерименту (після 24 год голодування) тварин зважували, потім під легким ефірним наркозом у них брали кров зі стегнової вени, знеживлювали методом цервікальної дислокації й вилучали пухлини та відповідні тканини без неопластичних змін для подальших досліджень.

Заморожені в рідкому азоті тканини гомогенізували та виділяли геномну ДНК, РНК і білки [7].

Для виділення нуклеїнових кислот гомогенізацію зразка (50 мкг) проводили в 1 мл TRI-регенту («Sigma», США), після чого додавали 200 мкл хлороформу, струшували й залишали стояти за кімнатної температури протягом 15 хв. Далі центрифугува-

ли (12 000 g, 2 °C, 15 хв), після чого розчин розділювався на три фази: червону (білки), білу (містить ДНК) і безбарвну фазу (містить РНК). Фракції акуратно розшаровували окремо по пробіркам для очищення та визначення вмісту.

Для виділення РНК у мікропробірку з відібраною безбарвною фазою додавали 0,5 мл ізопропанолу, відстоювали 5–10 хв за кімнатної температури і центрифугували (12 000 g, 2 °C, 10 хв), зливали супернатант. До осаду додавали 75 % етанол до об'єму 2 мл, центрифугували за 12 000 g, 2 °C, 5 хв, зливали супернатант. Процедуру повторювали двічі. Одержаний зразок РНК висушували та розводили в 100 мкл DEPC-води.

Для виділення ДНК в епандорф з відібраною фракцією додавали 0,3 мл 100 % етанолу, відстоювали 2–3 хв за кімнатної температури, центрифугували (2000 g, 2 °C, 5 хв), зливали супернатант. До осаду додавали розчин 0,1 моль/л цитрату натрію в 10 % етанолі (2 мл), відстоювали 30 хв, центрифугували за тих самих умов, зливали супернатант. Осад промивали 2 рази в 70 % етанолі, як зазначено вище, та висушували. Одержаний зразок ДНК висушували та розводили в 100 мкл DEPC-води.

Спектрофотометричне визначення концентрації ДНК і РНК проводили за загальноприйнятим методом [8]. Вимірювали поглинання світла за довжини хвилі 260 нм. Розраховували концентрацію ДНК, використовуючи коефіцієнт перерахунку 6,5 за формулою:

$$C_{\text{ДНК}} [\text{мкг/мл}] = A_{260} \cdot 6,5.$$

Аналогічно проводили визначення вмісту РНК і розраховували її концентрацію, використовуючи коефіцієнт перерахунку 5,2 за формулою:

$$C_{\text{РНК}} [\text{мкг/мл}] = A_{260} \cdot 5,2.$$

Вміст гістонів визначали за модифікованим методом М. Г. Трудолюбової [9].

Для визначення ступеня фрагментації ДНК розчиняли у ТВЕ буфері (10 ммоль/л Tris-HCl і 1 ммоль/л EDTA, pH 8) і розділяли в 2 % агарозному гелі 80В;

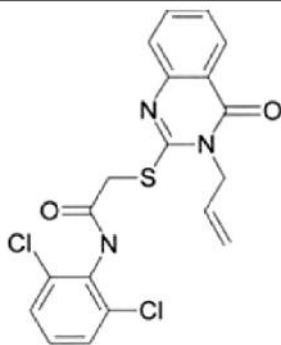


Рис. 1. Структурна формула Іфітинібу

83 мА, 6 W, 2 год. Після завершення електрофорезу гелі забарвлювали розчином бромистого етидію (5 мкг/мл) і фотографували в УФ-світлі за допомогою системи GelDoc («BioRad», США) [10].

У гомогенатах тканин також визначали вміст небілкових і пов'язаних з білками SH-груп [11].

Отримані дані представляли як середнє значення \pm похибка середнього ($M \pm m$). Статистичний аналіз результатів експерименту проводили з використанням однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Різницю між досліджуваними показниками вважали статистично вірогідною в разі $p \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення. Ушкодження будь-яких внутрішньоклітинних макромолекул (ДНК, РНК, протеїнів, ліпідів) внаслідок розвитку онкологічного процесу може мати принципове значення для життєдіяльності клітини, а значні відхилення їхнього вмісту від нормального рівня – призводити до пошкодження клітини та її загибелі.

ДНК – важлива молекулярна мішень для низки сполук, яка піддається летальному розщепленню індукованими ними ендонуклеазами [12]. Рівень і характер фрагментації ДНК є марке-

ром протікання процесів апоптозу в організмі [13].

Результати вивчення впливу пухлини Герена та її лікування препаратом Іфітиніб на процеси фрагментації ДНК наведені на рисунку 2.

Як видно з фотографій електрофореграм, як за умов розвитку пухлини, так і за умов введення препарату Іфітиніб відбувається суттєва інтенсифікація процесів фрагментації ДНК у клітинах. Це цілком відповідає даним інших авторів, які відзначали, що рівень фрагментації ДНК звичайно коливається в межах 5–8 % у здоровому організмі за нормальних умов, а за умов розвитку навіть передонкологічного процесу відбувається його значне посилення [14].

За умов розвитку пухлини Герена у наших експериментах кількість фрагментів ДНК сягала 22. Із них фрагментів із довжинами молекул від 1000 пар основ до 500 пар основ було 10; фрагментів із довжинами молекул від 500 пар основ до 200 пар основ – 5; фрагментів із довжинами молекул від 200 пар основ до 20 пар – 7. Причому за вмістом переважали фрагменти ДНК із середніми розмірами (від 1000 до 500 пар основ).

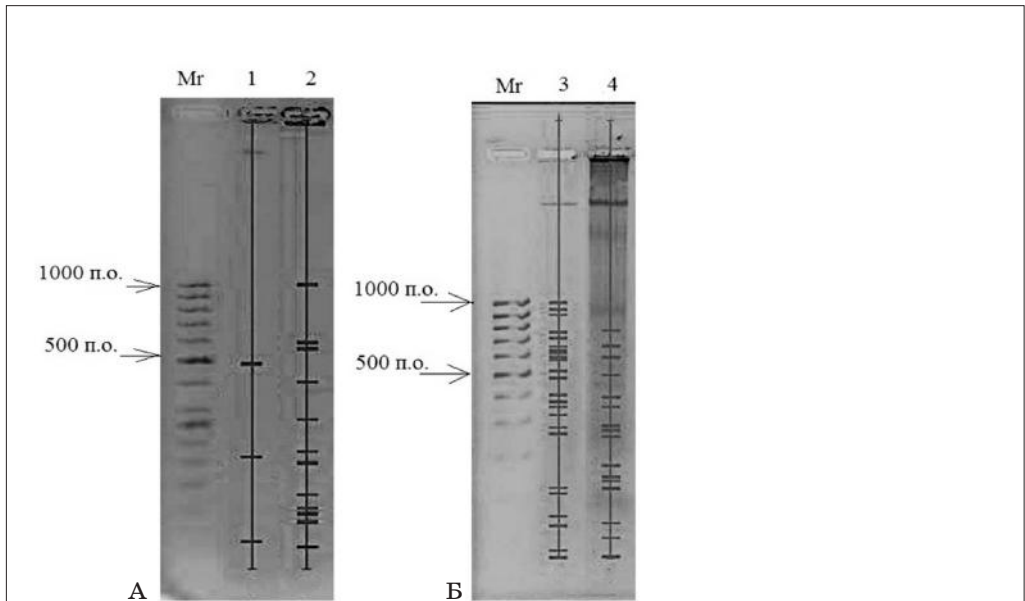


Рис. 2. Рівень фрагментації ДНК у тканині карциноми Герена (Б) та неуражених пухлинною тканинах матки (А) за умов введення щуром Іфітинібу

Примітка. 1 – інтактний контроль, 2 – тканина, яка неуражена пухлиною + Іфітиніб, 3 – карцинома Герена, 4 – карцинома Герена + Іфітиніб.

Ці дані цілком узгоджуються з результатами інших авторів, зокрема, в експериментах на білих безпородних щурах-самцях масою 120–160 г [15] було показано, що пошкодження ДНК чітко корелювало з ростом карциноми Герена в експериментальних тварин.

Лікування препаратом Іфітиніб призводило до деякого зменшення числа фрагментів ДНК у клітинах пухлини Герена – до 16 і зміни характеру самої фрагментації. Так, із цих 16 фрагментів з довжинами молекул від 1000 до 500 пар основ було 3; фрагментів з довжинами молекул від 500 до 200 пар основ було в середньому 5; фрагментів з довжинами молекул від 200 пар основ до 20 пар – 8. Причому за вмістом переважали фрагменти ДНК із найменшими розмірами (від 200 до 20 пар основ).

У неуразених пухлинами тканинах введення Іфітинібу призводило до утворення 12 фрагментів ДНК. Із цих 12 фрагментів з довжинами молекул від 1000 до 500 пар основ було 3; фрагментів з довжинами молекул від 500 до 200 пар основ було в середньому – 2; фрагментів з довжинами молекул від 200 пар основ до 20 пар – 7. Причому за вмістом переважали фрагменти ДНК з найменшими розмірами (від 200 до 20 пар основ).

Результати визначення процента фрагментації ДНК в експериментальних тварин наведені в таблиці 1. Із наведених даних видно, що як розвиток пухлини, так і саме введення препарату призводили до зростання процента фрагментації ДНК. Спостерігається певна тенденція до зниження відсотка фрагментації ДНК за умов лікування карциноми Герена препаратом Іфітиніб.

Відзначений нами вплив Іфітинібу на ДНК на тлі онкологічного процесу може бути пов'язаний з його здатністю

спричиняти цитостатичний ефект на клітини пухлин, що супроводжується пригніченням їхньої мітотичної активності. Подібну активність має Етопозид, що гальмує мітотичну активність клітин карциноми Герена, що проявляється через добу як у разі окремого застосування, так і в комбінації з опроміненням і супроводжується зростанням числа клітин пухлини невеликого розміру [16]. У цьому разі апоптотична активність клітин гальмується.

Не можна також виключати можливість реалізації ефекту за рахунок взаємодії з протеїнами з сімейства Bcl-2, що є ключовим регулятором залежного від мітохондрій апоптозу в клітині та включає як антиапоптотичні (Bcl-xL, Bcl-2, Bcl-w, A1, Mcl-1), так і проапоптотичні (Bak, Bax, Bid, Bim, Bad, Bik, Bmf, Noxa, Puma) білки [17]. Такі властивості вже виявлені в низки хімічних сполук, що містять у своїй структурі орто-конденсовані системи (зокрема, карбацефами, гомотіенаміцини) [17].

Крім того, треба мати на увазі й існування шляху опосередкованого впливу цитостатика на процеси фрагментації ДНК. Показано, що критичним компонентом сигналіngu в опроміненіх клітинах є метаболіт сфінголіпідів – церамід, який відіграє центральну роль у сигнальній трансдукції, у регуляції диференціювання клітин, арешті клітинного циклу та бере участь в апоптозі [18]. Генерація цієї сполуки є важливим етапом в індукції загибелі пухлинних клітин цитотоксичними агентами. Цитотоксичний ефект пов'язаний з активацією апоптозу через церамід-опосередковані шляхи.

Однак механізми накопичення, обміну сфінголіпідів за дії хіміопрепаратів, у яких превалює цитостатична, а не цитотоксична активність у пухлині,

Таблиця 1

Процент фрагментації ДНК в експериментальних тварин

Показник	Експериментальна група			
	тканина матки (інтактний контроль)	неуразена тканина матки щурів з карциномою Герена + Іфітиніб	карцинома Герена (негативний контроль)	карцинома Герена + Іфітиніб
Фрагментація ДНК, %	11,92	45,34	61,99	53,43

залишаються маловивченими. Різними групами дослідників показано, що превалювання цитостатичної чи цитотоксичної активності в різних препаратів, що застосовуються для хіміотерапії різних пухлин, сильно варіює як залежно від хімічної природи препарату, так і від типу пухлини та поєднання препаратів у комбінації з радіоопроміненням [19].

Зокрема, Етопозид сам по собі послаблює апоптотичну загибель клітин [16], а в поєднанні з радіоопроміненням – стимулює, так само, як і Таксотер [20]. Поєднана дія опромінення та цих хіміопрепаратів є індуктором накопичення в тканині пухлини Герена активатора апоптозу ракових клітин цераміду, тоді як цисплатин активує сфінгомеліновий шлях накопичення цераміду в пухлинних клітинах.

Було досліджено вміст РНК, ДНК, співвідношення РНК/ДНК, вміст РНК відносно загального вмісту нуклеїнових кислот і вміст гістонів у пухлині Герена й за лікування препаратом Іфітиніб.

Із наведених даних (табл. 2) видно, що статистично вірогідних змін ДНК за умов розвитку пухлини Герена та її лікування Інфітинібом не відзначалось

ні у власне пухлинах, ні у тканинах, які не уражені неопластичними змінами. Відбувалось вірогідне зростання вмісту РНК, співвідношення РНК/ДНК, співвідношення РНК до загального вмісту нуклеїнових кислот у пухлині Герена як з лікуванням, так і без, тоді як у тканинах, які не уражені неопластичними змінами, ці показники вірогідно не відрізнялися від інтактного контролю. Одночасно спостерігалось вірогідне зниження вмісту гістонових білків за даних умов експерименту, що може свідчити про зменшення стабільності структури хроматину за пухлинного росту та хіміотерапії похідними хіназоліну.

Одержані результати цілком узгоджуються з даними літератури. Загалом відомо, що в нормальних соматичних клітинах кількість ДНК, основного носія генетичної інформації, є стабільною [20], тоді як кількість РНК, що безпосередньо бере участь у синтезі білка, змінюється залежно від віку, життєвої стадії, наявності захворювань й умов навколишнього середовища [20]. Таким чином, вважають, що клітини, які перебувають у стабільному стані, як правило, мають більш високі співвідношення РНК/ДНК, ніж ті, які мають

Таблиця 2

Вміст нуклеїнових кислот, їхні співвідношення та вміст гістонів у клітинах карциноми Герена і тканин матки без неопластичних змін за умов введення щуром тест-зразка Іфітинібу

Показник	Експериментальна група			
	тканина матки (інтактний контроль)	неуражена тканина матки щурів з карциномою Герена + Іфітиніб	карцинома Герена (негативний контроль)	карцинома Герена + Іфітиніб
Вміст РНК, мкг/мг білка	31,43 ± 3,57	28,28 ± 4,36 ^{#,&}	90,92 ± 16,48 [*]	82,37 ± 23,74 [*]
Вміст ДНК, мкг/мг білка	105,37 ± 2,29	102,0 ± 46,0	98,68 ± 0,68	105,37 ± 2,28
Співвідношення РНК/ДНК, у. о.	0,30 ± 0,04	0,29 ± 0,04 ^{#,&}	0,92 ± 0,16 [*]	0,78 ± 0,23 [*]
Співвідношення РНК і загального вмісту нуклеїнових кислот, у. о.	0,23 ± 0,02	0,20 ± 0,03 ^{#,&}	0,48 ± 0,04 [*]	0,42 ± 0,08 [*]
Гістони, мг/мг тканини	0,55 ± 0,02	0,46 ± 0,02 [*]	0,33 ± 0,03 [*]	0,48 ± 0,04 [#]

Примітка. ^{*}*p* < 0,05 порівняно з інтактним контролем, [#]*p* < 0,05 порівняно з показником групи з пухлинами без введення препарату, [&]*p* < 0,05 порівняно з показником групи з пухлинами та введенням препарату.

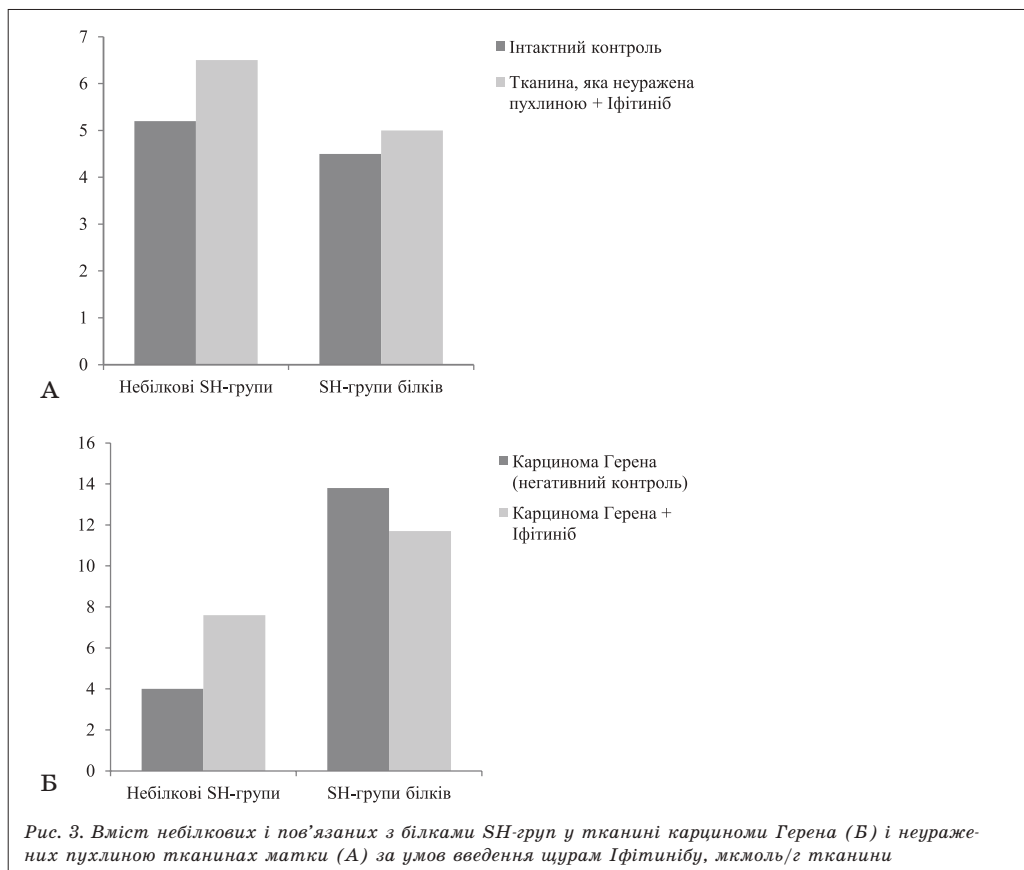
відхилення від норми [21]. З іншого боку, аналіз вмісту ДНК і РНК у неопластичних клітинах [22] свідчить про зростання вмісту РНК і ДНК. Найбільші значення ДНК і РНК виявляють у метастазуючих карциномах (виключенням є зниження кількості РНК у пухлинах середньої диференціації). Більше того, з переходом процесу метастазування на наступний етап за умов зростання рівнів ДНК і РНК може знижуватись їхнє співвідношення. Збільшення кількості нуклеїнових кислот у ракових клітинах може свідчити про підвищення ризику розвитку пухлинних депозитів і закономірно зростає з кожним подальшим етапом метастазування [22].

Дані, що наведені в таблиці 2, демонструють незначну тенденцію до зростання вмісту ДНК і тенденцію до зниження вмісту РНК та гістонів у результаті лікування карциноми Герена препаратом Іфітиніб порівняно з нелікованою пухлиною. Останнє, зокрема, може свідчити про включення механізмів гальмування мітотичного циклу [23] у

клітинах пухлини під дією Іфітинібу, що є додатковим підтвердженням нашого припущення щодо переважання цитостатичного ефекту цього препарату за його дії на пухлинні клітини. Одночасно нами виявлено тенденцію до зниження співвідношення РНК/ДНК і РНК/(РНК + ДНК). Ми в даному випадку розглядаємо цей феномен як позитивний, оскільки відношення вмісту РНК до загального вмісту нуклеїнових кислот $[\alpha = \text{РНК} / (\text{РНК} + \text{ДНК})]$ забезпечує чутливий аналіз будь-яких відхилень від збалансованого клітинного росту [24]. Таким чином, на нашу думку, подібні результати можуть свідчити про порушення зростання неопластичних клітин внаслідок застосування досліджуваного агента.

Характер змін досліджуваних показників у тканинах без неопластичних процесів свідчить про аналогічну дію даного препарату як на пухлини, так і на неушкоджені клітини.

На рисунку 3 наведено результати дослідження вмісту небілкових і



пов'язаних з білками SH-груп у тканині карциноми Герена та неуражених пухлиною тканинах за умов введення щурам Іфітинібу. За умов розвитку карциноми Герена відбувається суттєве зниження вмісту небілкових і пов'язаних з білками SH-груп, що не може не позначитись на стані систем антиоксидантного захисту клітин організму [25]. Лікування Іфітинібом дозволяє частково нормалізувати ці показники. Цікаво, що на відміну від тканини пухлини в неуражених пухлиною тканинах вірогідний ефект досліджуваного препарату відсутній, що може вказувати на наявність специфічного не лише цитостатичного, але й опосередкованого впливом на системи

антиоксидантного захисту ефекту Іфітинібу на карциному Герена.

Висновки

Вивчення впливу Іфітинібу на ДНК, РНК, білки хроматину, процеси фрагментації ДНК, вміст небілкових і пов'язаних з білками SH-груп у карциномі Герена та незмінених тканинах матки показало, що даний препарат вірогідно змінював більшість досліджуваних показників як порівняно з інтактними тваринами, так і з карциномою Герена без лікування. При цьому специфічність впливу Іфітинібу на клітини пухлин була найвираженішою у випадку ДНК-фрагментації та змін вмісту небілкових і пов'язаних з білками SH-груп.

1. Subgroup effects in a randomised trial of different types and doses of exercise during breast cancer chemotherapy. K. S. Courneya, D. C. McKenzie, J. R. Mackey et al. *Br J Cancer*. 2014. V. 111. P. 1718–1725. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.466>.
2. Nanoscale drug delivery strategies for therapy of ovarian cancer: conventional vs targeted. S. Gupta, Y. Pathak, M. K. Gupta, S. P. Vyas. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2019. V. 47. P. 4066–4088. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1677680>.
3. *Smithson C. R., Schneider S. M.* Ibrutinib: a new targeted therapy for hematologic cancers. *Clin J Oncol Nurs*. 2015. V. 19. P. E47–E51. <https://doi.org/10.1188/15.CJON.E47-E51>.
4. *Ali I.* Nano drugs: novel agents for cancer chemo-therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2011. V. 11. P. 130.
5. Clinical applications of nanomedicine in cancer therapy. M. Norouzi, M. Amerian, M. Amerian, F. Atyabi. *Drug Discov Today*. 2019. pii: S1359-6446(19)30377-0. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.09.017>.
6. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США; под ред. З. П. Софьиной и др. Москва : Медицина, 1980. 296 с.
7. *Current Protocols in Toxicology*; ed. M. Maines. N. Y. : John Wiley & Sons, Inc., 2005. 2758 p.
8. *Великов В. А.* Молекулярная биология. Практическое руководство: учеб. пособие для студ. биол. фак. и фак. нано- и биомед. технол., обучающихся по напр. «Биология (020400)», «Биология-пед (050100)», «Биотехнические системы и технологии (200100)», «Медицинская физика (011200)» и по спец. «Биоинженерия и биоинформатика (020501)». Саратов : Издательство «Саратовский источник», 2013. 84 с.
9. *Орехович В. Н.* Современные методы в биохимии. Москва : Медицина, 1977. С. 313–316.
10. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. P. Lee, J. Costumbrado, C. Hsu, Y. Kim. *Journal of Visualized Experiments*. 2012. V. 62. P. 3923.
11. *Sedlak J., Lindsay R. H.* Estimation of total, protein-bound, and non protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *J. Sedlak. Analytical Biochemistry*. 1968. V. 25. P. 192–205.
12. DMBA-induced cytotoxicity in lymphoid and nonlymphoid organs of B6C3F1 mice: relation of cell death to target cell intracellular calcium and DNA damage. S. W. Burchiel, D. A. Davis, S. D. Ray et al. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 1992. V. 113. P. 126–132.
13. Induction of Cytochrome P450 2E1 Increases Hepatotoxicity Caused by Fas Agonistic Jo2 Antibody in Mice. X. Wang, Lu Y. Yongke, A. I. Cederbaum. *Hepatology*. 2005. V. 42. P. 400–411.
14. *Erol A.* Systemic DNA damage response and metabolic syndrome as a premalignant state. *Curr. Mol. Med*. 2010. № 10, V. 3. P. 321–334.
15. Комбінований вплив екзогенних оксидів азоту та малих доз іонізуючої радіації на розвиток генетичної нестабільності та утворення вільнорадикальних сполук при пухлинному рості. О. А. Главін, Б. І. Геращенко, Н. М. та ін. *Сучасні проблеми токсикології*. 2011. Т. 5. С. 108–109.
16. *Лукашова О. П.* Действие ионизирующей радиации и препарата «Этопозид» на процессы апоптоза и ультраструктуры клеток карциномы Герена. *Український радіологічний журнал*. 2013. Т. 21. С. 56–63.

17. Індукуючі апоптоз засоби для лікування злоякісних пухлин, імунологічних і автоімунних захворювань. Э. Дж. Сауерс, С. Ван, Дж. Салливан и др. Патент США. – С07D471/04, С07D463/00, А61Р35/00, А61К31/437. URL: <http://www.findpatent.ru/patent/266/2662812.html>
18. Ceramide-induced cell death in malignant cells. A. Carpinteiro, C. Dumitru, M. Schenck, E. Gulbins. *Cancer Letters*. 2008. V. 264. P. 1–10.
19. Вплив поєднаної дії іонізуючого випромінювання та хіміопрепаратів на вміст проапоптозного ліпиду цераміду в карциномі Герена. Т. Сегеда, Н. Мітряєва, Т. Бакай, Л. Гребіник. *Вісник Львівського університету*. Серія біологічна. Вип. 60. 2012. С. 111–116.
20. Bulow J. F. RNA-DNA ratios as indicators of growth rates in fish: A review. In: Summerfelt RC, Hall GE, editors. *The age and growth of fish*. Ames, Iowa: The Iowa State University Press, 1987. P. 45–64.
21. Robinson S. M., Ware D. Ontogenetic development of growth rates in larval Pacific herring, *Clupea harengus pallasii*, measured with RNA/DNA ratios in the Strait of Georgia, British Columbia. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1988. V. 45. P. 1422–1429.
22. Новичков Е. В., Вотинцев А. А. Значение гистоспектрофотометрических параметров опухоли в прогнозе метастазирования серозной овариальной карциномы. *Пермский медицинский журнал*. 2006. № 23. С. 113–127.
23. Морфология внутренних органов и опухоли лабораторных крыс с перевитым раком печени Рс-1 при пероральном введении флавоноидсодержащих экстрактов аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) и кукурузы антоциановой (*Zea Mays* L.). Н. А. Наволокин, Н. В. Полуконова, Г. Н. Маслякова и др. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2013. Т. 9. С. 213–237.
24. Traganos F., Darzynkiewicz Z., Melamed M. R. The ratio of RNA to total nucleic acid content as a quantitative measure of unbalanced cell growth. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*. 1982. V. 2. P. 212–218.
25. Hutcheson R., Rocic P. The Metabolic Syndrome, Oxidative Stress, Environment, and Cardiovascular Disease: The Great Exploration. *Experimental Diabetes Research*. 2012. V. 2012. P. 1–13.

**Л. Б. Бондаренко, Т. А. Карацуба, О. О. Хавич, Г. М. Шаяхметова,
Н. І. Шарикіна, В. М. Коваленко, Р. О. Стратійчук, А. А. Коновалов,
М. М. Калачінська**

Вплив Іфітінібу на складові хроматину та стан антиоксидантної системи в карциномі Герена та незмінених тканинах матки

Неспецифічна дія протипухлинної хіміотерапії на прилеглі до пухлини тканини сама по собі здатна погіршити стан організму додатково до наслідків розвитку неопластичного процесу і навіть справити вирішальну роль у виживанні організму. Тому актуальним є проведення паралельних досліджень впливу нових протипухлинних засобів на етапі доклінічних випробувань як на пухлини, так і на тканини того самого організму, які не уражені неопластичним процесом, для подальшої оптимізації хіміотерапії.

Мета дослідження – вивчити вплив Іфітінібу на ДНК, РНК, білки хроматину, процеси фрагментації ДНК, вміст небілкових і пов'язаних з білками SH-груп у карциномі Герена та незмінених тканинах матки.

Дослідження впливу Іфітінібу проводили на білих щурах-самицях лінії Вістар. Тварини були розподілені за методом рандомізації на 3 групи по 6 тварин у кожній: 1 – інтактні щури, 2 – негативний контроль (карцинома Герена), 3 – карцинома Герена + 29,93 мг/кг Іфітінібу.

Вивчення впливу Іфітінібу на ДНК, РНК, білки хроматину, процеси фрагментації ДНК, вміст небілкових і пов'язаних з білками SH-груп у карциномі Герена та незмінених тканинах матки показало, що даний препарат вірогідно змінював більшість досліджуваних показників як порівняно з інтактними тваринами, так і з карциномою Герена без лікування. Специфічність впливу Іфітінібу на клітини пухлин була найвираженішою у випадку ДНК-фрагментації та змін вмісту небілкових і пов'язаних з білками SH-груп.

Ключові слова: Іфітініб, карцинома Герена, ДНК, РНК, фрагментація, антиоксидантна система

**Л. Б. Бондаренко, Т. А. Карацуба, О. А. Хавич, А. М. Шаяхметова,
Н. И. Шарыкина, В. Н. Коваленко, Р. А. Стратийчук, А. А. Коновалов,
М. Н. Калачинская**

Влияние Ифитиниба на составляющие хроматина и состояние антиоксидантной системы в карциноме Герена и неизмененных тканях матки

Неспецифическое действие противоопухолевой химиотерапии на прилегающие к опухоли ткани само по себе способно ухудшить состояние организма дополнительно к последствиям развития неопластического процесса в нем и даже оказать решающую роль в выживании организма. Поэтому актуальным является проведение параллельных исследований влияния новых противоопухолевых средств на этапе доклинических испытаний как на опухоли, так и на ткани того же самого организма, непораженные неопластическими изменениями, для дальнейшей оптимизации химиотерапии.

Цель исследования – изучить влияние Ифитиниба на ДНК, РНК, белки хроматина, процессы фрагментации ДНК, содержание небелковых и связанных с белками SH-групп в карциноме Герена и неизмененных тканях матки.

Исследование влияния Ифитиниба проводили на белых крысах-самках линии Вистар. Животные были рандомизированы на 3 группы по 6 животных в каждой: 1 – интактные крысы, 2 – отрицательный контроль (карцинома Герена), 3 – карцинома Герена + 29,93 мг/кг Ифитиниба.

Изучение влияния Ифитиниба на ДНК, РНК, белки хроматина, процессы фрагментации ДНК, содержание небелковых и связанных с белками SH-групп в карциноме Герена и неизмененных тканях матки показало, что данный препарат достоверно менял большинство исследуемых показателей как по сравнению с интактными животными, так и с карциномой Герена без лечения. При этом специфичность влияния Ифитиниба на клетки опухоли была наиболее выражена в случае ДНК-фрагментации и изменений содержания небелковых и связанных с белками SH-групп.

Ключевые слова: Ифитиниб, карцинома Герена, ДНК, РНК, фрагментация, антиоксидантная система

**L. B. Bondarenko, T. A. Karatsuba, O. O. Khavich, G. M. Shayakhmetova,
N. I. Sharykina, V. M. Kovalenko, R. O. Stratiychuk, A. A. Kononov,
M. M. Kalachinska**

The effect of Ifitinib on chromatin components and antioxidant system in Guerin's carcinoma and unchanged uterine tissues

The non-specific effect of antitumor chemotherapy on the tissue adjacent to the tumor itself can worsen the organism's state additionally to the consequences of neoplastic process development and even may have a decisive role in the survival of the whole organism. Therefore, it is relevant to conduct parallel studies of the effect of new antitumor agents at the stage of preclinical trials on both tumors and tissues that are not affected by neoplastic changes in order to further optimization of chemotherapy.

Objective: to study the effect of Ifitinib on DNA, RNA, chromatin proteins, DNA fragmentation processes, the content of non-protein and protein-associated SH-groups in Guerin's carcinoma and unchanged uterine tissues.

A study was carried out on white Wistar female rats. Animals were randomized into 3 groups of 6 animals each: 1 – intact rats; 2 – negative control (Guerin's carcinoma) 3 – Guerin's carcinoma + 29.93 mg / kg Ifitinib. A study of Ifitinib effects on DNA, RNA, chromatin proteins, DNA fragmentation processes, the content of non-protein and protein-associated SH groups in Guerin's carcinoma and unchanged uterine tissues showed that this drug significantly changed the majority of the studied parameters both in comparison with intact animals and with Guerin's carcinoma without treatment. Moreover, the specificity of Ifitinib influence on tumor cells was most pronounced in the case of DNA fragmentation and changes in the content of non-protein and protein-associated SH-groups.

Key words: Ifitinib, Guerin's carcinoma, DNA, RNA, fragmentation, antioxidant system

Надійшла: 22 серпня 2019 р.

Прийнята до друку: 16 жовтня 2019 р.

Контактна особа: Бондаренко Л. Б., ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМНУ», буд. 14, вул. Антона Цедіка, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 44 456 42 56.

S. A. Demchenko¹, Yu. A. Fedchenkova², T. A. Bukhtiarova¹,
L. S. Bobkova¹, V. V. Sukhoveev^{2,3}, A. M. Demchenko^{1,2}

Synthesis and anticancer activity of 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)- 5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[cd]azulene-2-carboxylic acid arylamides against PC-3 prostate cancer cells

¹Institute of Pharmacology and Toxicology of National Academy of Medical Sciences, Ukraine

²Nizhyn Mykola Gogol State University

³V. P. Kukhar Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry
of the National Academy of Sciences of Ukraine

Key words: anticancer activity, 5-fluorouracil, derivatives of 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[cd]azulene-2-carboxylic acid, PC-3 prostate cancer cells

Prostate gland cancer is one of the most widespread malignant diseases in men. More than 600 000 new cases of this disease are registered annually [1]. Medics associate this with improvement in methodology of screening, aimed at detecting prostate cancer on early stages, which are mandatory at certain age [2]. Important factors of disease risk are age (nearly 80 % of cases – are in men, older than 60), stress, which weaken immune system, excessively high-calorie foods, hereditary causes. Lack of testosterone and vitamin D plays an important role too [3]. There are references in literature about significant ethnic variability in cases of prostate cancer in the world. Interesting, that tendency in values persists in men of different skin colors on all continents [4].

Methods of treatment depend on factors, such as stage of disease, tumor growth intensity, presence of metastases and possible complications, etc. However, plans of prostate cancer treatment in the world practice change, as consequence of new medicines addition on the pharmaceutical market, such as arbitaron acetate, docetaxel, enzalumid [4].

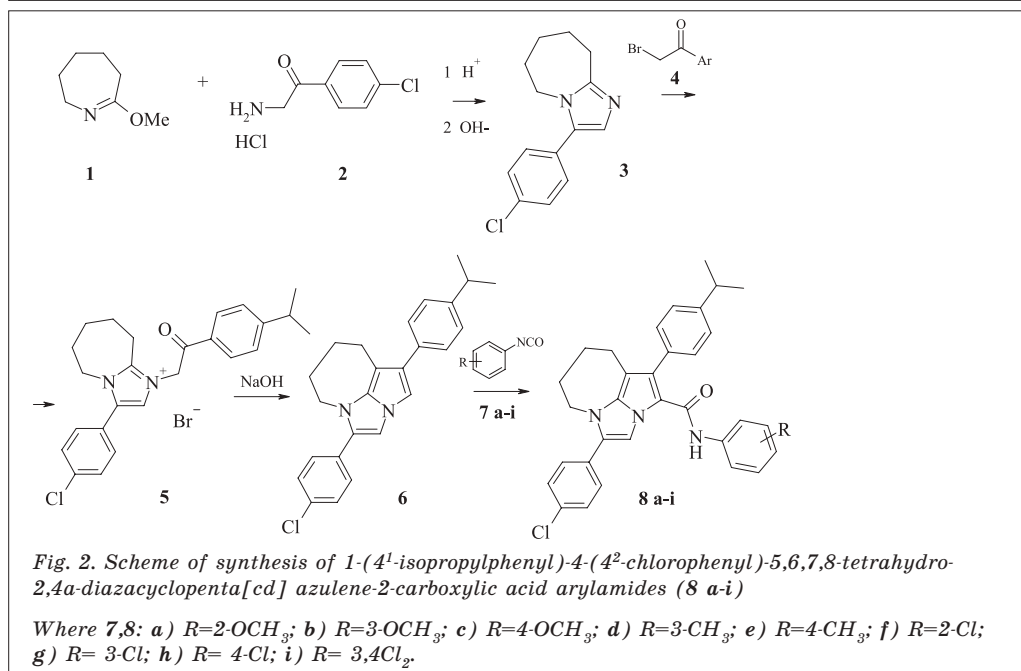
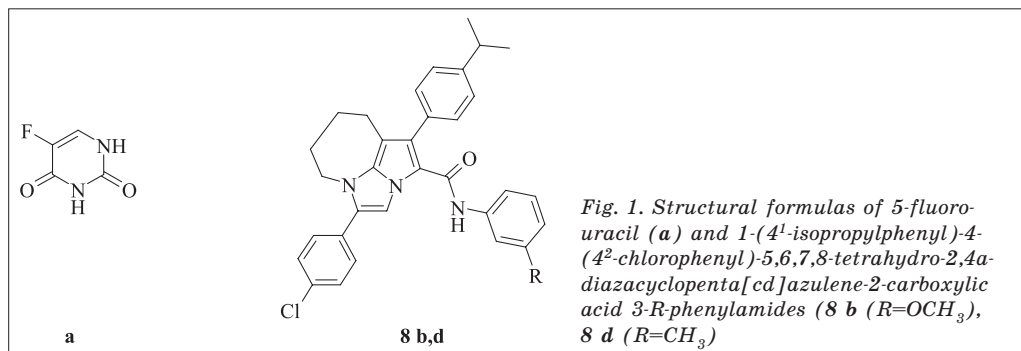
In last 10 years in Ukraine there is observed upward trend in number of prostate cancer cases among male population. Disease progresses slowly and symptoms appear on 3–4 stages. Lethal cases are 41 on 100 thousands of people [5]. This is why creation of new locally produced antitumor agents is an urgent task of pharmacy.

Agent from group of antagonists, 5-fluorouracil, is used as a standard for comparison of antitumor activity of new perspective compounds. It inhibits the process of cancer cells division by blocking DNA synthesis.

Increase in effectiveness of chemotherapy treatment for tumor disease is related to creation of new, effective antitumor medical agents. Particularly, based on azulenes derivatives [6–11].

The aim of this study – to synthesize novel derivatives of 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[cd]azulene-2-carboxylic acid arylamides and to evaluate their activity against PC-3 prostate cancer cells as compared with known antitumor compound 5-fluorouracil (Fig. 1).

Materials and methods. Test compounds – 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[cd]azulene-2-carboxylic acid arylamides (**8 a-i**) were synthesized in department of medical chemistry, SI «Institute of Pharmacology and Toxicology NAMS of Ukraine» (Fig. 2).



2-Methoxy-3,4,5,6-tetrahydro-7H-azepine **1** was obtained by alkylating caprolactam with dimethyl sulfate using the method [12]. Chlorohydrate α -amino-4-chloroacetophenone **2** was obtained [13] by condensation of α -bromo-4-chloroacetophenone with hexamethylenetetramine. 3-(4-Chlorophenyl)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-imidazo[1,2-a]azepine **3** was obtained by methods [14, 15].

¹H-NMR spectra were recorded on the Bruker VXR-500 (Germany), the working frequency of 500.13 MHz, in DMSO-d₆ + CCl₄ (1:3) using tetramethylsilane (TMS) as an internal standard. Chemical shifts are reported in ppm units with use of the δ scale. Purity control of novel compounds was conducted by thin-layer chromatography in the system chloroform – methanol 9:1. The melting points were measured on a small-sized heating table

with the observation device RNMK 05 (VEB Analytik, Dresden). Lipophilicity (LogP) of compounds **6** and **8 a-i** was calculated using the program ACD LogP.

Synthesis of 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[cd]azulene 6. To solution of 4.93 g (0.02 M) 3-(4-chlorophenyl)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-imidazo[1,2-a]azepine **3** in 150 ml ethylacetate 4.82 g (0.02 M) α -bromo-4-isopropylacetophenone **4** was added. The reaction mixture was refluxed for 1 hour. After cooling the solid **5** was filtered, washed with ethylacetate, then dried on air. To suspension of 1-[2-(4¹-isopropylphenyl)-2-oxoethyl]-3-(4²-chlorophenyl)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-imidazo[1,2-a]azepin-1-ium bromide **5** in 40 ml water 5 % NaOH in 20 ml was added. The reaction mixture was refluxed for 3 hours. After

cooling the solid **6** was filtered, washed with water, then dried on air and recrystallized from benzene. Yield 3.35 g (43 %). Anal. Calc. for $C_{25}H_{25}ClN_2$. %: N 7.20. Found, %: N 7.32. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.33 (d, 6H, $CH(CH_3)_2$), 1.89 (m, 2H, CH_2), 2.05 (m, 2H, CH_2), 2.53 (m, 2H, CH_2), 3.06 (m, 1H, $CH(CH_3)_2$), 3.95 (m, 2H, CH_2), 6.85 (s, 1H, 2-CH), 7.40 and 7.52 (d-d, 4H, C_6H_4 , $J=7.8$ Hz), 7.49 (s, 1H, 3-CH), 7.57 and 7.63 (d-d, 4H, C_6H_4 , $J=8.7$ Hz). Log P = 7.88 ± 0.88 .

*Synthesis of 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[cd]azulene-2-carboxylic acid (2-methoxyphenyl)-amide **8 a**.* The mixture 1.94 g (0.005 M) of 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[cd]azulene **6** and 0.745 g (0.005 M) of 2-methoxyphenylisocyanate **7 a** was refluxed in 100 ml of dried benzene during 2 hours. After cooling the solid **8 a** was filtered, washed with benzene, then dried on air and recrystallized from ethanol. Yield 1.86 g (69 %). M.p. = 205–206 °C. Anal. Calc. for $C_{33}H_{32}ClN_3O_2$. %: Cl 6.60; N 7.81. Found, %: Cl 6.77; N 7.98. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.31 (d, 6H, $CH(CH_3)_2$), 1.86 (m, 2H, CH_2), 2.02 (m, 2H, CH_2), 2.41 (m, 2H, CH_2), 3.03 (m, 1H, $CH(CH_3)_2$), 3.42 (s, 3H, OCH_3), 3.93 (m, 2H, CH_2), 7.69 (s, 1H, NH), 6.80–8.36 (m, 4H, $o-C_6H_4$), 7.36 and 7.45 (d-d, 4H, C_6H_4 , $J=8.4$ Hz), 7.59 and 7.66 (d-d, 4H, C_6H_4 , $J=8.4$ Hz), 8.01 (s, 1H, 3-CH). Log P = 7.98 ± 1.17 .

*Synthesis of 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[cd]azulene-2-carboxylic acid (3-methoxyphenyl)-amide **8 b*** was obtained as amide **8 a** from 1.94 g (0.005 M) of 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[cd]azulene **6** and 0.745 g (0.005 M) of 3-methoxyphenylisocyanate **7 b**. Yield 1.93 g (77 %). M.p. = 220–222 °C. Anal. Calc. for $C_{33}H_{32}ClN_3O_2$. %: Cl 6.60; N 7.81. Found, %: Cl 6.74; N 7.95. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.31 (d, 6H, $CH(CH_3)_2$), 1.88 (m, 2H, CH_2), 2.05 (m, 2H, CH_2), 2.53 (m, 2H, CH_2), 3.04 (m, 1H, $CH(CH_3)_2$), 3.65 (s, 3H, OCH_3), 3.94 (m, 2H, CH_2),

6.39–7.04 (m, 4H, C_6H_4), 6.83 (s, 1H, NH), 7.41 and 7.49 (d-d, 4H, C_6H_4 , $J=7.8$ Hz), 7.58 and 7.65 (d-d, 4H, C_6H_4 , $J=8.7$ Hz), 7.94 (s, 1H, 3-CH). Log P = 8.25 ± 1.17 .

*Synthesis of 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[cd]azulene-2-carboxylic acid (4-methoxyphenyl)-amide **8 c*** was obtained as amide **8 a** from 1.94 g (0.005 M) of 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[cd]azulene **6** and 0.745 g (0.005 M) of 4-methoxyphenylisocyanate **7 c**. Yield 2.15 g (80 %). M.p. = 182–183 °C. Anal. Calc. for $C_{33}H_{32}ClN_3O_2$. %: Cl 6.60; N 7.81. Found, %: Cl 6.51; N 7.95. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.30 (d, 6H, $CH(CH_3)_2$), 1.88 (m, 2H, CH_2), 2.03 (m, 2H, CH_2), 2.51 (m, 2H, CH_2), 3.03 (m, 1H, $CH(CH_3)_2$), 3.67 (s, 3H, OCH_3), 3.93 (m, 2H, CH_2), 6.76 and 6.97 (d-d, 4H, C_6H_4 , $J=9.0$ Hz), 6.95 (s, 1H, NH), 7.40 and 7.47 (d-d, 4H, C_6H_4 , $J=8.1$ Hz), 7.58 and 7.65 (d-d, 4H, C_6H_4 , $J=8.4$ Hz), 7.93 (s, 1H, 3-CH). Log P = 8.04 ± 1.17 .

*Synthesis of 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[cd]azulene-2-carboxylic acid (3-methylphenyl)-amide **8 d*** was obtained as amide **8 a** from 1.94 g (0.005 M) of 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[cd]azulene **6** and 0.67 g (0.005 M) of 3-methylphenylisocyanate **7 d**. Yield 1.93 g (74 %). M.p. = 204–205 °C. Anal. Calc. for $C_{33}H_{32}ClN_3O$. %: Cl 6.80; N 8.04. Found, %: Cl 6.69; N 8.21. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.32 (d, 6H, $CH(CH_3)_2$), 1.89 (m, 2H, CH_2), 2.04 (m, 2H, CH_2), 2.16 (s, 3H, CH_3), 2.51 (m, 2H, CH_2), 3.05 (m, 1H, $CH(CH_3)_2$), 3.95 (m, 2H, CH_2), 6.56 (s, 1H, NH), 6.71–7.07 (m, 4H, C_6H_4), 7.42 and 7.50 (d-d, 4H, C_6H_4 , $J=7.8$ Hz), 7.59 and 7.66 (d-d, 4H, C_6H_4 , $J=8.7$ Hz), 7.95 (s, 1H, 3-CH). Log P = 8.55 ± 1.16 .

*Synthesis of 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[cd]azulene-2-carboxylic acid (4-methylphenyl)-amide **8 e*** was obtained as amide **8 a** from 1.94 g (0.005 M) of 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[cd]azulene **6** and 0.67 g (0.005 M) of

4-methylphenylisocyanate **7 e**. Yield 1.98 g (76 %). M.p.= 207–208 °C. Anal. Calc. for $C_{33}H_{32}ClN_3O$. %: Cl 6.80; N 8.04. Found, %: Cl 6.93; N 8.04. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.31 (d, 6H, $CH(CH_3)_2$), 1.88 (m, 2H, CH_2), 2.03 (m, 2H, CH_2), 2.18 (s, 3H, CH_3), 2.49 (m, 2H, CH_2), 3.03 (m, 1H, $CH(CH_3)_2$), 3.93 (m, 2H, CH_2), 6.95 (s, 1H, NH), 6.90 and 6.97 (d-d, 4H, C_6H_4 , $J=8.4$ Hz), 7.40 and 7.47 (d-d, 4H, C_6H_4 , $J=7.7$ Hz), 7.58 and 7.65 (d-d, 4H, C_6H_4 , $J=8.7$ Hz), 7.93 (s, 1H, 3-CH). Log P = 8.55 ± 1.16 .

*Synthesis of 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[cd]azulene-2-carboxylic acid (2-chlorophenyl)-amide **8 f*** was obtained as amide **8 a** from 1.94 g (0.005 M) of 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[cd]azulene **6** and 0.77 g (0.005 M) of 2-chlorophenylisocyanate **7 f**. Yield 2.14 g (79 %). M.p.= 202–203 °C. Anal. Calc. for $C_{32}H_{29}Cl_2N_3O$. %: Cl 13.1; N 7.75. Found, %: Cl 13.3; N 7.89. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.32 (d, 6H, $CH(CH_3)_2$), 1.89 (m, 2H, CH_2), 2.04 (m, 2H, CH_2), 2.17 (s, 3H, CH_3), 2.51 (m, 2H, CH_2), 3.02 (m, 1H, $CH(CH_3)_2$), 3.94 (m, 2H, CH_2), 7.15 (s, 1H, NH), 6.93–7.27 (m, 4H, C_6H_4), 7.41 and 7.45 (d-d, 4H, C_6H_4 , $J=7.7$ Hz), 7.57 and 7.65 (d-d, 4H, C_6H_4 , $J=8.7$ Hz), 7.90 (s, 1H, 3-CH). Log P = 8.59 ± 1.17 .

*Synthesis of 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[cd]azulene-2-carboxylic acid (3-chlorophenyl)-amide **8 g*** was obtained as amide **8 a** from 1.94 g (0.005 M) of 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[cd]azulene **6** and 0.77 g (0.005 M) of 3-chlorophenylisocyanate **7 g**. Yield 2.20 g (81 %). M.p.= 210–211 °C. Anal. Calc. for $C_{32}H_{29}Cl_2N_3O$. %: Cl 13.1; N 7.75. Found, %: Cl 13.2; N 7.83. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.30 (d, 6H, $CH(CH_3)_2$), 1.88 (m, 2H, CH_2), 2.02 (m, 2H, CH_2), 2.19 (s, 3H, CH_3), 2.48 (m, 2H, CH_2), 3.03 (m, 1H, $CH(CH_3)_2$), 3.93 (m, 2H, CH_2), 7.16 (s, 1H, NH), 6.91–7.45 (m, 4H, C_6H_4), 7.39 and 7.46 (d-d, 4H, C_6H_4 , $J=8.1$ Hz), 7.58 and 7.65 (d-d, 4H, C_6H_4 , $J=8.7$ Hz), 7.93 (s, 1H, 3-CH). Log P = 9.12 ± 1.17 .

*Synthesis of 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[cd]azulene-2-carboxylic acid (2-chlorophenyl)-amide **8 h*** was obtained as amide **8 a** from 1.94 g (0.005 M) of 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[cd]azulene **6** and 0.77 g (0.005 M) of 4-chlorophenylisocyanate **7 h**. Yield 2.25 g (83 %). M.p.= 214–215 °C. Anal. Calc. for $C_{32}H_{29}Cl_2N_3O$. %: Cl 13.1; N 7.75. Found, %: Cl 12.9; N 7.64. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.30 (d, 6H, $CH(CH_3)_2$), 1.88 (m, 2H, CH_2), 2.03 (m, 2H, CH_2), 2.49 (m, 2H, CH_2), 3.02 (m, 1H, $CH(CH_3)_2$), 3.94 (m, 2H, CH_2), 7.04 and 7.22 (d-d, 4H, C_6H_4 , $J=8.7$ Hz), 7.14 (s, 1H, NH), 7.40 and 7.47 (d-d, 4H, C_6H_4 , $J=8.1$ Hz), 7.58 and 7.65 (d-d, 4H, C_6H_4 , $J=8.8$ Hz), 7.92 (s, 1H, 3-CH). Log P = 9.08 ± 1.17 .

*Synthesis of 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[cd]azulene-2-carboxylic acid (3,4-dichlorophenyl)-amide **8 i*** was obtained as amide **8 a** from 1.94 g (0.005 M) of 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[cd]azulene **6** and 0.94 g (0.005 M) of 3,4-dichlorophenylisocyanate **7 i**. Yield 2.45 g (85 %). M.p.= 240–241 °C. Anal. Calc. for $C_{32}H_{28}Cl_3N_3O$. %: Cl 18.5; N 7.28. Found, %: Cl 18.3; N 7.35. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.31 (d, 6H, $CH(CH_3)_2$), 1.89 (m, 2H, CH_2), 2.04 (m, 2H, CH_2), 2.49 (m, 2H, CH_2), 3.02 (m, 1H, $CH(CH_3)_2$), 3.95 (m, 2H, CH_2), 7.23 (s, 1H, NH), 6.90–7.43 (m, 3H, C_6H_3), 7.40 and 7.47 (d-d, 4H, C_6H_4 , $J=8.1$ Hz), 7.59 and 7.66 (d-d, 4H, C_6H_4 , $J=8.6$ Hz), 7.92 (s, 1H, 3-CH). Log P = 9.98 ± 1.18 .

Antitumor activity *in vitro* against PC-3 prostate cancer cells was studied in National Cancer Institute of Health USA, according to Development Therapeutic Program by standard procedure [16]. For pharmacological screening compounds **8 b,d** were picked, which contain electron-donor substituents in meta position of heterocyclic system, according to the results of molecular modeling [17].

Identification of antitumor activity was conducted with highly sensitive fluorimetry method by fluorescence intensity

(colorant – sulphorodamin B) after 48 hours of cells interaction with tested compound *in vitro*, which based on determination of tumor cell growth percentage (PG) under influence of tested compound. The result was expressed in percentage of cancer cell growth to control – 5-fluorouracil.

Results and discussion. The results obtained showed, that compounds 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[*cd*] azulene-2-carboxylic acid (3-methoxyphenyl)-amide **8 b** and 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[*cd*] azulene-2-carboxylic acid (3-methylphenyl)-amide **8 d** demonstrate the ability to suppress PC-3 prostate cancer cells growth in concentration of 10⁻⁵ M.

These compounds were more effective in suppressing of cancer cells growth compared to control – 5-fluorouracil, exactly: 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[*cd*] azulene-2-carboxylic acid (3-methoxyphenyl)-amide **8 b** was by 3,93 % and 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[*cd*] azulene-2-carboxylic acid (3-methylphenyl)-amide **8 d** – by 52,32 % more effective than 5-fluorouracil.

Therefore, it can be concluded, that 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[*cd*] azulene-2 carboxylic acid arylamides inhibit growth of PC-3 prostate cancer cells more effective compared with standard – 5-fluorouracil under experimental condition *in vitro*. The data obtained allow to consider these biologically active compounds as basis for creation of new, effective antitumor agents for prostate cancer treatment.

Conclusion

1. New derivatives of 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[*cd*] azulene-2-carboxylic acid arylamides were synthesized by the reaction of 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[*cd*] azulene with the corresponding isocyanate at 69–85 % yield.
2. 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[*cd*] azulene-2-carboxylic acid arylamides show antitumor activity against PC-3 prostate cancer cells *in vitro*. The compound **8 d** in concentration of 10⁻⁵ M exceeds an antitumor activity of 5-fluorouracil against PC-3 prostate cancer cells by 52.32 %.

1. Каприн А. Д., Подшивалов А. В. Современные аспекты диагностики рака простаты. *Андрология и генитальная хирургия*. Т. 3, № 1. С. 39–47
2. Брызгунова О. Е., Власов В. В., Лактионов П. П. Современные методы диагностики рака предстательной железы. *Биомедицинская химия*. 2007. Т. 53, Вып. 2. С. 128–139.
3. Переверзев А. С. Рак предстательной железы: где мы сейчас находимся? *Новости медицины и фармации*. 2009. № 3–4 (269–270). URL: http://www.mif-ua.com/archive/article_print/7807 (Дата: 2009.03.31).
4. New drugs in prostate cancer. Sangjun Yoo, Se Young Choi, Dalsan You, Choung-Soo Kim. *Prostate Int*. 2016. V. 4. P. 37–42.
5. Скринінг раку передміхурової залози. Е. О. Стаховський, З. П. Федоренко, Ю. В. Вітрук та ін. *Онкоурологія*. 2016. № 1 (21). С. 50–53.
6. Патент на корисну модель № 117545 Україна, МПК (2017.01) C07D 487/00, A61P 35/00. 1-Феніл-4-арил-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазаціклопента-[*cd*]азулені, що мають протипухлинну активність. Демченко С. А., Колесніков О. В., Демченко А. М., Бобкова Л. С. № у 2017 01123; Заявл. 07.02.2017; Опубл. 26.06.2017, Бюл. № 12.
7. Патент на корисну модель № 118189 Україна, МПК (2017.01) C07D 417/00. 1-(2-Ізопропіл-5-метилфеноксиметил)-3R-4-арил-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазаціклопента[*cd*]азулені, що мають протипухлинну активність. Демченко С. А., Дудник А. Є., Бухтіарова Т. А., Демченко А. М., Бобкова Л. С. № у 2017 02036; Заявл. 02.03.2017; Опубл. 25.07.2017, Бюл. № 14.
8. Патент на винахід № 120182 Україна, МПК (2006) C07D 487/04 (2006.01), C07D 255/04 (2006.01), C07D 249/16 (2006.01), A 61K 31/33 (2006.01), A 61K 31/423 (2006.01). Застосування 4-арил-1-феноксиметил-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазаціклопента[*cd*]азуленів як сполук, що проявляють протипухлинну активність. Демченко С. А., Волощук Д. М., Демченко А. М., Бобкова Л. С. № а 2017 03602; Заявл. 13.04.2017; Опубл. 25.10.2019, Бюл. № 20/2019.
9. Патент на корисну модель № 121779 Україна, МПК (2006) C07D 487/00, A 61P 35/00. 1-(2¹-Метоксифеніл)амінометил-4-феніл-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триаза-циклопента[*cd*]

- азулен, що має протипухлинну активність. Демченко С. А., Бобкова Л. С., Бухтіарова Т. А., Демченко А. М. № 2017 07644; Заявл. 19.07.2017; Опубл. 11.12.2017, Бюл. № 23.
10. Патент на винахід №115750 Україна, МПК (2006): C07D 487/06 (2006.01), A61K 31/343 (2006.01), A61P 35/00, C07C 13/52 (2006.01). 1-Феніл-4-арил-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазаціклопента[сd]азулені, що мають протипухлинну активність. Демченко С. А., Колесніков О. В., Демченко А. М., Бобкова Л. С. № 2017 01124; Заявл. 07.02.2017; Опубл. 11.12.2017, Бюл. № 23.
 11. Патент на корисну модель № 135600 Україна, МПК (2006) C07D 487/00, A61P 35/00, A61K 31/00.//3-R-феніламіди 1-(4¹-ізопропілфеніл)-4-(4²-хлорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,4а-діазаціклопента[с,d]азулен-2-карбонової кислоти, що мають протипухлинну активність щодо клітин РС-3 раку простати. Демченко С. А., Федченкова Ю. А., Суховєєв В. В., Демченко А. М. № 2019 00533; Заявл. 23.01.2019; Опубл. 10.07.2019, Бюл. № 13/2019.
 12. Ацетати лактамов. VII. Исследование алкилирования N-метиллактамов и лактимных эфиров диметилсульфатом. В. Г. Граник, А. М. Жидкова, Н. С. Курятов и др. ХГС. 1973. № 11. С. 1532–1535.
 13. *You Reitung*. Синтез хлоргидрата α-аминоацетофенона и его пара-замещенных производных. *Хуисюе шици*. *Chem. Reagents*. 1986. V. 8, № 5. – P. 302–325. Цит. по: РЖХимия. 1987. 13Ж182.
 14. Cyclization of lactimide ketones to imidazo[1,2-a]azacycloalkanes with hypoglycemic activity. G. P. Claxton, J. M. Grisar, J. Martin, N. L. Wiech. *J. Med. Chem.* 1974. V. 17, № 3. P. 364–7.
 15. *Kovtunen V. A., Nazarenko K. G., Demchenko A. M.* The Derivatives of the 2a,4a-Diazacyclopenta[с,d]azulene. *Tetrahedron*. 1996. V. 52, № 29. P. 9835–9840.
 16. *Teicher B. A., Andrews P. A.* Anticancer drug development guide: preclinical screening, clinical. *Medical*. 2004. V. 1. 450 p.
 17. Design, synthesis and biological evaluation of 5-amino-4-(1H-benzoimidazol-2-yl)-phenyl-1,2-dihydro-pyrrol-3-ones as inhibitors of protein kinase FGFR1. A. A. Gryschenko, S. S. Tarnavskiy, K. V. Levchenko et al. *Bioorganic Medicinal Chemistry*. 2016. V. 24. P. 2053–2059.

S. A. Demchenko, Yu. A. Fedchenkova, T. A. Bukhtiarova, L. S. Bobkova, V. V. Sukhoveev, A. M. Demchenko

Synthesis and anticancer activity of 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[сd]azulene-2-carboxylic acid arylamides against PC-3 prostate cancer cells

Pharmacotherapy of prostate cancer is an important part in combating oncologic diseases. This is very relevant, because prostate cancer is a cause of 10 % of deaths from all cancerous diseases in males.

The aim of the study – to synthesize novel derivatives of 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[сd]azulene-2-carboxylic acid arylamides and to evaluate their antitumor activity against PC-3 prostate cancer cells.

By reaction of equimolar amounts of 2-methoxy-3,4,5,6-tetrahydro-7H-azepine with α-amino-4-chloroacetophenone chlorohydrate, 3-(4-chlorophenyl)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-imidazo[1,2-a]azepine was synthesized. By alkylation of α-bromo-4-isopropylacetophenone in ethylacetate and following treatment of the obtained intermediary quaternary salt with excess of 5 % NaOH solution, 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[сd] azulene was synthesized. By boiling it with equimolar amounts of corresponding arylisocyanates in dried benzol, an array of 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[сd]azulene-2-carboxylic acid arylamides were synthesized. Structure and purity of all compounds obtained were confirmed by data of MR¹H spectroscopy. Lipophilicity (LogP) of compounds 6 and 8 a-i was calculated with the ACD LogP program.

Antitumor activity of 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[сd]azulene-2-carboxylic acid (3-methylphenyl) and (3-methoxyphenyl)-amides was evaluated at *in vitro* test on prostate cancer PC-3 cell lines. It is indicated, that at concentration of 10⁻⁵ M these compounds exceed 5-fluorouracil as comparison drug in inhibiting PC-3 prostate cancer cells growth by 52.32 % and 3.93 % correspondingly. The data obtained substantiate feasibility of further studies of 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[сd] azulene-2-carboxylic acid arylamides as new, potential antitumor medicines for prostate cancer treatment.

Key words: anticancer activity, 5-fluorouracil, derivatives of 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[сd]azulene-2-carboxylic acid, PC-3 prostate cancer cells

С. А. Демченко, Ю. А. Федченкова, Т. А. Бухтіарова, Л. С. Бобкова, В. В. Суховєєв, А. М. Демченко

Синтез і протипухлинна активність ариламідів 1-(4¹-ізопропілфеніл)-4-(4²-хлорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,4а-діазаціклопента[сd]азулен-2-карбонової кислоти відносно клітин РС-3 раку простати

Фармакотерапія раку простати є важливою складовою в боротьбі з онкологічними захворюваннями. Це дуже актуально, тому що рак простати є причиною 10 % смертей від усіх видів ракових захворювань у чоловіків.

Мета дослідження – синтезувати та вивчити протипухлинну активність ариламідів 1-(4¹-ізопропілфеніл)-4-(4²-хлорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,4а-діазаціклопента[сd]азулен-2-карбонової кислоти порівняно з 5-фторурацилом відносно клітин РС-3 раку простати.

Взаємодією еквімолярних кількостей 2-метокси-3,4,5,6-тетрагідро-7Н-азепіну з хлоргідратом α-аміно-4-хлорацетофенону синтезовано 3-(4-хлорфеніл)-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-імідазо[1,2-а]азепін. Алкилюванням останнього α-бром-4-ізопропілацетофеноном у середовищі етилацетату та подальшою обробкою одержаної проміжної четвертинної солі надлишком 5 % розчину NaOH синтезовано 1-(4¹-ізопропілфеніл)-4-(4²-хлорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,4а-діазаціклопента[сd]азулен. Кип'ятінням останнього з еквімолярними кількостями відповідних арилізоціанатів у сухому бензолі був синтезований ряд ариламідів 1-(4¹-ізопропілфеніл)-4-(4²-хлорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,4а-діазаціклопента[сd]азулен-2-карбонової кислоти. Будову та чистоту всіх отриманих речовин підтверджено даними ЯМР ¹Н спектроскопії. Ліпофільність (LogP) синтезованих сполук була розрахована за допомогою програми ACD LogP.

Оцінено протипухлинну активність амідів (3-метилфеніл)- та (3-метоксифеніл)-1-(4¹-ізопропілфеніл)-4-(4²-хлорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,4а-діазаціклопента[сd]азулен-2-карбонової кислоти в досліді *in vitro* на лініях клітин раку простати РС-3. Показано, що досліджувані речовини в концентрації 10⁻⁵ моль/л перевищують препарат порівняння – 5-фторурацил за гальмуванням росту клітин раку простати РС-3 на 52,32 % та 3,93 % відповідно. Отримані дані обґрунтовують доцільність подальшого вивчення ариламідів 1-(4¹-ізопропілфеніл)-4-(4²-хлорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,4а-діазаціклопента[сd]азулен-2-карбонової кислоти як нових потенційних протипухлинних засобів для лікування раку простати.

Ключові слова: протипухлинна активність, 5-фторурацил, похідні 1-(4¹-ізопропілфеніл)-4-(4²-хлорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,4а-діазаціклопента[сd]азулен-2-карбонової кислоти, клітини РС-3 раку простати

С. А. Демченко, Ю. А. Федченкова, Т. А. Бухтиарова, Л. С. Бобкова, В. В. Суховеев, А. М. Демченко

Синтез и противоопухолевая активность ариламидов 1-(4¹-ізопропілфеніл)-4-(4²-хлорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,4а-діазаціклопента [сd]азулен-2-карбонової кислоти по отношению к клеткам РС-3 рака простати

Фармакотерапія рака простати являється важливою складовою в боротьбі з онкологічними захворюваннями. Это являється очень актуальним, так как рак простати являється причиною 10 % смертей среди всех видов раковых заболеваний у мужчин.

Цель исследования – синтезувати та вивчити протипухлинну активність ариламідів 1-(4¹-ізопропілфеніл)-4-(4²-хлорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,4а-діазаціклопента[сd]азулен-2-карбонової кислоти в порівнянні з 5-фторурацилом по отношению к клеткам РС-3 рака простати.

Взаємодією еквімолярних кількостей 2-метокси-3,4,5,6-тетрагідро-7Н-азепіна з хлоргідратом α-аміно-4-хлорацетофенону синтезовано 3-(4-хлорфеніл)-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-імідазо[1,2-а]азепін. Алкилюванням останнього α-бром-4-ізопропіл-ацетофенону в середовищі етилацетату та подальшою обробкою одержаної проміжної четвертинної солі надлишком 5 % розчину NaOH синтезовано 1-(4¹-ізопропілфеніл)-4-(4²-хлорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,4а-діазаціклопента[сd]азулен. Кип'ятінням останнього з еквімолярними кількостями арилізоціанатів у сухому бензолі був синтезований ряд ариламідів 1-(4¹-ізопропілфеніл)-4-(4²-хлорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,4а-діазаціклопента[сd]азулен-2-карбонової кислоти. Структуру та чистоту всіх отриманих сполук підтверджено даними ЯМР ¹Н спектроскопії. Ліпофільність (LogP) синтезованих сполук була розрахована за допомогою програми ACD LogP.

Вивчено протипухлинну активність амідів (3-метилфеніл)- та (3-метоксифеніл)-1-(4¹-ізопропілфеніл)-4-(4²-хлорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,4а-діазаціклопента[сd]азулен-2-карбонової кислоти в досліді *in vitro* на лініях клітин раку простати РС-3. Показано, що досліджувані сполуки в концентрації 10⁻⁵ моль/л перевищують препарат порівняння – 5-фторурацил за гальмуванням росту клітин раку простати РС-3 на 52,32 % та 3,93 % відповідно. Отримані дані обґрунтовують доцільність подальшого вивчення ариламідів 1-(4¹-ізопропілфеніл)-4-(4²-хлорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,4а-діазаціклопента[сd]азулен-2-карбонової кислоти в якості нових потенційних протипухлинних засобів для лікування раку простати.

Ключевые слова: протипухлинна активність, 5-фторурацил, похідні 1-(4¹-ізопропілфеніл)-4-(4²-хлорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,4а-діазаціклопента[сd]азулен-2-карбонової кислоти, клітини РС-3 раку простати

Надійшла: 5 вересня 2019 р.

Прийнята до друку: 16 жовтня 2019 р.

Контактна особа: Демченко С. А., ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМНУ», буд. 14., вул. Антона Цедіка, м. Київ, 03157. Тел.: + 38 0 44 456 42 56.

І. Г. Капелька, С. Ю. Штриголь

Скринінгове дослідження фригопротекторних властивостей нестероїдних протизапальних препаратів за гострого загального охолодження

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: холодова травма, гіпотермія, нестероїдні протизапальні препарати

Вплив холоду на організм людини може призводити до тяжких травм – переохолодження, замерзання, відморожень. В Україні холодові травми (ХТ) є досить частим явищем. Вони виникають частіше в зимовий час, коли кількість постраждалих сягає понад 12 000 осіб. ХТ спостерігається переважно в молодих осіб працездатного віку, супроводжується великим відсотком інвалідизації та матеріальних витрат на лікування потерпілих. Більшій частині постраждалих необхідне стаціонарне лікування, смертність перевищує 10 %. Середня тривалість лікування пацієнтів з ХТ у 2 рази вища за тривалість лікування пацієнтів з опіками. Холодові ураження виникають внаслідок порушень мікроциркуляції, особливо на тлі судинних захворювань кінцівок, втоми або стресової ситуації, алкогольного сп'яніння. Особливо небезпечною ХТ є в умовах війни. Навіть у сучасних арміях ХТ може стати причиною до 25 % санітарних втрат [1–3].

Вплив низької температури ініціює складний механізм адаптації організму, що спрямований на зниження втрат тепла. Зокрема, спостерігається збільшення частоти серцевих скорочень, підвищення тиску та, як результат, централізація кровообігу. Це відбувається переважно за рахунок активації симпатoadреналової системи, відповідальної за розвиток стрес-реакції. У разі падіння температури тіла нижче ніж 10 °С спостерігається парадоксальна реакція Льюїса, що полягає в почерговій зміні

актив вазоконстрикції та вазодилатації тривалістю 5–10 хв і, вочевидь, спрямована на протидію прогресуючій ішемії периферичних тканин. Значну роль у патогенезі ХТ відіграють продукти метаболізму арахідонової кислоти, а саме: простагландин $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) і тромбоксан A_2 (TXA_2). Вони особливо активно виділяються після завершення реакції Льюїса, посилюючи вазоконстрикцію, агрегацію тромбоцитів та відповідно ішемію, а також беруть участь у розвитку запальної реакції. Крім того, збільшується утворення простагліцину (PGI_2), який є функціональним антагоністом $PGF_{2\alpha}$ і TXA_2 і дещо сповільнює ішемізацію тканини [4–6]. З урахуванням механізму розвитку ХТ можна вважати перспективними фригопротекторами нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП), які пригнічують синтез простагландинів. Відомо, що використання ацетилсаліцилової кислоти (АСК) та ібупрофену покращують прогноз лікування ХТ [5]. Доведено наявність фригопротекторних властивостей у целекоксиду та мелоксикаму [1, 7]. Проте широкі порівняльні дослідження фригопротекторної дії НПЗП за єдиною методикою не проводилися, що залишає відкритим питання вибору найактивніших препаратів. Невідомо, чи має вирішальне значення селективність НПЗП щодо циклооксигенази (ЦОГ). До того ж наявні дані щодо дозозалежності фригопротекторного ефекту НПЗП, зокрема, АСК [3, 8–11], що також потребує вивчення.

Мета дослідження – порівняти виразність фригопротекторного ефекту низки НПЗП з різною селективністю щодо ЦОГ на моделі гострого загального охолодження (ГЗО).

Матеріали та методи. Роботу виконано на білих мишах обох статей масою

20–24 г (94 особини) протягом одного дня з 12.00 до 18.00 год.

Тварин утримували на стандартному харчовому раціоні віварію за вільного доступу до води, постійної вологості та температурного режиму + 22–23 °С. Протокол дослідження узгоджується з біоетичними нормами та відповідає «Загальним етичним принципам експериментів на тваринах» (Україна, 2001 р.), а також не суперечить положенням Європейської конвенції щодо експериментів на тваринах.

Для моделювання ГЗО мишей вміщували до індивідуальних пластикових кліток об'ємом 500 см³ без обмеження доступу до повітря та розташовували в морозильній камері «Nord Inter-300» з прозорою кришкою за температури –18 °С. Інтегральним показником фригопротекторної дії обрано час життя тварин [12].

У дослідженні використовували такі препарати: неселективні інгібітори ЦОГ – АСК (Аспірин, таблетки, «Bayер», Німеччина), ібупрофен (Бруфен, порошок, «Abbott», США), мефенамінова кислота (Мефенамінова кислота-Дарниця, таблетки, «Дарниця», Україна), диклофенак натрію (Вольтарен, таблетки, «Novartis», Швейцарія); помірно селективний інгібітор ЦОГ – мелоксикам (Моваліс, таблетки, «Boehringer Ingelheim», Німеччина); високоселективний інгібітор ЦОГ – целекоксиб (Целебрекс, таблетки, «Pfizer», США). Таблетки та порошок ібупрофену подрібнювали в ступці та суспендували у воді з додаванням твіну-80. Суспензії вводили крізь зонд внутрішньошлунково (в/ш) в об'ємі 10 мл/кг маси тіла (по 0,20–0,24 мл на тварину) у профілактичному режимі за 30 хв до ХТ, як рекомендується в дослідженні фригопротекторних властивостей [9]. Тварин випадковим чином розділили на 12 груп, у складі кожної з яких була однакова кількість самців і самок. 1 група – контрольна патологія (ХТ), n = 6 (вводили воду, 10 мл/кг); 2 група – АСК, 25 мг/кг + ХТ (n = 8); 3 група – целекоксиб, 37 мг/кг + ХТ (n = 8); 4 група – целекоксиб, 74 мг/кг + ХТ (n = 8); 5 група – ібупрофен, 100 мг/кг + ХТ (n = 8); 6 група –

ібупрофен, 150 мг/кг + ХТ (n = 8); 7 група – мелоксикам, 1,4 мг/кг + ХТ (n = 8); 8 група – мелоксикам, 2,8 мг/кг + ХТ (n = 8); 9 група – мефенамінова кислота, 46 мг/кг + ХТ (n = 8); 10 група – мефенамінова кислота, 92 мг/кг + ХТ (n = 8); 11 група – диклофенак натрію, 9 мг/кг + ХТ (n = 8); 12 група – диклофенак натрію, 18 мг/кг + ХТ (n = 8). Дози НПЗП обрано на підставі даних літератури. АСК досліджують як фригопротектор у широкому діапазоні доз – від 15 мг/кг до 250 мг/кг [3, 8, 11]. Проте доза 250 мг/кг виявилась надто високою (токсичною) та неефективною; досить ефективними є дози 25–50 мг/кг [3, 8–10]. З урахуванням цих даних АСК вводили в дозі 25 мг/кг. Інші препарати досліджено в 2 дозах, які відрізняються в 1,5–2,0 разу. Їх розраховували, виходячи з середніх терапевтичних доз людини з використанням рекомендованих FDA коефіцієнтів перерахунку [13].

Для статистичної обробки використовували Т-критерій Стьюдента та дисперсійний аналіз ANOVA у разі нормального розподілу, за його відсутності – U-критерій Манна-Вітні та критерій Краскела-Уолліса. Аналіз проводили за допомогою програми Statistica 13.5. Відмінності вважали статистично значущими в разі $p < 0,05$ [14].

Результати та їх обговорення. Результати дослідження наведено в таблиці.

З поміж неселективних інгібіторів ЦОГ вигідно вирізняються ібупрофен і диклофенак натрію, які статистично значуще збільшили тривалість життя тварин. Ефект ібупрофену виявився помірним за силою та незалежним від дози (100 мг/кг – приріст тривалості життя 34,9 %, 150 мг/кг – 29,8 %). Диклофенак натрію в меншій дозі 9 мг/кг чинив помірну фригопротекторну дію, тенденційно збільшуючи час життя на 27,2 %, збільшення дози до 14 мг/кг супроводжувалось виразним зростанням ефекту (54,5 %, $p < 0,01$ щодо контрольної патології). Ефект мефенамінової кислоти в меншій дозі 46 мг/кг не виявлявся, у дворазово збільшеній дозі (92 мг/кг) був нестабільним в окремих тварин і, як наслідок,

Час життя мишей за умов гострої холодової травми

Препарат, кількість тварин	Доза, мг/кг	Час, хв	Відмінність з показником контрольної патології, %
Контрольна патологія (n = 6)		53,0 ± 5,3	–
<i>Неселективні інгібітори ЦОГ</i>			
Ацетилсаліцилова кислота (n = 8)	25	60,6 ± 7,3	+ 14,3
Ібупрофен (n = 8)	100	71,5 ± 6,1*	+ 34,9
	150	68,8 ± 2,5*	+ 29,8
Мефенамінова кислота (n = 8)	46	53,3 ± 4,3	+ 0,6
	92	68,3 ± 6,3	+ 28,9
Диклофенак натрію (n = 8)	9	67,4 ± 5,9	+ 27,2
	14	81,9 ± 3,8**/&	+ 54,5
<i>Помірно селективний інгібітор ЦОГ-2</i>			
Мелоксикам (n = 8)	1,4	60,3 ± 7,2	+ 13,8
	2,8	67,5 ± 3,5*	+ 27,4
<i>Високоселективний інгібітор ЦОГ-2</i>			
Целекоксиб (n = 8)	37	55,4 ± 1,2	+ 4,5
	74	83,1 ± 2,9**/&	+ 56,8

Примітка. Статистично значущі відмінності: *з контрольною патологією ($p < 0,05$), **з контрольною патологією ($p < 0,01$), &з показником групи АСК ($p < 0,05$).

хоча й становив у середньому 28,9 %, за рахунок значної дисперсії не сягнув достовірного рівня. АСК виявила слабку фригопротекторну активність, тенденційно збільшуючи час життя мишей на 14,3 %.

Мелоксикам, який виявляє помірну селективність щодо ЦОГ, у меншій дозі 1,4 мг/кг незначно й недостовірно збільшував тривалість життя на 13,8 %, а в дозі 2,8 мг/кг статистично значуще підвищував її на 27,4 %.

Дозозалежним виявився фригопротекторний ефект селективного інгібітора ЦОГ-2 целекоксибу. У меншій дозі 37 мг/кг дія майже не виявлялась (4,5 %), у вдвічі вищій (74 мг/кг) – була максимально виразною в цьому дослідженні: час життя мишей збільшувався на 56,8 % ($p < 0,01$ проти показника контрольної патології).

Отже, за результатами скринінгу низки НПЗП на фригопротекторну активність на моделі ГЗО у мишей

визначено два препарати-лідери з різним профілем селективності щодо ЦОГ: целекоксиб (74 мг/кг) і диклофенак натрію (14 мг/кг). Вони збільшили час життя тварин з експериментальною гострою ХТ більше ніж на 50 %, що достовірно перевищує ефект АСК (25 мг/кг). Ці два препарати можна вважати перспективними для подальших поглиблених досліджень фригопротекторної дії.

Висновки

1. Фригопротекторні властивості нестероїдних протизапальних препаратів за гострого загального охолодження суттєво відрізняються й не виявляють суворої залежності від селективності щодо ізоформ ЦОГ.
2. Найбільший фригопротекторний ефект у мишей виявлено в целекоксибу (74 мг/кг внутрішньошлунково) та диклофенаку натрію (14 мг/кг).

1. Коптяева Р. Г. Высокоселективный ингибитор циклооксигеназы-2 при отморожении в условиях острой алкогольной интоксикации. *Экология человека*. 2005. № 12. С. 54–57.
2. Горелик И. Э. Профилактика некроза при отморожениях конечностей в дореактивном и раннем реактивном периодах: автореф. дис. на соискание учен. степени канд. мед. наук: спец. 14.01.17 «Хирургия», 14.03.03 «Патологическая физиология»; Сибирский гос. мед. университет Росздрава. Кемерово, 2010. 23 с.

3. Бондарев Є. В., Штриголь С. Ю. Вплив препаратів глюкозаміну та ацетилсаліцилової кислоти на артеріальний тиск і показники ЕКГ за умов експериментальної холодової травми. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2017. № 6 (56). С. 31–36.
4. Imray C., Grieve A., Dhillon S. Cold damage to the extremities: frostbite and non-freezing cold injuries. *Postgraduate medical journal*. 2009. № 85. P. 481–488.
5. Wilderness Medical Society Practice Guidelines for the Prevention and Treatment of Frostbite: 2014 Update. S. E. McIntosh, M. Opacic, L. Freer et al. *Wilderness & Environmental Medicine*. 2014. № 2 (22). P. 156–166.
6. Sachs C., Lehnhardt M., Daigeler A. The Triaging and Treatment of Cold-Induced Injuries. *Deutsches Arzteblatt International*. 2015. № 112. P. 741–748.
7. Патент № 2270013, RU, МПК А61К 31/5415 (2006.01), А61Р 31/00 (2006.01). Профілактичне і лічєбне средство при соєтанной алєольно-холодовой травме. Коптяева Р. Г., Назаренко Н. А., Леонтьев В. Я., Сидоров П. И. Патентообладатель Северный государственный медицинский университет. № 2004107203/15; заявл. 10.03.04; опубл. 20.02.06, Бюл. № 5.
8. Бондарев Є. В. Дослідження глюкозаміну гідрохлориду як засобу фригопротекторної дії при поєднаній алєольно-холодовій травмі. *Фармацевтичний часопис*. 2012. № 3. С. 140–142.
9. Бондарев Е. В. Влияние глюкозамина гидрохлорида и ацетилсалициловой кислоты на показатели углеводного обмена при острой холодовой травме у крыс. *Оңтүстік Қазақстан мемлекеттік фармацевтика академиясының хабаршысы*. 2015. № 1 (70). С. 2–7.
10. Бондарев Е. В., Штриголь С. Ю. Антигипертермические и антиоксидантные свойства глюкозамина гидрохлорида и ацетилсалициловой кислоты в условиях острой холодовой травмы. *Вестник фармации*. 2016. № 3 (73). С. 92–97.
11. Назаренко Н. А. Эффективность нестероидных противовоспалительных средств для профилактики и лечения холодовой травмы: автореф. дис. на соискание учен. степени докт. мед. наук: спец. 05.26.02 «Безопасность в чрезвычайных ситуациях», 14.00.25 «Фармакология, клиническая фармакология»; Северный гос. мед. университет МЗ РФ. Архангельск, 2001. 38 с.
12. Холодова травма: доєлінічне вивчення лікарських препаратів з фригопротекторними влаєностями: методичні рекомендації. Є. В. Бондарев, С. Ю. Штриголь, С. М. Дроєовоз [та ін.]. Харків, 2018. 35 с.
13. Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. URL: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/estimating-maximum-safe-starting-dose-initial-clinical-trials-therapeutics-adult-healthy-volunteers.html>.
14. Серєенко В. И., Бондарева И. Б., Маевский Е. И. Методические рекомендации по статистической обработке результатов доклинических исследований лекарственных средств. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая; под ред. А. Н. Миронова. Москва : Гриф и К, 2012. С. 890–940.

І. Г. Капелька, С. Ю. Штриголь

Скринінгове дослідження фригопротекторних влаєностей нестероїдних протизапальних препаратів за гострого загального охолодження

В Україні холодові травми (ХТ) є досить частим явищем. Вони виникають частіше в зимовий час, коли кількість постраждалих сягає понад 12 000 осіб. ХТ спостерігається переважно в молодих осіб праєездатного віку, супроводжується великим відсотком інвалідизації та значними матеріальними витратами на лікування потерпілих. Більшій частині постраждалих необхідне стаціонарне лікування, смертність перевищує 10 %. Особливо небезпечною ХТ є в умовах війни, оскільки може спричинити до 25 % санітарних втрат. Значну роль у патогенезі ХТ відіграють простаєиклін, простаєландин $F_{2\alpha}$ і тромбоксан A_2 , що відповідають за розвиток судинних реакцій. З урахуванням механізму розвитку ХТ можна вважати перспективними фригопротекторами нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП), які приєнчують синтез простаєландинів.

Мета дослідження – порівняти виразність фригопротекторного ефекту низки НПЗП з різною селективністю щодо ЦОГ на моделі гострого загального охолодження (ГЗО).

Роботу виконано на білих мишах обох статей масою 20–24 г. ГЗО моделювали за температури – 18 °С. Визначали інтегральний показник фригопротекторної дії – час життя тварин. Використовували неселективні інєібітори ЦОГ – аєетилсалієилову кислоту (АСК) (Аспірин, таблетки, «Bayer», Німеччина), ібупрофен (Бруфен, порошок, «Abbott», США), мефенамінову кислоту (Мефенамінова кислота-Дарниця, таблетки, «Дарниця», Україна), диклофенає натрію (Вольтарен, таблетки, «Novartis», Швейцарія); помірно селективний інєібітор ЦОГ – мелоксікам (Моваліс, таблетки, «Boehringer Ingelheim», Німеччина); високоселективний інєібітор ЦОГ – єелекоєсиб (Єелебрекс, таблетки, «Pfizer», США), які вводили в різніє дозах у шлунок за 30 хв до початку ГЗО.

Визначено два препарати-лідери з різним профілем селективності щодо ЦОГ: єелекоєсиб (74 мг/кг) і диклофенає натрію (14 мг/кг). Вони збільшили час життя тварин більше ніж на 50 %, що достовірно

перевищує ефект АСК (25 мг/кг). Ці два препарати можна вважати перспективними для подальших поглиблених досліджень фригопротекторної дії.

Отже, фригопротекторні властивості НПЗП за ГЗО суттєво відрізняються та не виявляють суворої залежності від селективності щодо ізоформ ЦОГ.

Ключові слова: холодова травма, гіпотермія, нестероїдні протизапальні препарати

И. Г. Капелька, С. Ю. Штриголь

Скрининговое исследование фригопротекторных свойств нестероидных противовоспалительных препаратов при остром общем охлаждении

В Украине холодовые травмы (ХТ) встречаются довольно часто. Они возникают чаще в зимний период, когда количество пострадавших достигает более 12 000 человек. ХТ наблюдаются в основном у молодых людей работоспособного возраста, сопровождаются высоким процентом инвалидизации и значительными материальными затратами на лечение потерпевших. Большею части пострадавших необходимо стационарное лечение, смертность превышает 10 %. Особенно опасны ХТ в условиях войны, поскольку могут стать причиной до 25 % санитарных потерь. Значительную роль в патогенезе ХТ играют простаглицлины, простаглицлидин $F_{2\alpha}$ и тромбоксан A_2 , которые отвечают за развитие сосудистых реакций. С учетом механизма развития ХТ можно считать перспективными фригопротекторами нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), которые угнетают синтез простаглицлинов.

Цель исследования – сравнить силу фригопротекторного эффекта ряда НПВП с разной селективностью относительно ЦОГ на модели острого охлаждения (ООО).

Работа выполнена на белых мышах обоих полов массой 20–24 г. ООО моделировали при температуре –18 °С. Определяли интегральный показатель фригопротекторного действия – время жизни животных.

Использовали неселективные ингибиторы ЦОГ – ацетилсалициловую кислоту (АСК) (Аспирин, таблетки, «Вауер», Германия), ибупрофен (Бруфен, порошок, «Abbott», США), мекфенаминовую кислоту (Мекфенаминовая кислота-Дарница, таблетки, «Дарница», Украина), диклофенак натрия (Вольтарен, таблетки, «Novartis», Швейцария); умеренно селективный ингибитор ЦОГ – мелоксикам (Мовалис, таблетки, «Boehringer Ingelheim», Германия); высокоселективный ингибитор ЦОГ – целекоксиб (Целебрекс, таблетки, «Pfizer», США), которые вводили в желудок за 30 мин до начала ООО в разных дозах.

Определены два препарата-лидеры с различным профилем селективности относительно ЦОГ: целекоксиб (74 мг/кг) и диклофенак натрия (14 мг/кг). Они увеличили время жизни животных с экспериментальной ХТ более чем на 50 %, что достоверно превышает эффект АСК (25 мг/кг). Эти два препарата можно считать перспективными для дальнейших углубленных исследований фригопротекторного действия.

Таким образом, фригопротекторные свойства НПВП в условиях ООО существенно различаются и не демонстрируют строгой зависимости от селективности относительно изоформ ЦОГ.

Ключевые слова: холодовая травма, гипотермия, нестероидные противовоспалительные препараты

I. G. Kapelka, S. Yu. Shtrygol'

The comparative research of frigoprotective properties of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the model of acute general cooling

Cold traumas (CT) are quite frequent among the population of Ukraine. Its' occurrence grows up in winter, when number of injured reaches more than 12 000 people. CT is commonly observed in young people of working age, causes high frequency of disability and requires high costs for treatment. Most of the injured need hospital treatment, mortality is excess 10 % of cases. In conditions of war CT is especially dangerous. It can cause up to 25 % of sanitary losses even in modern armies.

Research as to the pathophysiology of frostbite has revealed notable similarities with the inflammatory processes seen in burn injuries and ischaemia/reperfusion injury. Evidence for the role of thromboxanes and prostaglandins has resulted in a more active approach to the medical treatment of frostbite.

Considering the role of eicosanoids in the development of cold trauma we can assume positive influence of NSAIDs for such pathology.

The aim of the work is to compare the power of frigoprotective effect of NSAIDs with different selectivity to COX using the model of acute general cooling (AGC).

The experiment was carried out using healthy white mice weighing 20–24 g during single day from 12.00 till 18.00. Mice were put into individual 500 cm³ plastic cages with free access to air. Cages were situated inside the freezer «Nord Inter-300» with transparent top at a temperature of –18 °C. An integral index of frigoprotective effect was chosen duration of life.

Some NSAIDs were used in the experiment: nonselective inhibitors of COX – acetylsalicylic acid (Aspirin, tablets, «Bayer», Germany), ibuprofen (Brufen, powder, «Abbott», USA), mefenamic acid (Mefenamic acid-Darnitsa, tablets, «Darnitsa», Ukraine), diclofenac sodium (Voltaren, tablets, «Novartis», Switzer-

land); moderately selective inhibitor of COX – meloxicam (Movalis, tablets, «Boehringer Ingelheim», Germany); highly selective inhibitor of COX – celecoxib (Celebrex, tablets, «Pfizer», USA).

The results of the present study indicated two NSAIDs with significant frigoprotective effect: celecoxib (74 mg/kg) and diclofenac sodium (14 mg/kg). They increased duration of life of the experimental animals under AGC by more than 50 %. That is reliably higher than effect of Aspirin (25 mg/kg). These two drugs were chosen as a perspective for future in-depth studies of frigoprotective activity.

As a conclusion we can say that frigoprotective properties of NSAIDs are highly different and don't demonstrate strict dependency with level of selectivity to COX; the highest frigoprotective effect were demonstrated by celecoxib (74 mg/kg intragastrically) and diclofenac sodium (14 mg/kg).

Key words: cold trauma, hypothermia, NSAIDs.

Надійшла: 27 вересня 2019 р.

Прийнята до друку: 16 жовтня 2019 р.

Контактна особа: Штриголь Сергій Юрійович, доктор медичних наук, професор, кафедра фармакології, Національний фармацевтичний університет МОЗУ, буд. 12, вул. Куликовська, м. Харків. Тел.: + 38 057 706 30 69. Електронна пошта: farmacol@nuph.edu.ua

Y. N. Novodvorskyi¹, O. Y. Bahlai²,
I. V. Komarov¹, A. M. Demchenko^{2,3}

Synthesis and antioxidant activity of derivatives of 8*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*][1,2,4]triazin-7-ones

¹Taras Shevchenko National University of Kyiv

²Institute of Pharmacology and Toxicology of National Academy of Medical Sciences, Kyiv

³Nizhyn Mykola Gogol State University

Key words: antioxidant activity, ascorbic acid, ionol, derivatives of 8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-ones

Many severe diseases, such as atherosclerosis, hypertension, Alzheimer's disease, diabetes, infertility etc are connected with an oxidative stress development and formation of reactive forms of oxygen in excess amounts, which include free radicals and peroxides. Formation of such substrates result in damage of many cell components, such as lipids, DNA and proteins [1].

As a means of pathogenetic therapy of such diseases are frequently used an antioxidants. Despite rather large quantity of medicines with antioxidant properties, search of new compounds, which would meet safety and efficiency requirements is still relevant.

Previously it has been shown [2] that three derivatives of 8-(4¹-hydroxy-3*R*-benzylidenamino)-6-tert-butyl-8*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*][1,2,4]triazine-7-ones exhibit high antioxidant properties. As the comparison compounds well-known antioxidants ionol and ascorbic acid were selected [3,4].

The aim of the study – to synthesize new derivatives of 8-(4¹-hydroxy-3*R*-benzylidenamino)-6-tert-butyl-8*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*][1,2,4]triazine-7-ones and to evaluate their antioxidant properties in screening test *in vitro* as compared with ionol and ascorbic acid.

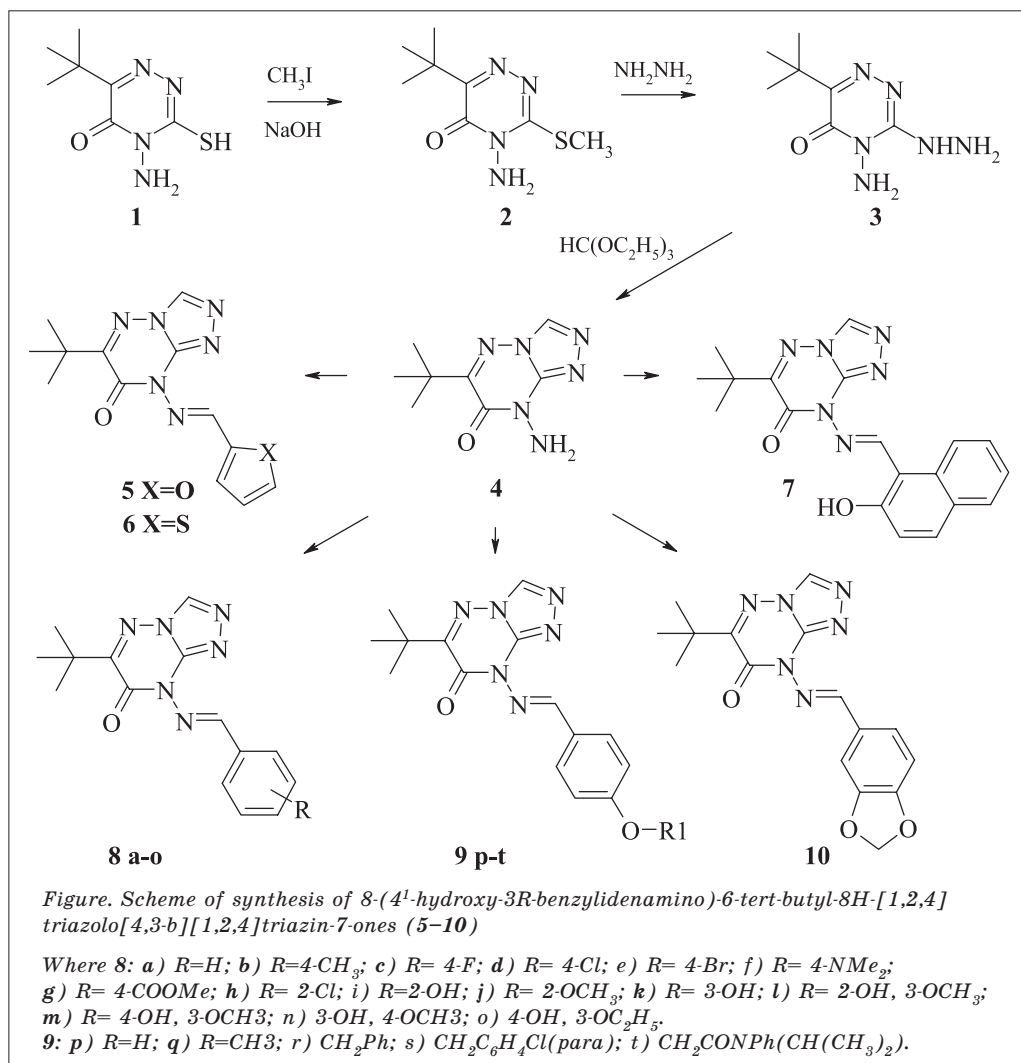
Materials and methods. Test compounds were synthesized in Taras Shevchenko National University of Kyiv (Figure). Antioxidant activity was studied in department of medical chemistry

of SI «Institute of Pharmacology and Toxicology NAMS of Ukraine».

4-Amino-6-tert-butyl-3-methylthio-4*H*-[1,2,4]triazin-5-one **1** was obtained by alkylating 4-Amino-6-tert-butyl-3-thio-4*H*-[1,2,4]triazin-5-one with iodomethane in alkaline conditions using the method [5]. 4-Amino-6-tert-butyl-3-hydrazino-4*H*-[1,2,4]triazin-5-one **2** was obtained by boiling of 3-methylthio-derivative **1** with excess of hydrazinhydrate in propanol-2 by method [6]. 8-amino-6-tert-butyl-8*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*][1,2,4]triazine-7-*OH* **3** was obtained by boiling of compound **2** with orthoformic ether in ethanol. Substituted 8-benzylidenamino-derivatives **5–10** were synthesized by standard Schiff method of alkali obtainment [7].

¹H-NMR spectra were recorded on the Bruker VXR-360 (Germany), the working frequency of 360.191 MHz, in DMSO-*d*₆ using tetramethyl silane (TMS) as an internal standard. Chemical shifts are reported in ppm units with use of the δ scale. Purity control of novel compounds was conducted by thin-layer chromatography in the system chloroform – methanol 9:1.

Synthesis of 8-amino-6-tert-butyl-8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one 4. To solution of 7.93 g (0.04 M) 4-amino-6-tert-butyl-3-hydrazino-4*H*-[1,2,4]triazin-5-one **3** in 100 ml ethanole 5.93 g (0.04 M) diethoxymethoxyethane and 2 drops of acetic acid were added. The reaction mixture was refluxed for 8 hour. After cooling the solid **4** was filtered, washed with ethanole, then dried on air. Yield 5.24 g (63 %). M.p. = 190–191 °C. Anal. Calc. for C₈H₁₂N₆O. %: N 40.3. Found, %: N 40.0. ¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): Found, %: N 40.0.



C₈H₁₂N₆O. Calc., %: N 40.3. NMR ¹H (δ, ppm, DMSO-d₆): 1.42 (s, 3H, C(CH₃)), 6.56 (s, 2H, NH₂), 8.82 (s, 1H, 3-CH).

Synthesis of 6-tert-butyl-8-[(furan-2-ylmethylene)-amino]-8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one 5. To solution of 2.08 g (0.01 M) 8-amino-6-tert-butyl-8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one 4 and 1.12 g (0.01 M) of thiophene-2 carbaldehyde was added. The reaction mixture was refluxed for 3 hour and evaporated to volume 15 ml. After cooling the solid 5 was filtered, recrystallized from propanol-2. Yield 1.46 g (51 %). M.p. = 216–217 °C. Anal. Calc. for C₁₃H₁₄N₆O₂. %: N 29.3. Found, %: N 29.5. ¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.41 (s, 9H, C(CH₃)₃), 6.77–8.03 (m, 3H, C₄H₃S), 9.05 (s, 1H, CH), 9.27 (s, 1H, CH).

Synthesis of 6-tert-butyl-8-[(thiophen-2-ylmethylene)-amino]-8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one 6 was obtained as compound 5 from 2.08 r (0.01 M) 8-amino-6-tert-butyl-8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one 4 and 1.12 g (0.01 M) of thiophene-2 carbaldehyde. Yield 1.72 g (57 %). M.p. = 217–218 °C. Anal. Calc. for C₁₃H₁₄N₆O₂. %: N 29.3. Found, %: N 29.5. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.40 (s, 9H, C(CH₃)₃), 7.29 (t, 1H, C₄H₃S), 7.88 (d, 3H, C₄H₃S), 7.99 (d, 3H, C₄H₃S), 9.18 (s, 1H, CH), 9.54 (s, 1H, CH).

Synthesis of 6-tert-butyl-8-[(2-hydroxynaphthalen-1-ylmethylene)-amino]-8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one 7 was obtained as compound 5 from 2.08 g (0.01 M) 8-amino-6-tert-butyl-8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]

triazin-7-one **4** and 1.72 g (0.01 M) of 2-hydroxynaphthalene-1 carbaldehyde. Yield 2.35 g (65%). M.p. = 240–241 °C. Anal. Calc. for C₁₉H₁₈N₆O₂. %: N 23.2. Found, %: N 23.4. ¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.50 (s, 9H, C(CH₃)₃), 7.25 (d, 1H, C₁₀H₅), 7.40 (t, 1H, C₁₀H₅), 7.63 (t, 1H, C₁₀H₅), 7.83 (d, 1H, C₁₀H₅), 7.96 (d, 1H, C₁₀H₅), 8.41 (d, 1H, C₁₀H₅), 8.89 (s, 1H, CH), 10.7 (s, 1H, CH), 12.1 (s, 1H, OH).

Synthesis of 6-tert-butyl-8-(benzylideneamino)-8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one 8 a was obtained as compound **5** from 2.08 g (0.01 M) 8-amino-6-tert-butyl-8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one **4** and 1.06 g (0.01 M) of benzaldehyde. Yield 1.81 g (61%). M.p. = 217–218 °C. Anal. Calc. for C₁₅H₁₆N₆O. %: N 28.4. Found, %: N 28.2. ¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.47 (s, 9H, C(CH₃)₃), 7.52–8.00 (m, 5H, C₆H₅), 8.80 (s, 1H, CH), 9.49 (s, 1H, CH).

Synthesis of 6-tert-butyl-8-(4¹-methylbenzylidene)-amino]-8H-[1,2,4] triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one 8 b was obtained as compound **5** from 2.08 g (0.01 M) 8-amino-6-tert-butyl-8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one **4** and 1.20 g (0.01 M) of 4-methylbenzaldehyde. Yield 1.95 g (63%). M.p. = 256–257 °C. Anal. Calc. for C₁₆H₁₈N₆O. %: N 27.1. Found, %: N 26.8. ¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.47 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.47 (s, 3H, CH₃), 7.31 and 7.89 (d-d, 4H, C₆H₄, J=8.0 Hz), 8.62 (s, 1H, CH), 9.46 (s, 1H, CH).

Synthesis of 6-tert-butyl-8-(4¹-fluorobenzylidene)-amino]-8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one 8 c was obtained as compound **5** from 2.08 g (0.01 M) 8-amino-6-tert-butyl-8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one **4** and 1.24 g (0.01 M) of 4-fluorobenzaldehyde. Yield 2.04 g (65%). M.p. = 205–207 °C. Anal. Calc. for C₁₅H₁₅FN₆O. %: N 26.7. Found, %: N 26.4. ¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.47 (s, 9H, C(CH₃)₃), 7.21–8.09 (m, 4H, C₆H₄), 8.64 (s, 1H, CH), 9.56 (s, 1H, CH).

Synthesis of 6-tert-butyl-8-(4¹-chlorobenzylidene)-amino]-8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one 8 d was obtained as compound **5** from 2.08 g

(0.01 M) 8-amino-6-tert-butyl-8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one **4** and 1.41 g (0.01 M) of 4-chlorobenzaldehyde. Yield 2.22 g (67%). M.p. = 255–256 °C. Anal. Calc. for C₁₅H₁₅ClN₆O. %: N 25.4. Found, %: N 25.7. ¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.47 (s, 9H, C(CH₃)₃), 7.51 and 8.04 (d-d, 4H, C₆H₄, J=8.8 Hz), 8.63 (s, 1H, CH), 9.64 (s, 1H, CH).

Synthesis of 6-tert-butyl-8-(4¹-bromobenzylidene)-amino]-8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one 8 e was obtained as compound **5** from 2.08 g (0.01 M) 8-amino-6-tert-butyl-8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one **4** and 1.85 g (0.01 M) of 4-bromobenzaldehyde. Yield 2.81 g (75%). M.p. = > 260 °C. Anal. Calc. for C₁₅H₁₅BrN₆O. %: N 22.4. Found, %: N 22.2. ¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.40 (s, 9H, C(CH₃)₃), 7.81 and 9.92 (d-d, 4H, C₆H₄, J=8.5 Hz), 9.19 (s, 1H, CH), 9.46 (s, 1H, CH).

Synthesis of 6-tert-butyl-8-(4¹-N,N-dimethylaminobenzylidene)-amino]-8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one 8 f was obtained as compound **5** from 2.08 g (0.01 M) 8-amino-6-tert-butyl-8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one **4** and 1.49 g (0.01 M) of 4-N,N-dimethylaminobenzaldehyde. Yield 2.48 g (73%). M.p. = 231–232 °C. Anal. Calc. for C₁₇H₂₁N₇O. %: N 28.9. Found, %: N 28.6. ¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.46 (s, 9H, C(CH₃)₃), 3.12 (s, 9H, N(CH₃)₂), 6.75 and 7.79 (d-d, 4H, C₆H₄, J=8.9 Hz), 8.61 (s, 1H, CH), 9.03 (s, 1H, CH).

Synthesis of 4-[(6-tert-butyl-7-oxo-7H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-8-ylimino)-methyl]-benzoic acid methyl ester 8 g was obtained as compound **5** from 2.08 g (0.01 M) 8-amino-6-tert-butyl-8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one **4** and 1.64 g (0.01 M) of 4-formylbenzoic acid methyl ester. Yield 2.12 g (60%). M.p. = > 260 °C. Anal. Calc. for C₁₇H₁₈N₆O₃. %: N 23.7. Found, %: N 23.6. ¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃), 3.91 (s, 3H, CH₃), 8.11 and 8.15 (d-d, 4H, C₆H₄), 9.22 (s, 1H, CH), 9.64 (s, 1H, CH).

Synthesis of 6-tert-butyl-8-(21-chlorobenzylidene)-amino]-8H-[1,2,4] triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one 8 h

was obtained as compound **5** from 2.08 g (0.01 M) 8-amino-6-tert-butyl-8*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*][1,2,4]triazin-7-one **4** and 1.41 g (0.01 M) of 2-chlorobenzaldehyde. Yield 2.12 g (64 %). M.p. = 201–202 °C. Anal. Calc. for C₁₅H₁₅ClN₆O. %: N 25.4. Found, %: N 25.1. ¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃), 7.52–8.22 (m, 4H, C₆H₄), 9.09 (s, 1H, CH), 10.0 (s, 1H, CH).

*Synthesis of 6-tert-butyl-8-[(2¹-hydroxybenzylidene)-amino]-8*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*][1,2,4]triazin-7-one **8 i*** was obtained as compound **5** from 2.08 g (0.01 M) 8-amino-6-tert-butyl-8*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*][1,2,4]triazin-7-one **4** and 1.22 g (0.01 M) of 2-hydroxybenzaldehyde. Yield 1.72 g (55 %). M.p. = 228–229 °C. Anal. Calc. for C₁₅H₁₆N₆O₂. %: N 26.9. Found, %: N 26.8. ¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.48 (s, 9H, C(CH₃)₃), 6.96 (t, 1H, C₆H₄), 7.00 (d, 1H, C₆H₄), 7.39 (t, 1H, C₆H₄), 7.70 (d, 1H, C₆H₄), 8.66 (s, 1H, CH), 9.87 (s, 1H, CH), 10.8 (s, 1H, OH).

*Synthesis of 6-tert-butyl-8-[(2¹-methoxybenzylidene)-amino]-8*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*][1,2,4]triazin-7-one **8 j*** was obtained as compound **5** from 2.08 g (0.01 M) 8-amino-6-tert-butyl-8*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*][1,2,4]triazin-7-one **4** and 1.36 g (0.01 M) of 2-methoxybenzaldehyde. Yield 1.92 g (59 %). M.p. = 181–182 °C. Anal. Calc. for C₁₆H₁₈N₆O₂. %: N 25.8. Found, %: N 25.6. ¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.41 (s, 9H, C(CH₃)₃), 3.92 (s, 3H, OCH₃), 7.14 (t, 1H, C₆H₄), 7.24 (d, 1H, C₆H₄), 7.64 (t, 1H, C₆H₄), 8.07 (d, 1H, C₆H₄), 9.18 (s, 1H, CH), 9.63 (s, 1H, CH).

*Synthesis of 6-tert-butyl-8-[(3¹-hydroxybenzylidene)-amino]-8*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*][1,2,4]triazin-7-one **8 k*** was obtained as compound **5** from 2.08 g (0.01 M) 8-amino-6-tert-butyl-8*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*][1,2,4]triazin-7-one **4** and 1.22 g (0.01 M) of 3-hydroxybenzaldehyde. Yield 1.78 g (57 %). M.p. = 241–242 °C. Anal. Calc. for C₁₅H₁₆N₆O₂. %: N 26.9. Found, %: N 27.1. ¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.40 (s, 9H, C(CH₃)₃), 7.03 (d, 1H, C₆H₄), 7.34 (d, 1H, C₆H₄), 7.38 (t, 1H, C₆H₄), 7.40 (s, 1H, C₆H₄), 9.18 (s, 1H, CH), 9.28 (s, 1H, CH), 9.89 (s, 1H, OH).

*Synthesis of 6-tert-butyl-8-[(2¹-hydroxy-3¹-methoxybenzylidene)-amino]-8*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*][1,2,4]triazin-7-one **8 l*** was obtained as compound **5** from 2.08 g (0.01 M) 8-amino-6-tert-butyl-8*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*][1,2,4]triazin-7-one **4** and 1.52 g (0.01 M) of 2-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde. Yield 1.78 g (52 %). M.p. = > 260 °C. Anal. Calc. for C₁₆H₁₈N₆O₃. %: N 24.6. Found, %: N 24.9. ¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.41 (s, 9H, C(CH₃)₃), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 6.95 (t, 1H, C₆H₃), 7.20 (d, 1H, C₆H₃), 7.49 (t, 1H, C₆H₃), 9.17 (s, 1H, CH), 9.67 (s, 1H, CH), 10.2 (s, 1H, OH).

*Synthesis of 6-tert-butyl-8-[(4¹-hydroxy-3¹-methoxybenzylidene)-amino]-8*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*][1,2,4]triazin-7-one **8 m*** was obtained as compound **5** from 2.08 g (0.01 M) 8-amino-6-tert-butyl-8*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*][1,2,4]triazin-7-one **4** and 1.52 g (0.01 M) of 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde. Yield 2.36 g (69 %). M.p. = 223–224 °C. Anal. Calc. for C₁₆H₁₈N₆O₃. %: N 24.6. Found, %: N 24.4. ¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.46 (s, 9H, C(CH₃)₃), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 6.89 (d, 1H, C₆H₃), 7.32 (d, 1H, C₆H₃), 7.55 (s, 1H, C₆H₃), 8.64 (s, 1H, CH), 9.13 (s, 1H, CH), 9.30 (s, 1H, OH).

*Synthesis of 6-tert-butyl-8-[(3¹-hydroxy-4¹-methoxybenzylidene)-amino]-8*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*][1,2,4]triazin-7-one **8 n*** was obtained as compound **5** from 2.08 g (0.01 M) 8-amino-6-tert-butyl-8*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*][1,2,4]triazin-7-one **4** and 1.52 g (0.01 M) of 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde. Yield 2.26 g (66 %). M.p. = 252–253 °C. Anal. Calc. for C₁₆H₁₈N₆O₃. %: N 24.6. Found, %: N 24.7. ¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.40 (s, 9H, C(CH₃)₃), 3.87 (s, 3H, OCH₃), 7.09 (d, 1H, C₆H₃), 7.32 (d, 1H, C₆H₃), 7.46 (s, 1H, C₆H₃), 9.07 (s, 1H, CH), 9.17 (s, 1H, CH), 9.58 (s, 1H, OH).

*Synthesis of 6-tert-butyl-8-[(4¹-hydroxy-3¹-ethoxybenzylidene)-amino]-8*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*][1,2,4]triazin-7-one **8 o*** was obtained as compound **5** from 2.08 g (0.01 M) 8-amino-6-tert-butyl-8*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*][1,2,4]triazin-7-one **4** and 1.66 g (0.01 M) of

4-hydroxy-3-ethoxybenzaldehyde. Yield 2.36 g (69 %). M.p. = 218–219 °C. Anal. Calc. for $C_{17}H_{20}N_6O_3$. %: N 23.6. Found, %: N 23.3. 1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.45 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1.48 (t, 3H, CH_2CH_3), 4.17 (q, 2H, CH_2CH_3), 6.89 (d, 1H, C_6H_3), 7.32 (d, 1H, C_6H_3), 7.53 (s, 1H, C_6H_3), 8.63 (s, 1H, CH), 9.12 (s, 1H, CH), 9.18 (s, 1H, OH).

Synthesis of 6-tert-butyl-8-[(4¹-hydroxybenzylidene)-amino]-8H-[1,2,4] triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one 9 p was obtained as compound 5 from 2.08 g (0.01 M) 8-amino-6-tert-butyl-8H-[1,2,4] triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one 4 and 1.22 g (0.01 M) of 4-hydroxybenzaldehyde. Yield 2.25 g (72 %). M.p. = > 250 °C. Anal. Calc. for $C_{15}H_{16}N_6O_2$. %: N 26.9. Found, %: N 26.6. 1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.45 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 6.90 and 7.79 (d-d, 4H, C_6H_4), 8.62 (s, 1H, CH), 9.12 (s, 1H, CH), 9.95 (s, 1H, OH).

Synthesis of 6-tert-butyl-8-[(4¹-methoxybenzylidene)-amino]-8H-[1,2,4] triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one 9 q was obtained as compound 5 from 2.08 g (0.01 M) 8-amino-6-tert-butyl-8H-[1,2,4] triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one 4 and 1.36 g (0.01 M) of 4-methoxybenzaldehyde. Yield 2.28 g (70 %). M.p. = 230–231 °C. Anal. Calc. for $C_{16}H_{18}N_6O_2$. %: N 25.8. Found, %: N 25.9. 1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.46 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 3.90 (s, 3H, OCH_3), 7.04 and 7.94 (d-d, 4H, C_6H_4 , J=8.9 Hz), 8.75 (s, 1H, CH), 9.27 (s, 1H, CH).

Synthesis of 6-tert-butyl-8-[(4¹-benzyloxybenzylidene)-amino]-8H-[1,2,4] triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one 9 r was obtained as compound 5 from 2.08 g (0.01 M) 8-amino-6-tert-butyl-8H-[1,2,4] triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one 4 and 2.12 g (0.01 M) of 4-benzyloxybenzaldehyde. Yield 2.93 g (73 %). M.p. = 198–199 °C. Anal. Calc. for $C_{22}H_{22}N_6O_2$. %: N 20.9. Found, %: N 20.6. 1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.40 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 5.23 (s, 2H, CH_2), 7.22 and 7.93 (d-d, 4H, C_6H_4 , J=9.0 Hz), 7.34–7.50 (m, 5H, C_6H_5), 9.17 (s, 1H, CH), 9.18 (s, 1H, CH).

Synthesis of 6-tert-butyl-8-[(4-(4¹-chlorobenzylloxy)-benzylidene)-amino]-8H-[1,2,4] triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-

7-one 9 s was obtained as compound 5 from 2.08 g (0.01 M) 8-amino-6-tert-butyl-8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4] triazin-7-one 4 and 2.47 g (0.01 M) of 4-(41-chlorobenzylloxy)-benzaldehyde. Yield 3.36 g (77 %). M.p. = 199–200 °C. Anal. Calc. for $C_{22}H_{21}ClN_6O_2$. %: N 19.2. Found, %: N 19.4. 1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.40 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 5.23 (s, 2H, OCH_2), 7.21 and 7.93 (d-d, 4H, C_6H_4 , J=8.8 Hz), 7.47 and 7.52 (d-d, 4H, C_6H_4 , J=8.5 Hz), 9.17 (s, 1H, CH), 9.19 (s, 1H, CH).

Synthesis of 2-{4-[(6-tert-butyl-7-oxo-7H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-8-ylimino)-methyl]-phenoxy}-N-isopropyl-N-phenylacetamide 9 t was obtained as compound 5 from 2.08 g (0.01 M) 8-amino-6-tert-butyl-8H-[1,2,4] triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one 4 and 2.97 g (0.01 M) of 2-(41-formylphenoxy)-N-isopropyl-N-phenylacetamide. Yield 3.75 g (77 %). M.p. = 151–152 °C. Anal. Calc. for $C_{26}H_{29}N_7O_3$. %: N 20.1. Found, %: N 20.3. 1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.08 (d, 6H, $CH(CH_3)_2$), 1.40 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 4.36 (s, 2H, CH_2), 4.80 (m, 1H, $CH(CH_3)_2$), 6.94 and 7.87 (d-d, 4H, C_6H_4 , J=8.7 Hz), 7.41–7.54 (m, 5H, Ph), 9.16 (s, 1H, CH), 9.17 (s, 1H, CH).

Synthesis of 8-[(benzo[1,3]dioxol-5-ylmethylene)-amino]-6-tert-butyl-8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one 10 was obtained as compound 5 from 2.08 g (0.01 M) 8-amino-6-tert-butyl-8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4] triazin-7-one 4 and 1.50 g (0.01 M) of benzo[1,3]dioxol-5-carbaldehyde. Yield 2.93 g (73 %). M.p. = 221–222 °C. Anal. Calc. for $C_{16}H_{16}N_6O_3$. %: N 24.7. Found, %: N 24.6. 1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.40 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 6.18 (s, 2H, CH_2), 7.12 (d, 1H, C_6H_3), 7.47 (d, 1H, C_6H_3), 7.50 (s, 1H, C_6H_3), 9.16 (s, 1H, CH), 9.18 (s, 1H, CH).

Screening of compound's antioxidant activity (AOA) was studied *in vitro* by their ability to inhibit lipoperoxide formation, induced by $FeSO_4$ in yolk lipoproteids emulsion. [8, 9]. Ascorbic acid and ionol were taken as comparison compounds. The test was conducted by the following method. Each of compounds as 10 μ M/ml solution diluted in DMSO, 0,5 ml 0,7 % $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ solution and

3 ml potassium-phosphate buffer were added to yolk emulsion. After for 60 min at 37 °C incubation, solution was cooled and used for determination of lipid peroxidation products, which react with thiobarbituric acid (TBA-active products), particularly, malonic dialdehyde (MDA). For this, to solution, obtained after incubation, 2 ml of cooled 20 % trichloroacetic acid and 0,05 ml trilon B (50 mg/l) were added. After centrifugation, 2 ml 1 % of freshly prepared thiobarbituric acid was added to each supernatant and incubated for 35 min at 95 °C. After cooling, 4 ml of buthanol-1 was added, and optical density of buthanol extracts was measured, using KFK-2 photo colorimeter at wave length of 540 nanometers. Each determination was repeated three times.

AOA of test and control samples was evaluated by formula:

$$\text{AOA} = \frac{D_c - D_t}{D_c} \cdot 100 \%, \text{ where}$$

D_c – optical density at 540 nm of control sample (DMSO without test compound);

D_t – optical density at 540 nm of test sample (DMSO with test compound);

Results and discussion. According to the data obtained (table), it is possible to note certain dependences of the test substances structures with their antioxidant properties.

Thus, the introduction of electron-withdrawing substituents (F, Cl, Br and COOMe) into the benzene ring leads to decrease of an antioxidant properties as to the base molecule 6-tert-butyl-8-(benzylideneamino)-8*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*][1,2,4]triazin-7-one **8 a** without substitutes.

Replacing the benzene ring with heterocyclic thiophene **6** and furan **5** residues results in very strong prooxidant properties. Thus, 6-tert-butyl-8-[(furan-2-ylmethylene)-amino]-8*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*][1,2,4]triazin-7-one **5** has the highest value of prooxidant activity: -110.9 % in relation to ascorbic acid and -134.1 % in relation to ionol.

It has been shown that antioxidant properties of the molecule depend sig-

nificantly on the position of the hydroxyl group in the benzene ring. Thus, the highest activity value in the 2-OH (**8 i**), 3-OH (**8 k**) i 4-OH (**9 p**) series is registered for compound 6-tert-butyl-8-[(41-hydroxybenzylidene)-amino]-8*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*][1,2,4]triazin-7-one **9 p**. The lowest is for the compound (**8 k**) with the presence of a hydroxyl group in the third position of the benzene ring. It should be noted that this pattern persists with the introduction into the ring of electron-donating OCH₃ and OC₂H₅ substituents (compounds **8 l**, **8 m**, **8 n** and **8 o**) that enhance the antioxidant properties of the parent molecule. In the case of condensation of compound **4** with salicylic aldehyde and with 2-hydroxynaphthalene-1-carbaldehyde substances **8 i** and **7** are formed, respectively.

Analysing their antioxidant properties, we can conclude that condensed derivatives with a hydroxyl group have a higher AOA than their corresponding benzene derivatives with values of 48.08 % and 35.90 % (**7** and **8 i**) respectively. For substances **7**, **8 a** antioxidant properties were observed at the level of ascorbic acid, and substances **8 l**, **8 o** showed higher results than ascorbic acid.

Thus, a new series of 8*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*][1,2,4]triazin-7-ones derivatives has been proposed, which may form the basis for the creation of new antioxidants.

Conclusions

1. A series of new derivatives of 8*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*][1,2,4]triazin-7-ones has been synthesized and their structure has been proved by modern physicochemical methods. An antioxidant properties of new compounds were evaluated in screening test *in vitro* as compared with ionol and ascorbic acid.
2. The regularities of the chemical structure – pharmacological action are established. It is shown that the introduction of electron-withdrawing substituents (F, Cl, Br and COOMe) into the benzene ring leads to a decrease of the antioxidant properties as to the base molecule 6-tert-butyl-8-

*Antioxidant activity (AOA) of derivatives
of 8H-[1,2,4]triazolo[4,3-*c*] [1,2,4]triazin-7-ones*

Compound, substituents	Optical density (540 nm)	AOA, %
The control – DMSO	0.312	
The control – IonoI	0.053	83,01
The control – ascorbic acid	0.148	52,56
4	0.250	19,87
5 2-furyl	0.658	-110,90
6 2-thiophenyl	0.382	-22,44
7	0.162	48,08
8 a H	0.163	47,76
8 b 4-Me	0.335	-7,37
8 c 4-F	0.338	-8,33
8 d 4-Cl	0.272	12,82
8 e 4-Br	0.282	9,62
8 f 4-NMe ₂	0.288	7,69
8 g 4-COOMe	0.262	16,03
8 h 2-Cl	0.249	20,19
8 i 2-OH	0.200	35,90
8 j 2-OCH ₃	0.267	14,42
8 k 3-OH	0.322	-3,21
8 l 2-OH, 3-OCH ₃	0.122	60,90
8 m 4-OH, 3-OCH ₃	0.228	26,92
8 n 3-OH, 4-OCH ₃	0.258	17,31
8 o 4-OH, 3-OC ₂ H ₅	0.121	61,22
9 p 4-OH	0.178	42,95
9 q 4-OCH ₃	0.225	27,88
9 r 4-OCH ₂ Ph	0.336	-7,69
9 s 4-OCH ₂ C ₆ H ₄ Cl	0.337	-8,01
9 t	0.332	-6,41
10 3,4-CH ₂ OCH ₂	0.302	3,21

(benzylideneamino)-8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one **8 a** without substituents. The most active were derivatives of 8-(benzylideneamino)-6-*tert*-butyl-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-ones, which had a hydroxyl group and an additional oxyalkyl fragment in the

third position of the benzene ring (**8 l**, **8 o**).

3. The data obtained substantiate the feasibility of further studying the derivatives of 6-*tert*-butyl-8-(benzylideneamino)-8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-ones as potential antioxidant agents.

1. Основні шляхи утворення активних форм кисню в нормі та при ішемічних патологіях (огляд літератури) Ю. І. Губський, І. Ф. Беленічев, С. І. Коваленко [та ін.]. Современные проблемы токсикологии. 2004. № 2. С. 8–15.
2. Патент на корисну модель № 135929 Україна, МПК (2006) C07D 403/02 // 8-(4¹-Гідрокси-3R-бензиліденаміно)-6-третбутил-8H-[1,2,4]триазоло[4,3-в] [1,2,4]триазин-7-они, що проявляють антиоксидантні властивості. Новодворський Е. М., Комаров І. В., Баглай О. Ю., Демченко А. М., Бобкова Л. С. № у 2019 01528; Заявл. 15.02.2019; Опубл. 25.07.2019, Бюл. № 14/2019.

3. Winifred M. Cort. Antioxidant Properties of Ascorbic Acid in Foods. *Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism, and Uses (Advances in Chemistry)*. 1982. V. 200, Chapter 22, P. 533–550.
4. Bendich A., Machlin L. J., Scandurra O. The antioxidant role of vitamin C. *Advances in Free Radical Biology & Medicine*. 1986. V. 2, Is. 2. P. 419–444.
5. Schmidt T., Witting A., Sehnm H-P. Preparation of 4-amino-6-tert-butyl-3-alkylthio-1,2,4-triazin-5(4H)-ones. Pat. US 4309538. Publ. 05.01.1982.
6. Borrell J. I., Victory P., Beti C. et al. *Anales de Quimica*. 1995. V. 91, № 3–4. P. 243–252.
7. Azzouz A. S. P. Synthesis of Schiff Bases Derived From Benzaldehyde and Salicylaldehyde With Some Amino Acids by a New Develop Method. *National journal of chemistry*. 2010. V. 37. P. 158–168.
8. Synthesis of some N-substituted nitroimidazole derivatives as potential antioxidant and antifungal agents. D. Olender, J. Zwawiak, V. Lukianchuk, R. Lesyk. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2009. V. 44. P. 645–652.
9. Методи оцінки антиоксидантних властивостей фізіологічно активних сполук при ініціюванні вільнорадикальних процесів *in vitro*. Методичні рекомендації. Ю. І. Губський, В. В. Дунаєв, І. Ф. Беленічев та ін. Київ : ДФЦ МОЗ України, 2002. 26 с.

Y. N. Novodvorskyi, O. Y. Bahlai, I. V. Komarov, A. M. Demchenko
Synthesis and antioxidant activity of derivatives of 8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-ones

Oxidative stress is usually connected with many severe diseases, such as atherosclerosis, hypertension, Alzheimer's disease etc. Therefore, the search for new antioxidants is a very important pharmacological task.

The aim of the study – to synthesize new derivatives of 8-(4¹-hydroxy-3R-benzylidenamino)-6-tert-butyl-8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-ones and to evaluate their antioxidant properties in screening test *in vitro* as compared with ionol and ascorbic acid.

By interaction of equimolar amounts of 8-amino-6-tert-butyl-8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one with the corresponding aromatic and heterocyclic aldehydes in ethanol, a series of Schiff bases with the key fragment 8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one were synthesized. The structure and purity of all the substances obtained were confirmed by ¹H NMR spectroscopy.

Screening of compound's antioxidant activity (AOA) was studied *in vitro* by their ability to inhibit lipoperoxide formation, induced by FeSO₄ in yolk lipoproteins emulsion.

It is shown, that, depending on the structure, the test substances exhibit both antioxidant and prooxidant properties. The regularities of the chemical structure – pharmacological action are established. It is shown that the introduction of electron-withdrawing substituents (F, Cl, Br and COOMe) into the benzene ring leads to a decrease in the antioxidant properties as to the base molecule 6-tert-butyl-8-(benzylideneamino)-8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-one **8 a** without substitutes. The most active were derivatives of 8-(benzylideneamino)-6-tert-butyl-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-ones, which had a hydroxyl group and an additional oxyalkyl fragment in the third position of the benzene ring (**8 l**, **8 o**).

The data obtained substantiate the feasibility of further studying the most active derivatives of 6-tert-butyl-8-(benzylideneamino)-8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-ones as potential antioxidant agents.

Key words: antioxidant activity, ascorbic acid, ionol, derivatives of 8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-ones

Є. М. Новодворський, О. Ю. Баглай, І. В. Комаров, А. М. Демченко
Синтез та антиоксидантна активність похідних 8H-[1,2,4]триазоло [4,3-в][1,2,4]триазин-7-ону

Багато серйозних захворювань, такі як атеросклероз, гіпертензія, хвороба Альцгеймера, діабет та ін. пов'язані з розвитком окиснювального стресу. Тому пошук нових антиоксидантів є дуже актуальною задачею фармакології.

Мета дослідження – синтезувати нові похідні 8H-[1,2,4]триазоло [4,3-в][1,2,4]триазин-7-ону та вивчити їхню антиоксидантну активність у скринінговому дослідженні *in vitro* порівняно з іонолом та аскорбіновою кислотою.

Взаємодією еквімолярних кількостей 8-аміно-6-трет-бутил-8H-[1,2,4] триазоло[4,3-в][1,2,4] триазин-7-ону з відповідними ароматичними та гетероциклічними альдегідами в етанолі синтезовано низку основ Шиффа з ключовим фрагментом 8H-[1,2,4]триазоло[4,3-в][1,2,4]триазин-7-ону. Будову та чистоту всіх отриманих речовин підтверджено даними ЯМР ¹H спектроскопії.

Антиоксидантну активність (АОА) похідних 8H-[1,2,4]триазоло [4,3-в][1,2,4]триазин-7-ону оцінювали в дослідіах *in vitro* за їхньою здатністю пригнічувати утворення продуктів ліпоперекиснення, індуковане FeSO₄ у ліпопротеїдах курячого яйця.

Показано, що досліджувані речовини залежно від будови проявляють як антиоксидантні, так і

прооксидантні властивості. Встановлені закономірності хімічна будова – біологічна активність.

Отримані дані обґрунтовують доцільність подальшого вивчення найактивніших похідних 8H-[1,2,4] триазоло[4,3-в] [1,2,4]триазин-7-ону як нових потенційних антиоксидантних засобів.

Ключові слова: антиоксидантна активність, аскорбінова кислота, іонол, похідні 8H-[1,2,4] триазоло[4,3-в][1,2,4]триазин-7-онів

Е. Н. Новодворский, А. Ю. Баглай, И. В. Комаров, А. М. Демченко

Синтез и антиоксидантная активность производных 8H-[1,2,4]триазоло[4,3-в] [1,2,4]триазин-7-онов

Многие серьезные заболевания, такие как атеросклероз, гипертензия, болезнь Альцгеймера, диабет и др. сопряжены с развитием окислительного стресса. Поэтому поиск новых антиоксидантов является актуальной задачей фармакологии.

Цель исследования – синтезировать новые производные 8H-[1,2,4]триазоло[4,3-в][1,2,4]триазин-7-она и изучить их антиоксидантную активность в скрининговом тесте *in vitro* по сравнению с ионолом и аскорбиновой кислотой.

Взаимодействием эквимольных количеств 8-амино-6-трет-бутил-8H-[1,2,4]триазоло[4,3-в] [1,2,4]триазин-7-она с соответствующими ароматическими и гетероциклическими альдегидами в этаноле синтезирован ряд оснований Шиффа с ключевым фрагментом 8H-[1,2,4]триазоло [4,3-в] [1,2,4]триазин-7-она. Строение и чистота всех полученных веществ подтверждены данными ЯМР ¹H спектроскопии.

Антиоксидантную активность (АОА) производных 8H-[1,2,4] триазоло[4,3-в][1,2,4]триазин-7-она оценивали *in vitro* по их способности ингибировать образование продуктов липоперекисления, индуцированное FeSO₄ в липопротеинах куриного яйца.

Показано, что исследуемые вещества в зависимости от строения проявляют как антиоксидантные, так и прооксидантные свойства. Установлены закономерности химическое строение – биологическая активность.

Полученные данные обосновывают целесообразность дальнейшего изучения наиболее активных производных 8H-[1,2,4]триазоло [4,3-в][1,2,4]триазин-7-она в качестве новых потенциальных антиоксидантных средств.

Ключевые слова: антиоксидантная активность, аскорбиновая кислота, ионол, производные 8H-[1,2,4]триазоло[4,3-в][1,2,4]триазин-7-онов

Надійшла: 12 вересня 2019 р.

Прийнята до друку: 16 жовтня 2019 р.

Контактна особа: Баглай О. Ю., ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМНУ», буд. 14, вул. Антона Цедіка, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 44 456 42 56.

О. А. Темірова¹, М. В. Хайтович¹, А. П. Бурлака², А. В. Вовк²

Модифікуючий вплив N-ацетилцистеїну, мелатоніну та їхнього поєднання на стан електронно-транспортного ланцюга мітохондрій та антиоксидантної системи в головному мозку щурів за експериментального цукрового діабету 1 типу

¹Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ²Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького Національної академії наук України, м. Київ

Ключові слова: цукровий діабет 1 типу, N-ацетилцистеїн, мелатонін, мітохондрії, супероксидний радикал, глутатіон, каталаза

Проблема цукрового діабету (ЦД) має велике медико-соціальне та загальнолюдське значення. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я в світі кількість пацієнтів з ЦД становить майже 190 млн. В Україні за поширеністю ЦД посідає третє місце після серцево-судинних та онкологічних захворювань. Так, станом на 1 січня 2017 року, у країні зареєстровано 1,24 млн осіб з ЦД [1].

Спостерігається тенденція до зростання захворюваності та поширеності ЦД 1 типу (ЦД1) у дитячому віці. У світі число дітей, хворих на ЦД1, становить 542 тис., а річний приріст уперше виявлених випадків – 86 тис. [2]. Збільшення поширеності ЦД серед дитячого населення характерне й для України. Повідомляється, що в 2017 році хворобу зареєстровано в 9538 дітей та підлітків віком від 0–18 років, з них уперше діабет діагностовано в 1368 осіб [3].

У більшості пацієнтів розвиваються характерні для ЦД ускладнення – полінейропатії, нефропатії, ретинопатії, ангіопатії та ін. Окремо виділяють діабетичну енцефалопатію (ДЕ), що виявляється майже в 80 % осіб з ЦД і суттєво погіршує якість їхнього життя [4].

Хоча в основі розвитку ДЕ за ЦД1 і ЦД2 лежить порушення вуглеводного обміну, але фактори розвитку та основні механізми дещо відрізняються. Так, для пацієнтів з ЦД2 є характерною «змішана енцефалопатія», основними факторами ризику якої є дисліпідемія та артеріальна гіпертензія, тоді як для пацієнтів з ЦД1 є характерною ДЕ в «чистому вигляді», головним чинником розвитку якої вважається оксидативний стрес (ОС) [5, 6]. Встановлено, що ОС, викликаний гіперглікемією, виявляється надмірним утворенням реактивних форм кисню та виснаженням системи антиоксидантного захисту, що призводить до енергетичного виснаження та, як наслідок, пошкодження та загибелі нейронів [7–9]. Зокрема, хронічна гіперглікемія призводить до активації поліолового шляху, що спричиняє виснаження запасів НАДФН, які необхідні для ферментативного відновлення глутатіону (ВГ). Зменшення рівня ВГ є однією з причин зменшення активності оксиду нітрогену (NO) за ЦД і його ускладнень [6].

Тому корекцію ОС вважають одним із найперспективніших напрямів церебропротекції за ЦД1.

Відомо, що N-ацетилцистеїн (НАцц) виявляє потужні антиоксидантні (АО) властивості, у тому числі в разі захворювання центральної нервової системи [10–12]. Протекторні властивості НАцц пов'язують зі здатністю збільшувати

рівень глутатіону, який захищає клітини від вільних радикалів [13]. Як антиоксидант НАцц розщеплює гідроксильний радикал пероксид гідрогену і хлористоводневу кислоту [14]. Результатами останніх досліджень показана здатність НАцц зменшувати експресію індукцибельної NO-синтази (iNOS) [15–18].

Також активно вивчається здатність мелатоніну (Мел) пригнічувати інтенсивність ліпопероксидації та підвищувати стійкість до ОС шляхом протекції мікосомальних мембран і збільшення активності ферментів АО захисту (каталази (КАТ), глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази) [19, 20]. Окрім того, Мел може послаблювати глутаматну нейротоксичність, агресивність NO, активувати фактори росту нейронів та одночасно обмежувати апоптоз нервових клітин [21].

Мета дослідження – вивчення впливу НАцц, Мел та їхнього поєднання на стан електронно-транспортного ланцюга (ЕТЛ) мітохондрій та АО системи в головному мозку щурів за експериментального ЦД1.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на 130 статевозрілих щурах-самцях лінії Wistar масою 200–260 г. Тварин вирощували й утримували на звичайному збалансованому харчовому раціоні та вільному доступі до води в умовах віварію Національного медичного університету імені О. О. Богомольця. Усі маніпуляції були проведені відповідно до Закону України від 21 лютого 2006 року № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» [22] та згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей [23]. Дотримання біоетичних норм засвідчено експертним висновком Комісії з питань етики НМУ імені О. О. Богомольця (протоколи від 28 грудня 2016 р. № 99; від 22 лютого 2019 р. № 119).

ЦД1 моделювали в тварин шляхом введенням стрептозотоцину (STZ) (Sigma, США) у дозі 50 мг/кг у цитратному буферному розчині (рН 4,5) одно-

разово інтраперитонеально відповідно до методичних рекомендацій [24]. Для зниження симптомів гіпоглікемії та кетоацидозу, які виникають після ін'єкції, дослідні тварини протягом 48 год отримували 5 % розчин глюкози з поїлки. Через 72 год після ін'єкції STZ у дослідних щурів вимірювали рівень глюкози в крові з хвостової вени, використовуючи глюкометр One Touch Select Simple (LifeScan, США). В експеримент включали тварин, що мали стійку гіперглікемію з рівнем глюкози понад 15 ммоль/л. Протягом експерименту визначали рівень глюкози кожного тижня, масу тіла, оцінювали зовнішній вигляд тварин.

Тварини були розділені на підгрупи: 1) інтактний контроль (ІК); 2) контрольна патологія (КП, тварини з ЦД1, яким вводили фізіологічний розчин); 3) НАцц (тварини з ЦД 1, яким вводили НАцц (STADA) у дозі 1500 мг/кг); 4) Мел (щури з ЦД1, які отримували Мел (Київський вітамінний завод) у дозі 10 мг/кг); 5) НАцц + Мел (група модельних тварин з ЦД1, яким вводили комбінацію НАцц і Мел). Підбір дозування НАцц здійснювали на основі проведених раніше досліджень співробітниками кафедри клінічної фармакології та клінічної фармації Національного медичного університету імені О. О. Богомольця. Обрана доза 1500 мг/кг є найефективнішою щодо попередження індукованого гіперглікемією ОС та виявлення нейропротекторних властивостей, що співпадає з даними літератури [25–27]. Підбір дозування Мел здійснювали відповідно до аналізу джерел літератури [28–32]. Лікарські засоби вводили внутрішньошлунково протягом 5 тижнів, починаючи з 15 доби після відтворення контрольної патології.

Евтаназію здійснювали декапітацією під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг, внутрішньоочеревинно) з метою забору крові та головного мозку. З головного мозку видаляли кров, відділяли від мозкової оболонки, лобову ділянку головного мозку поміщали в рідкий азот для проведення електронної парамагнітно-резонансної (ЕПР) спектроскопії, решту мозку гомогенізували

для визначення вмісту ВГ та активності КАТ. З метою виділення мітохондріальної фракції лобову ділянку головного мозку подрібнювали в рідкому азоті та гомогенізували за температури 2 °С у середовищі сахарози, трис-НСІ-буферу та ЕДТА-1. Методом диференціального центрифугування виділяли мітохондріальну фракцію [33].

Стан мітохондріального ЕТЛ у клітинах головного мозку оцінювали методом ЕПР за амплітудою та положенням таких парамагнітних центрів з g-факторами: 1,94 – залізоісичаних протеїнів (ЗСП) у N2; 2,003 – радикалів убісеміхінону; 2,03 – негемових нітрозильних комплексів заліза, на комп'ютеризованому спектрометрі РЕ-1307 відповідно до методики [34].

Для вивчення впливу НАцц, Мел та їхнього поєднання на етапі ініціації ОС визначали швидкість генерування супероксидних радикалів (СР) і рівень NO у тканині головного мозку щурів. Супероксид-генеруючу активність визначали методом ЕПР з використанням спінового уловлювача 2,2,6,6,-тетраметил-4-оксипіперидину за кімнатної температури. Рівень NO досліджували методом ЕПР у низькотемпературному режимі з використанням діетилдитіокарбамату (Sigma, USA) як спінового уловлювача [34].

Вплив досліджуваних лікарських засобів на кінцевих етапах ОС оцінювали за рівнем ВГ та активністю КАТ. Вміст ВГ у гомогенаті тканини головного мозку визначали спектрофотометрично (λ 412 нм) за реакцією взаємодії з 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою з утворенням тіонітрофенільного аніона, кількість якого пропорційна кількості тіолових груп, що прореагували з кислотою [35]. Попередньо проводили осадження білків 20 % розчином трихлороцтової кислоти (центрифугували 15 хв 3000 g). До супернатанту додавали фосфатний буфер (рН 7,4) і реактив Елмана. Потім визначали оптичну густину.

Визначення активності КАТ проводили за методом М. Корольок і співавт. [36], принцип якого полягає в тому, що КАТ руйнує перекис водню, незруйнована частина якого в разі взаємодії з

солями молібдату амонію утворює стійкий забарвлений комплекс, який визначали спектрофотометрично (λ 410 нм).

З метою оцінки протекторних властивостей НАцц, Мел та їхнього поєднання також було вивчено вплив на рівень церулоплазміну (ЦП), трансферину (ТФ), метгемоглобіну (MetHb) у крові щурів з ЦД1. Для цього в пробірку з 1 мл трилону Б набирали 3 мл крові, потім заморожували в спеціальній прес-формі в рідкому нітрогені для дослідження методом ЕПР [37]. Реєстрацію рівнів ЦП, ТФ, MetHb проводили на спектрометрі РЕ-1307 за температури рідкого азоту 77 °К. Вміст ЦП оцінювали за амплітудою сигналу ЕПР з g-фактором 2,05, ТФ – 4,25 та MetHb – 6,3.

Статистичну обробку даних проводили методом варіаційної статистики за допомогою програм «IBM SPSS Statistics Base version 22.0» і «Medstat». Для з'ясування міжгрупових відмінностей у випадку нормального розподілу вибірових даних використовували t-критерій Стьюдента (для парних порівнянь) або однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA за критерієм Шеффе та Даннета. За відсутності нормального розподілу використовували U-критерій Манна-Уїтні. Відмінності вважали достовірними в разі $P < 0,05$. Точкову оцінку результатів представляли у вигляді середніх значень і стандартної похибки середнього ($M \pm m$).

Результати та їх обговорення. Через 7 тижнів після моделювання ЦД1 у щурів групи КП встановлено зниження порівняно з інтактним контролем амплітуди сигналу ЕПР з g-фактором 1,94 ($0,125 \pm 0,01$) проти ($0,58 \pm 0,07$) відн. од., $p < 0,05$) і 2,003 ($0,14 \pm 0,01$) проти ($0,35 \pm 0,05$) відн. од., $p < 0,05$), тоді як амплітуда g-2,03 зростала ($0,09 \pm 0,01$) проти ($0,05 \pm 0,02$) відн. од., $p < 0,05$). Таким чином, у щурів з ЦД1 встановлено значне зменшення ЗСП (g-1,94) (ЗСП N-2), що є важливими компонентами в I пункті супряження окиснення та фосфорилування в дихальному ланцюзі, у разі пошкодження якого мітохондрії втрачають здатність синтезувати АТФ, а кисень відновлюється до СР. Разом з тим, зростання амплітуди

сигналу нітрозильних комплексів заліза (NO-FeS-білки, g-2,03) є маркером вільнорадикальних процесів та ушкодження мембранних структур. Зменшення рівня радикалів убісеміхінону (g-2,003) у клітинах головного мозку щурів з ЦД1 вказує на порушення функціонування CoQ в ЕТЛ мітохондрій, у результаті чого втрачається здатність до переносу електронів у I і III комплексах ЕТЛ, відбувається генерування реактивних форм кисню. Отримані дані можуть свідчити про ушкодження ЕТЛ мітохондрій головного мозку щурів з ЦД1.

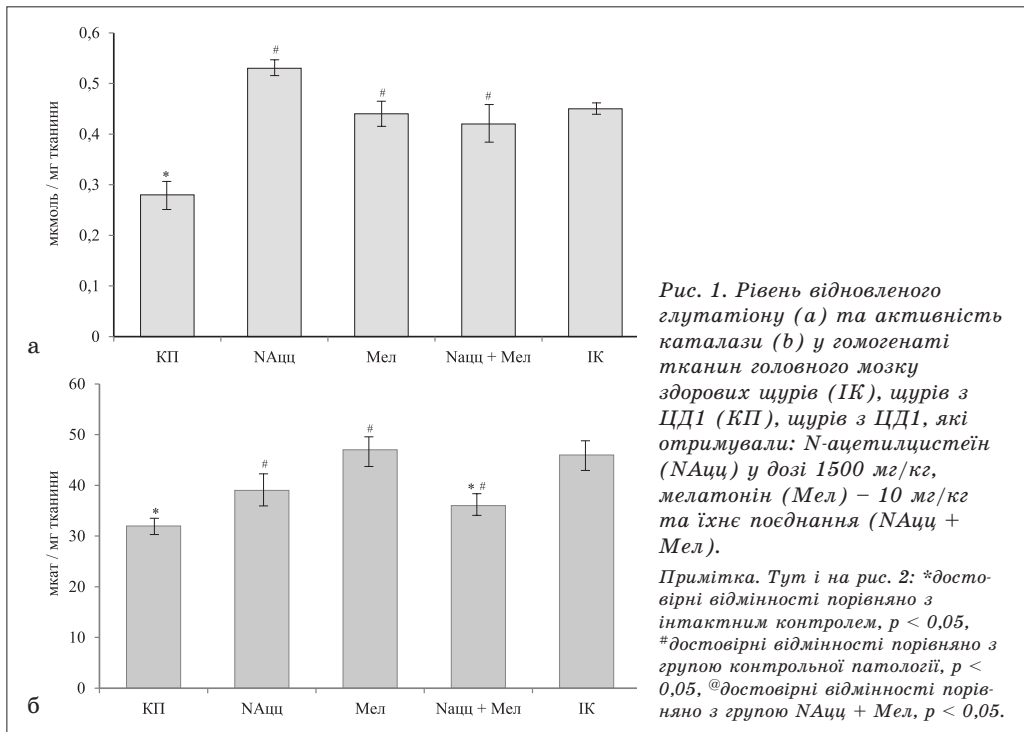
За умов застосування НАцц, Мел, а особливо їхнього поєднання відбулося зростання вмісту ЗСП N-2 ($0,20 \pm 0,06$) відн. од., ($0,22 \pm 0,01$) відн. од. та ($0,25 \pm 0,01$) відн. од., $p < 0,05$) порівняно з групою КП, що може свідчити про їхню здатність попереджувати ушкодження даних компонентів ЕТЛ мітохондрій головного мозку щурів за умов експериментального ЦД1. Застосування лікарських засобів не мало суттєвого впливу на величину ЕПР NO-FeS-білки. Імовірно, вказані зміни в мембранах клітин головного мозку відбуваються на початкових етапах, і використання лікарських засобів через 2 тижні після індукції ЦД1 STZ не впливає на нормалізацію нітрозильних комплексів. Однак сумісне використання НАцц і Мел за умов експериментального ЦД1 супроводжувалося зростанням вмісту убісеміхінону в 2,0 разу ($0,28 \pm 0,01$) $p < 0,05$), що може бути пов'язано зі здатністю регулювати біосинтез CoQ, мембраностабілізуючими та антиоксидантними властивостями.

Індукція ЦД1 супроводжувалася зростанням швидкості генерування СР у мітохондріях тканини головного мозку щурів ($0,93 \pm 0,14$) нмоль/г тканини · хв проти ($0,15 \pm 0,05$) нмоль/г тканини · хв, $p < 0,05$), тоді як швидкість генерування NO зменшувалася ($0,47 \pm 0,04$) нмоль/г тканини · хв проти ($1,29 \pm 0,09$) нмоль/г тканини · хв, $p < 0,05$), що вказує на зменшення biodоступності NO і збільшення ОС. Аналіз змін швидкості генерування СР через 5 тижнів фармакотерапії показав статистично достовірне зниження порівняно з групою КП ($p < 0,05$).

Зокрема, найнижчі значення отримані за поєданого використання НАцц і Мел ($0,55 \pm 0,08$) нмоль/г тканини · хв), тоді як монотерапія була менш ефективною ($0,75 \pm 0,07$) нмоль/г тканини · хв та $0,67 \pm 0,09$ нмоль/г тканини · хв). Введення НАцц, Мел та особливо їхнього поєднання сприяло порівняно з групою КП зростанню рівня NO ($0,70 \pm 0,05$) нмоль/г тканини · хв, ($0,87 \pm 0,10$) нмоль/г тканини · хв і ($0,95 \pm 0,05$) нмоль/г тканини · хв $p < 0,05$) у клітинах головного мозку щурів з ЦД1.

Моделювання стрептозотоцинового ЦД1 супроводжувалося виснаженням системи АО (рис. 1) захисту, про що свідчило зменшення рівня ВГ ($0,30 \pm 0,02$) мкмоль/мг тканини проти ($0,43 \pm 0,01$) мкмоль/мг тканини в групі ІК, $p < 0,05$) та активності КАТ ($30,87 \pm 1,51$) мкат/мг тканини проти ($49,05 \pm 3,58$) мкат/мг тканини в групі ІК, $p < 0,05$). Окрім того в тварин групи КП встановлено зменшення коефіцієнта NO/ВГ: ($1,6 \pm 0,03$) проти ($3,0 \pm 0,015$). Фармакотерапія НАцц, Мел і НАцц + Мел спричинила достовірне ($p < 0,05$) підвищення рівня ВГ у головному мозку щурів зі стрептозотоциновим ЦД (рис. 1а). Найбільше значення відмічено в тварин, які отримували НАцц ($0,53 \pm 0,01$) мкмоль/мг тканини, тоді як коефіцієнт NO/ВГ найближчим до значень ІК був у групі комбінації досліджуваних ЛЗ ($2,3 \pm 0,04$). Рівень активності КАТ (рис. 1б) відновлювався в усіх групах фармакологічної корекції порівняно з КП ($p < 0,05$). Найбільша активність ферменту відмічалась у групі тварин, які отримували Мел ($48,84 \pm 3,20$) мкат/мг тканини).

За вивчення стану АО захисту в крові щурів зі стрептозотоциновим ЦД1 (рис. 2) відмічено збільшенням рівня ЦП у 1,3 разу та MetHb у 9,5 разу ($p < 0,05$), тоді як рівень ТФ зменшився в 1,5 разу порівняно з ІК ($p < 0,05$). Застосування НАцц, Мел та їхнього поєднання супроводжувалося змінами вмісту ТФ, ЦП і MetHb у крові щурів зі стрептозотоциновим ЦД1. Так, у групах тварин НАцц і Мел вміст ТФ зріс у 1,5 разу, а в разі сумісного застосування лікарських засобів у 2,0 разу

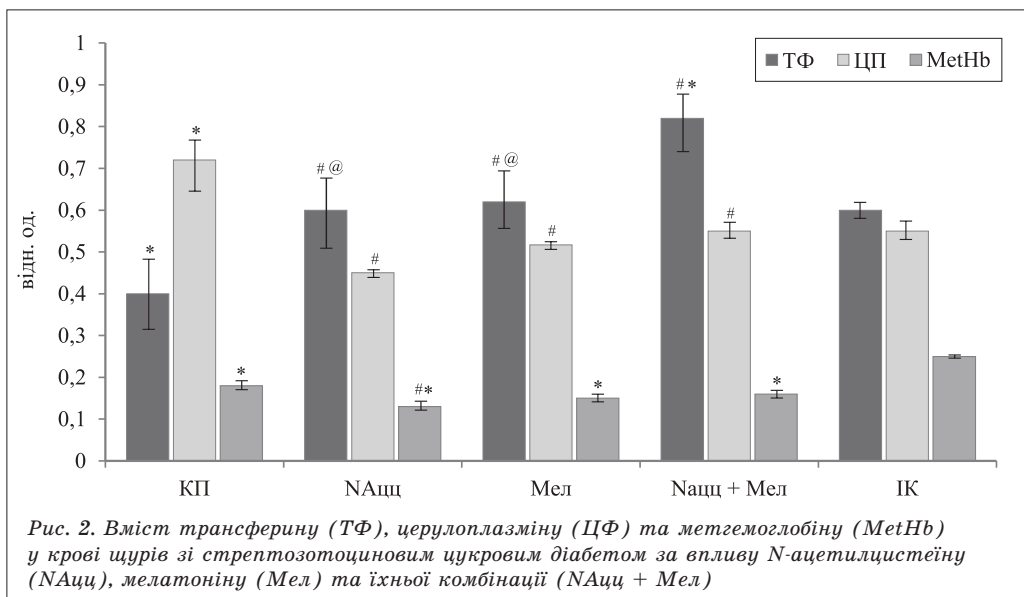


порівняно з КП ($p < 0,05$). Під впливом НАцц вміст ЦП зменшився в 1,6 разу, Мел – у 1,4, а НАцц + Мел – у 1,3 разу ($p < 0,05$). Рівень MetHb у групі НАцц зменшився в 1,6 разу, у групах Мел і НАцц + Мел – у 1,3 разу ($p < 0,05$).

Отже, сумісне застосування НАцц і Мел протягом 5 тижнів сприяє нормалізації ЕТЛ мітохондрій і виявляє тим самим АО вплив на клітини головного мозку щурів з ЦД1. У разі монотерапії

НАцц і Мел виявляли протекторний вплив на кінцевих етапах ОС. Зокрема, Мел за експериментального ЦД1 сприяв підвищенню активності КАТ, тоді як НАцц–ВГ.

Результати останніх досліджень вказують, що саме мітохондріальна дисфункція є основою нейродегенеративних порушень у разі захворювань центральної нервової системи [38, 39]. В окремих дослідженнях показано, що



порушення функціонування ЕТЛ мітохондрій залучене до патогенезу ДЕ. Зокрема М. Chomova та співавтор. було показано зменшення активності комплексу I ЕТЛ мітохондрій головного мозку щурів з експериментальним ЦД1 [40]. В іншому дослідженні Y. Zhou та співавтор. довели, що моделювання стрептозотцинового ЦД1 супроводжується розвитком мітохондріальної дисфункції нейронів головного мозку, що призводить до розвитку когнітивного дефіциту [41]. Тому актуальним є подальше вивчення мітохондрій як мішеней для терапії, а також для розуміння патофізіології уражень головного мозку за ЦД1.

Результати окремих попередніх досліджень також вказують на мітопротекторні властивості НАцц. Зокрема, D. J. Wright та співавтор. було встановлено покращання функціонування мітохондрій, що супроводжувалося зменшенням когнітивного дефіциту за моделювання хвороби Гантингтона [42]. Т. Al-Nahdi та співавтор. у досліджах *in vivo* доведено, що введення НАцц супроводжувалося відновленням мембранного балансу мітохондрій, окисно-відновного гомеостазу, запобігало апоптозу та сприяло нормалізації синтезу інсуліну β -клітинами підшлункової залози [43]. Іншими дослідниками *in vitro* встановлено, що введення Мел у концентрації 0,5, 1, 5, 10 μM сприяло відновленню мембранного потенціалу мітохондрій і зменшенню ОС у шванівських клітинах на фоні гіперглікемії [44]. Експериментальні дослідження вказують на здатність НАцц знижувати експресію iNOS і відновлювати рівень NO у тканинах головного мозку за патологічних умов [45, 46]. Повідомляється, що Мел здатний нейтралізувати реактивні форми кисню

в ЦНС при експериментальних і клінічних дослідженнях у пацієнтів з епілепсією [47]. Таким чином, результати даних досліджень підтверджують важливість забезпечення саме мітопротекторного впливу для зменшення вираженості енцефалопатії за ЦД1.

Висновки

1. За експериментального ЦД1 відбуваються порушення ЕТЛ мітохондрій і роз'єднання клітинного дихання з фосфорилюванням у нейронах головного мозку. Так, встановлено зменшення в 4,6 разу ($p < 0,05$) ЗСП, у 2,5 разу – рівня радикалів убіхінону ($p < 0,05$), підвищення в 1,2 разу рівня нітрозольних комплексів заліза ($p < 0,05$).
2. Встановлено, що НАцц і Мел активують ендогенну систему АО захисту головного мозку щурів зі стрептозотциновим ЦД1. Зокрема, застосування НАцц супроводжувалося підвищенням у 1,8 разу ($p < 0,05$) рівня ВГ, тоді як використання Мел – збільшенням у 1,6 разу активності КАТ ($p < 0,05$). Окрім того, вказані лікарські засоби, особливо в разі їхнього поєданого застосування, нормалізували АО захист крові щурів з ЦД1, про що свідчило наближення рівня ТФ, ЦП і MetHb до значень інтактного контролю ($p < 0,05$).
3. Застосування НАцц разом з Мел протягом 5 тижнів асоціювалось з високим антирадикальним ефектом у тканині головного мозку щурів з експериментальним ЦД1, знижуючи рівень генерування СР у 1,7 разу ($p < 0,05$), попереджуючи зниження рівня ЗСП N2 і радикалів убіхінону в 2,0 разу порівняно з КП ($p < 0,05$), сприяючи нормалізації ЕТЛ мітохондрій.

1. Українська база медико-статистичної інформації [Електронний ресурс]. URL: <http://medstat.gov.ua/ukr/normdoc/vooz.html>.
2. Майданник В. Г., Шевченко Т. А. Стан перекисного окислення ліпідів та антиоксидантної системи у дітей, хворих на цукровий діабет 1 типу, залежно від наявності хронічних ускладнень. *Проблеми клінічної педіатрії*. 2018. № 4 (42). С. 6-13.
3. Зелінська Н. Б., Руденко Н. Г., Крушинська З. Г. Хвороби ендокринної системи в дітей України у 2017 році: показник поширеності й захворюваності та їх динаміка. *Український журнал дитячої ендокринології*. 2018. № 2. С. 5–15.
4. Родинський О. Г., Басиста К. І., Гузь Л. В. Нейрохімічні та поведінкові процеси в геронтогенезі за умов експериментальної гіперглікемії. *Медичні перспективи*. 2018. Т. 18, № 2. С. 4–13.

5. Михайличенко Т. Е. Динамика функционального состояния головного мозга у больных сахарным диабетом при использовании комплексной терапии. *Медицинский форум*. 2019. № 16. С. 61–63.
6. Ушакова Г. О. Молекулярні механізми розвитку енцефалопатії; за ред. проф. Г. О. Ушакової. Дніпро : ДНУ імені Олеса Гончара, 2017. 203 с.
7. Паньків В. І. Патогенетичне лікування діабетичної нейропатії: комплексний підхід. *International journal of endocrinology*. 2012. № 7 (47). С. 55–60.
8. Kushnir O. Yu., Yaremii I. M. Antioxidant action of melatonin in the brain of alloxan diabetic rats. *Клінічна та експериментальна патологія*. 2017. Т. 6, № 2 (60). С. 37–40.
9. Physiological targets for the treatment of diabetic encephalopathy. L. L. Vieira et al. *Central nervous system agents in medical chemistry*. 2016. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27121380>.
10. N-Acetylcysteine in combination with IGF-1 enhances neuroprotection against proteasome dysfunction-induced neurotoxicity in SH-SY5Y Cells. B. Cheng et al. *Parkinson's disease*. 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6564212>.
11. N-Acetylcysteine in depressive symptoms and functionality: a systematic review and meta-analysis. B. Fernandes et al. *The Journal of Clinical Psychiatry*. 2016. <https://doi.org/10.4088/JCP.15r09984>.
12. N-acetylcysteine in the treatment of psychiatric disorders: current status and future prospects. A. Minarini et al. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2017. <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1251580>.
13. N-ацетилцистеин: фармакокинетические параметры и влияние на концентрацию эндогенных аминотиолов. А. А. Дутов и др. *Исследования фармакокинетики*. 2016. № 2. С. 26–30.
14. N-acetylcysteine reduces oxidative stress, nuclear factor-Kb activity and cardiomyocyte apoptosis in heart failure. Xiao-Yan Wu et al. *Molecular medicine reports*. 2014. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2292>.
15. Беленичев И. Ф., Кучер Т. В. Влияние тиольных антиоксидантов на состояние нитрозирующего стресса в головном мозге крыс, подверженных хронической алкогольной интоксикации. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2016. № 2 (48). С. 24–29.
16. N-acetylcysteine versus progesterone on the cisplatin-induced peripheral neurotoxicity. S. M. Zaki et al. 2018. *Folia Morphol*. № 2. <https://doi.org/10.5603/FM.a2017.0090>.
17. Sex-specific effects of N-acetylcysteine in neonatal rats treated with hypothermia after severe hypoxia-ischemia. Xingju Nie et al. 2016. *Neuroscience Research*. V. 108. P. 24–33.
18. Литвиненко Е. С., Беленичев И. Ф. Модуляция активности сопряженных систем NO/глутатион в ишемизированном головном мозге экспериментальных животных препаратом «селеназа» в различных дозах. *Вестник новых медицинских технологий*. 2015. Т. 22, № 1. С. 33–38.
19. Melatonin and human mitochondrial diseases. R. Sharafati-Chaleshtori et al. *Journal of research in medical sciences*. 2017. <https://doi.org/10.4103/1735-1995.19909>.
20. Іванків Я. І., Олещук О. М. Застосування мелатоніну при експериментальному цукровому діабеті I типу. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2016. № 3 (49). С. 41–47.
21. Арушанян Э. Б., Щетинин Е. В. Мелатонин как универсальный модулятор любых патологических процессов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016. Т. 60, № 1. С. 79–88.
22. Про захист тварин від жорстокого поводження [Електронний ресурс]: Постанова Кабінету Міністрів України від 12.02.2006 № 3447-IV. URL: <http://zakon4.rada.gov.ua/laws/show/3447-15>.
23. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. URL: <http://conventions.coe.int/treaty/en/treaties/html/123.htm>.
24. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації; за ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. Київ : Авіцена, 2001. 528 с.
25. Contribution of neuronal nitric oxide synthase to N-acetylcysteine-induced increase of NO synthase activity in the brain of normotensive and hypertensive rats. O. Pechanova et al. *Physiological pharmacology*. 2009. P. 21–25.
26. Kumar P., Swain M., Pal A. Hyperglycemia-induced inflammation caused down-regulation of 8-oxoG-DNA glycosylase levels in murine macrophages is mediated by oxidative-nitrosative stress-dependent pathways. *The international journal of biochemistry*. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.02.006>.
27. Study of superoxide- and NO-dependet protective mechanisms of N-acetylcysteine and Losartan in rat's aorta and liver under streptozotocin – induced type 1 diabetes mellitus. I. Sytnyk, A. Burlaka, A. Vovk, M. Khaityovych. *Science Rise: Pharmaceutical Science*. 2017. № 6. С. 25–31.
28. Paul R., Phukan B., Justin Thenmozhi A. Melatonin protects against behavioral deficits, dopamine loss and oxidative stress in homocysteine model of Parkinson's disease. *Life science*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.11.016>.

29. Leeboonngam T., Pramong R., Sae-Ung K. Neuroprotective effects of melatonin on amphetamine-induced dopaminergic fiber degeneration in the hippocampus of postnatal rats. *Journal of pineal research*. 2018. <https://doi.org/10.1111/jpi.12456>.
30. Ji M., Xia D., Zhu L. Short- and Long-Term Protective Effects of Melatonin in a Mouse Model of Sepsis-Associated Encephalopathy. *Inflammation*. 2018. <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0708-0>.
31. Gomaa A., Galal H., Abou-Elgait A. Neuroprotective effects of melatonin administration against chronic immobilization stress in rats. *International journal of physiology, pathophysiology, pharmacology*. 2017. V. 9, № 2. P. 16–27.
32. Li B. Effect of melatonin on attenuating the isoflurane-induced oxidative damage is related to PKC α /Nrf2 signaling pathway in developing rats. *Brain research bulletin*. 2018. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.09.018>.
33. Доклінічне вивчення специфічної активності потенційних лікарських засобів первинної та вторинної нейропротекції: методичні рекомендації; І. С. Чекман та ін. Київ, 2016. 93 с.
34. Electron paramagnetic resonance in the experimental oncology: implementation examples of the conventional approaches. A. P. Burlaka et al. *BioNanoScience*. 2016. № 6 (4). P. 431–436.
35. Гимерх Ф. И. К определению глутатиона крови. *Лабораторное дело*. 1967. № 9. С. 564–566.
36. Метод определения активности каталазы. М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев. *Лабораторное дело*. 1988. № 1. С. 16–19.
37. Порушення у системі церулоплазмін-трансферин у хворих на рак прямої кишки. А. П. Бурлака, І. І. Ганусевич, В. В. Голотюк та ін. *Онкологія*. 2014. № 3. С. 206–210.
38. Adav S. S., Park J. E., Sze S. K. Quantitative profiling brain proteomes revealed mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Molecular brain*. 2019. № 1. URL: <http://dx.doi.org/10.1186/s13041-019-0430-y>.
39. Ifhar L. S., Ene H. M., Ben-Shachar D. Impaired heme metabolism in schizophrenia-derived cell lines and in a rat model of the disorder: Possible involvement of mitochondrial complex I. *European neuropsychopharmacology*. 2019. № 5 (29). URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2019.03.011>.
40. Beneficial effects of N-acetylcysteine on hepatic oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. L. R. Rosa et al. *Canadian Journal of physiology and pharmacology*. 2018. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2017-0559>.
41. Mitochondrial Perturbation Contributing to Cognitive Decline in Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetic Rats. Y. Zhou et al. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018. V. 46, № 4. P. 1668–1682.
42. N-Acetylcysteine improves mitochondrial function and ameliorates behavioral deficits in the R6/1 mouse model of Huntington's disease. D. J. Wright et al. *Translation psychiatry*. 2015. <https://doi.org/10.1038/tp.2014.131>.
43. Al-Nahdi T., John A., Raza H. Cytoprotective Effects of N-Acetylcysteine on Streptozotocin-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in RIN-5F Pancreatic β -Cells. *International journal of experimental cellular physiology, biochemistry and pharmacology*. 2018. № 1.
44. Ji M., Xia D., Zhu L. Short- and Long-Term Protective Effects of Melatonin in a Mouse Model of Sepsis-Associated Encephalopathy. 2018. *Inflammation*. <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0708-0>.
45. N-acetyl-L-cysteine attenuates oxidative damage and neurodegeneration in rat brain during aging. G. Garg, S. Singh, A. Singh, S. Rizvi. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2018. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2018-0209>.
46. Sex-specific effects of N-acetylcysteine in neonatal rats treated with hypothermia after severe hypoxia-ischemia. *Neuroscience research*. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2016.01.008>.
47. Vishnoi S., Raisuddin S., Parvez S. Glutamate Excitotoxicity and Oxidative Stress in Epilepsy: Modulatory Role of Melatonin. *Journal of environmental pathology, toxicology, oncology*. 2016. <https://doi.org/10.1615/JenvironPatholToxicolOncol.2016016399>.

О. А. Темірова, М. В. Хайтович, А. П. Бурлака, А. В. Вовк
Модифікуючий вплив N-ацетилцистеїну, мелатоніну та їхнього поєднання
на стан електронно-транспортного ланцюга мітохондрій та антиоксидантної
системи в головному мозку щурів за експериментального
цукрового діабету 1 типу

Мета дослідження – вивчення впливу N-ацетилцистеїну (НАЦц), мелатоніну (Мел) та їхнього поєднання на стан електронно-транспортного ланцюга (ЕТЛ) мітохондрій та антиоксидантної системи в головному мозку щурів за експериментального цукрового діабету (ЦД) 1 типу.

Дослідження проведені на щурах-самцях лінії Wistar. ЦД1 моделювали шляхом введенням стрептозоточину. Щури з індукованим ЦД1 отримували НАЦц (1500 мг/кг), Мел (10 мг/кг) та їхнє поєднання протягом 5 тижнів, починаючи з 15 доби після відтворення контрольної патології.

Згідно з результатами експериментальних досліджень, отриманих на моделі ЦД1 у щурів, було виявлено порушення ЕТЛ мітохондрій клітин головного мозку. Так, встановлене значне зменшення залізо-сірчаних білків у 4,6 разу ($p < 0,05$), а також радикалів убихінону в 2,5 разу ($p < 0,05$), тоді як рівень нітрозольних комплексів заліза зріс у 1,2 разу ($p < 0,05$) порівняно з групою інтактного контролю. Поєднане застосування НАцц і Мел у щурів зі стрептозотоциновим ЦД1 попереджувало зменшення рівня залізо-сірчаних білків і радикалів убихінону (у 2,0 разу порівняно з групою контрольної патології, $p < 0,05$), сприяючи нормалізації ЕТЛ мітохондрій і виявляючи тим самим антиоксидантний і антиапоптотичний вплив на клітини головного мозку. Застосування комплексу НАцц і Мел виявило найкращий антирадикальний ефект, сприяючи зниженню рівня генерування супероксидних радикалів у 1,7 разу ($p < 0,05$). Зростання рівня NO в 2,0 разу ($p < 0,05$) можливо пов'язане з нормалізацією активності ендотеліальної NO-синтази в разі застосування комплексу даних лікарських засобів.

Монотерапія НАцц і Мел була більш ефективною на кінцевих етапах оксидативного стресу. Зокрема, введення НАцц супроводжувалося зростанням у 1,8 разу рівня відновленого глутатіону ($p < 0,05$), тоді як Мел підвищував у 1,6 разу активність каталази ($p < 0,05$).

Окрім того, вказані лікарські засоби, особливо в разі їхнього поєданого застосування, нормалізували антиоксидантний захист крові щурів з ЦД1, про що свідчило наближення рівня трансферину, церулоплазміну та метгемоглобіну до значень інтактного контролю ($p < 0,05$).

Ключові слова: цукровий діабет 1 типу, N-ацетилцистеїн, мелатонін, мітохондрії, супероксидний радикал, глутатіон, каталаза

Е. А. Темирова, М. В. Хайтович, А. П. Бурлака, А. В. Вовк
Модифицирующее влияние N-ацетилцистеина, мелатонина и их сочетания на состоянии электронно-транспортной цепи митохондрий и антиоксидантной системы в головном мозге крыс при экспериментальном сахарном диабете 1 типа

Сахарный диабет (СД) является проблемой медико-социального и общечеловеческого значения. Почти у 80 % пациентов с СД встречается диабетическая энцефалопатия (ДЭ), что приводит к существенному ухудшению качества жизни. Основным фактором развития ДЭ при СД 1 типа (СД1) считается оксидативный стресс (ОС). Так, активация ОС, вызванного гипергликемией, вызывает избыточное образование реактивных форм кислорода и истощение системы антиоксидантной защиты, что приводит к энергетическому истощению и, как следствие, повреждению и гибели нейронов. Поэтому коррекция ОС считается одним из самых перспективных направлений церебропротекции при СД1.

Цель исследования – изучить влияние N-ацетилцистеина (НАцц), мелатонина (Мел) и их сочетания на состояние электронно-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий и антиоксидантной системы в головном мозге крыс при экспериментальном СД1.

Исследования проведены на крысах-самцах линии Wistar. СД1 моделировали путем введения стрептозотоцина. Крысы с индуцированным СД1 получали НАцц (1500 мг/кг), Мел (10 мг/кг) и их комбинацию в течение 5 недель, начиная с 15 суток после воспроизведения контрольной патологии.

Согласно результатам экспериментальных исследований, полученным на модели СД1 у крыс, были выявлены нарушения ЭТЦ митохондрий клеток головного мозга. Так, установлено значительное уменьшение железосерных белков в 4,6 раза ($p < 0,05$), а также радикалов убихинона в 2,5 раза ($p < 0,05$), тогда как уровень нитрозольных комплексов железа вырос в 1,2 раза ($p < 0,05$). Совместное применение НАцц и Мел у крыс со стрептозотоциновым СД1 предупреждало снижение уровня железосерных белков и радикалов убихинона (в 2,0 раза по сравнению с группой контрольной патологии, $p < 0,05$), способствуя нормализации ЭТЦ митохондрий и проявляя тем самым антиоксидантное и антиапоптотическое влияние на клетки головного мозга. Применение комплекса НАцц и Мел имело лучший антирадикальный эффект, способствуя снижению уровня генерирования супероксидных радикалов в 1,7 раза ($p < 0,05$). Рост уровня NO в 2,0 раза ($p < 0,05$) возможно связан с нормализацией активности ендотеліальної NO-синтази при совместном применении данных лекарственных средств.

Монотерапія НАцц і Мел була більш ефективною на кінцевих етапах ОС. В частности, введення НАцц супроводжувалося ростом в 1,8 разу рівня відновленого глутатіону ($p < 0,05$), тоді як Мел підвищував у 1,6 разу активність каталази ($p < 0,05$).

Указанные лекарственные средства, особенно при совместном применении, нормализовали показатели антиоксидантной защиты в крови у крыс с СД1, о чем свидетельствовало приближение уровня трансферрина, церулоплазмина и метгемоглобина ($p < 0,05$) к значениям интактного контроля.

Ключевые слова: сахарный диабет 1 типа, N-ацетилцистеин, мелатонин, митохондрии, супероксидный радикал, глутатіон, каталаза

O. A. Temirova, M. V. Khaitovych, A. P. Burlaka, A. V. Vovk
The modifying effect of N-acetylcysteine, melatonin and their combination on the state of the mitochondrial electron transport chain and antioxidant system in the rat brain at experimental diabetes type 1

Diabetes mellitus (DM) is an importance medico-social problem. Almost 80 % of patients with diabetes have diabetic encephalopathy (DE) which leads to a significant impairment in the quality of life. Oxidative stress (OS) is considered to be a major factor in the development of DE in type 1 diabetes (DM1). Thus, hyperglycemia-induced OS causes excessive formation of reactive oxygen species and depletion of the antioxidant protection system which lead to energy depletion and, as a result, neuronal damage and death. Therefore, OS correction is considered to be one of the most promising areas of cerebroprotection in DM1.

The purpose of the study was to investigate the effect of N-acetylcysteine (NAC), melatonin (Mel) and their combination on the state of mitochondrial electron transport chain (ETC) and antioxidant (AO) system in rats' brain with experimental DM1

Experiments were carried out on male Wistar rats. DM1 was induced by administration of streptozotocin (STZ). Rats with induced DM1 received NAC (1500 mg/kg), Mel (10 mg/kg) and their combination during 5 weeks, starting at 15 days after control pathology (CP) was reproduced.

According to the results of experimental studies, obtained in the rats' with DM1 model, disruption of mitochondrial ETC in brain cells was detected. Thus, it was found a significant decrease of sulfur-iron proteins in 4,6-times ($p < 0,05$) and ubiquinone radicals in 2,5-times ($p < 0,05$), while the level of iron nitrosol complexes was increased in 1,2-times ($p < 0,05$) to intact control values.

The combined effect of NAC and Mel in rats with streptozotocin DM1 prevented the decreasing in the level of sulfur-iron proteins and ubiquinone radicals (by 2,0-times compared with control pathology group, $p < 0,05$), contributing to the normalization of mitochondrial ETC and thereby exhibiting antioxidant and antiapoptotic effects in brain cells. Joint use of the NAC and Mel showed the best antiradical effect reducing superoxide radicals generation by 1,7-times ($p < 0,05$). An increase of NO level by 2,0-times ($p < 0,05$) indicates the endothelial protective effect of this medicines combination and. may be associated with a normalization of endothelial NO synthase activity.

Monotherapy of NAC and Mel was more effective in the final stages of OS. In particular, the administration of NAC was accompanied with increasing of the reduced glutathione level by 1,8-times ($p < 0,05$), whereas melatonin led to increase of catalase activity by 1,6-times ($p < 0,05$) versus CP group.

These medicines, especially in combination, normalized the AO system indices in the blood of rats with DM1, as evidenced by the approximation of transferrin, ceruloplasmin, and methemoglobin levels ($p < 0,05$) to intact control values.

Key words: type 1 diabetes mellitus, N-acetylcysteine, melatonin, mitochondria, superoxide radical, glutathione, catalase

Надійшла: 29 серпня 2019 р.

Прийнята до друку: 16 жовтня 2019 р.

Контактна особа: Темірова Олена Анатоліївна, асистент, кафедра клінічної фармакології та клінічної фармації, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, буд. 43, вул. Володимирська, м. Київ. Тел.: + 38 0 67 909 90 65. Електронна пошта: Ifitsner@gmail.com

С. О. Маркова¹, Л. К. Ващенко¹, К. В. Пісоченко¹,
О. І. Зацаринська¹, Т. В. Прийма¹, О. Ю. Чижавко¹,
Г. М. Войтенко², Н. В. Курділь²

Клінічний випадок успішного лікування токсичного гепатиту, зумовленого гострим отруєнням парацетамолом

¹Міська лікарня швидкої медичної допомоги, токсико-терапевтичне відділення,
м. Миколаїв

²Державне підприємство «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та
хімічної безпеки імені академіка Л. І. Медведя Міністерства охорони здоров'я України»,
м. Київ

Ключові слова: парацетамол, гострі
отруєння, гостра печінкова недостатність,
ацетилцистеїн

Сьогодні отруєння парацетамолом є одним з найпоширеніших і найнебезпечніших видів отруєння лікарськими засобами. В Україні кількість суїцидальних спроб з використанням парацетамолу в 2018 році зросла вдвічі порівняно з 2017 роком.

Мета дослідження – визначити динаміку клінічних і лабораторних показників у разі отруєння парацетамолом тяжкого ступеня, що ускладнилося розвитком гострої печінкової недостатності, та оцінити ефективність застосування антидотів і засобів фармакологічної корекції.

Описано випадок отруєння таблетками парацетамолу тяжкого ступеня в жінки 22 років.

Громадянка Я., 22 років, з суїцидальною метою прийняла 110 таблеток парацетамолу та 10 таблеток снодійного засобу. Загальна доза парацетамолу перевищила 250 мг/кг маси тіла. Проведене промивання шлунка та очищення кишечника. Розпочата інфузійна терапія розчинами кристалодів, глюкози, сорбітолу, натрію гідрокарбонату 4 %. Призначене лікування: ацетилцистеїн (140 мг/кг/добу), тіоктова кислота (20 мг/кг/добу), силібінін (20 мг/кг/добу), адеметіонін (400 мг/добу), аргініну глутамат (40 %, 5,0 мл/добу), дексаметазон (8 мг/добу). Через 24 год зареєстровано різке підвищення

рівня ферментів АсАт (аспартатаміно-трансферази), АлАт (аланінаміно-трансферази), ГГТП (гамма-глутаміл-трансферази), явища коагулопатії. Зміни набули максимальних значень через 48 год після поступлення. АсАт – 19 740 Од/л (норма – до 32 Од/л), АлАт – 14 800 Од/л (норма – до 33 Од/л), ГГТП – 157 Од/л (норма – до 32 Од/л); ПТІ (протромбінний індекс) – 13,0 %, МНО (міжнародне нормалізоване відношення) – 4, АЧТЧ (активованій частковий тромбопластиновий час) – 48. Відмічені пожовтіння склери очей і шкіри, збільшення живота, збільшення печінки, асцит, з'явилися кров'янисті виділення з піхви, зниження діурезу. Призначено свіжозаморожену плазму, вітамін К, етамзилат, фуросемід, спіронолактон, дексаметазон, пентоксифілін. На п'яту добу лікування була відмічена позитивна динаміка біохімічних показників крові, а на 16 добу лікування пацієнтка була виписана в задовільному стані.

Висновки

Проблема гострих отруєнь парацетамолом залишається актуальною в практиці лікаря-токсиколога. Використання антидота АЦЦ дає позитивний результат у разі своєчасного звернення пацієнта за медичною допомогою. Токсичний гепатит, панкреатит і ниркова недостатність є типовими ускладненнями тяжкого отруєння парацетамолом і потребують складного комплексного лікування. Біологічними маркерами токсичного процесу є рівні в крові АсАт, АлАт, ГГТП і ПТІ.

С. О. Маркова¹, Л. К. Ващенко¹, К. В. Писоченко¹,
Е. И. Зацаринская¹, Т. В. Прийма¹, Е. Ю. Чижавко¹,
Г. М. Войтенко², Н. В. Курдиль²

Клинический случай успешного лечения токсического гепатита, обусловленного острым отравлением парацетамолом

¹Городская больница скорой медицинской помощи,
токсико-терапевтическое отделение, г. Николаев

²Государственное предприятие «Научный центр превентивной токсикологии,
пищевой и химической безопасности имени академика Л. И. Медведя
Министерства здравоохранения Украины», г. Киев

Ключевые слова: парацетамол, острые отравления, острая печеночная недостаточность, ацетилцистеин

Сегодня отравления парацетамолом являются одними из наиболее распространенных и наиболее опасных видов лекарственных отравлений. В Украине количество суицидальных попыток с участием парацетамола в 2018 году выросла вдвое по сравнению с 2017 годом.

Цель исследования – изучить динамику клинических и лабораторных показателей при отравлении парацетамолом тяжелой степени, осложненного развитием острой печеночной недостаточности, и оценить эффективность применения антидотов и средств фармакологической коррекции.

Описан случай отравления таблетками парацетамола тяжелой степени у женщины 22 лет.

Гражданка Я., 22 лет, с суицидальной целью приняла 110 таблеток парацетамола и 10 таблеток снотворного средства. Общая доза принятого парацетамола превысила 250 мг/кг массы тела. Проведено промывание желудка и кишечника. Назначена инфузионная терапия: растворы кристаллоидов, глюкозы, сорбитола, натрия гидрокарбоната 4 %. Назначено медикаментозное лечение: ацетилцистеин (140 мг/кг/день), тиоктовая кислота (20 мг/кг/день), силибинин (20 мг/кг/день), адеметионин (400 мг/день), аргинина глутамат (40 %, 5,0 мл/день), дексаметазон (8 мг/день). Через

24 ч зарегистрированы высокие уровни ферментов АсАт, АлАт, ГГТП, явления коагулопатии. Изменения достигли максимальных значений через 48 ч после поступления. АсАт – 19740 Ед/л (норма – до 32 Ед/л), АлАт – 14800 Ед/л (норма – до 33 Ед/л), ГГТП – 157 Ед/л (норма – до 32 Ед/л); ПТИ – 13,0 %, МНО – 4, АЧТВ – 48. Отмечены пожелтение склер и кожи, увеличение живота, увеличение печени, асцит, появились кровянистые выделения из влагалища, уменьшение диуреза. Назначены свежемороженая плазма, витамин К, этамзилат, фуросемид, спиронолактон, дексаметазон, пентоксифиллин. На пятые сутки лечения началась нормализация биохимических показателей крови, а на 16 сутки лечения пациентка была выписана в удовлетворительном состоянии.

Выводы

Проблема острых отравлений парацетамолом остается актуальной в практике врача-токсиколога. Использование антидота АЦЦ дает положительный результат при своевременном обращении пациента за медицинской помощью. Токсический гепатит, панкреатит и почечная недостаточность являются типичным осложнением тяжелого отравления парацетамолом и требуют сложного комплексного лечения. Биологическими маркерами токсического процесса являются значения в крови АсАт, АлАт, ГГТП и ПТИ.

S. O. Markova¹, L. K. Vashchenko¹, K. V. Pesochenko¹,
O. I. Zatsarinskaya¹, T. V. Priyma¹, O. Yu. Chizhavko¹,
G. M. Voitenko², N. V. Kurdil²

Clinical Case of Successful Treatment of Toxic Hepatitis Caused by Acute Paracetamol Poisoning

¹City Emergency Hospital, Toxic Therapy Department, Mykolaiv

²SC «L. I. Medved's Scientific Center for Preventive Toxicology, Food and Chemical Safety of the Ministry of Health of Ukraine», Kyiv

Key words: paracetamol, acute poisoning, acute liver failure, Acetylcysteine

Today, paracetamol poisoning is one of the most common and most dangerous types of drug poisoning. In Ukraine, the number of suicide attempts involving paracetamol in 2018 has doubled compared to 2017.

The aim was to investigate the dynamics of clinical and laboratory indicators for severe paracetamol poisoning, complicated by the development of acute liver failure, and evaluate the effectiveness of antidotes and pharmacological remedies use.

Case of severe paracetamol tablets poisoning in a 22 years old woman is considered. The treatments were conducted in the toxic-therapeutic department of the hospital of emergency medical aid of the city of Mykolaiv in 2018. Data of clinical, laboratory, functional research methods was analysed.

In June 2018, 22 years old woman, a student, was brought to the toxic-therapeutic department of the hospital of first aid in Mykolaiv. Relatives informed that on the eve of the evening the woman had swallowed a large number of various pills, mainly paracetamol, for suicidal purposes. She also tried to cut the veins in her forearm. The patient bought paracetamol tablets the same day at various drugstores in the city; 110 tablets (200, 350 and 500 mg) of paracetamol and 10 sleeping pills were purchased. According to approximate estimates, the total dose of paracetamol taken exceeded 250 mg/kg body weight. Diagnosed: acute household drugs poisoning (paracetamol, hypnotics). Suicidal attempt. Cut wounds of forearms of both hands.

The were gastric lavage and bowel cleansing carried out. Appointed antidote – ACC (Acetylcysteine, NAC – 140 mg/kg/day); hepatoprotective means: Thiocctic acid (20 mg/kg/day), Silibinin (20 mg/kg/day), Ademetionine (400 mg/day), Arginine glutamate (40 %, 5.0 ml/day), Dexamethasone (8 mg/day). After 24 hours a sharp increase in the level of ASAT – 1073 U/l (normal – up to 32 U/l), ALAT – 1116 U/l (normal – up to 33 U/l), GGTP – 57 (normal – up to 32 U/l) and decrease in prothrombin index (PTI) – 38.0% (normal – 97–100 %), INR – 2 (normal – 0.85–1.35), APTCH – 34 (normal – 24.0–34.0 sec.) were established. After 48 h, the indicators reached maximum values: ASAT – 19 740 U/l, ALAT – 14 800 U/l, GGTP – 157 U/l. However, the indicator of PTI critically decreased to 13.0%, increased indicators of INR – 4, APTCH – 48. At the same time appeared yellowing of the sclera of the eyes and skin, enlargement of the abdomen, enlargement of the liver, ascites, appeared bleeding discharge from vagina. The urine output decreased. The neurological statues of the patient worsened; drowsiness and negativism were noted. During ultrasound examination of abdominal organs, enlargement of the liver and presence of free fluid were noted. After a consultation, it was decided to continue the treatment with antidotes, sorbents, glucose solutions, crystalloids, fresh frozen blood plasma. Additionally were prescribed: vitamin K, Etamsylate, Furosemide, Spironolactone, Dexamethasone and Pentoxifylline. On the fifth day of treatment, positive dynamics of blood biochemical parameters were noted: ASAT – 240 U/l, ALAT – 3495 U/l, PTI – 61 %, daily diuresis

increased. On the 14th day of treatment, the second examination of abdominal organs showed positive dynamics, normal liver size, pancreas and kidney with no pathology; free fluid in the abdomen was not detected. A psychiatrist examined the patient. On the 16th day of treatment, the patient was discharged in satisfactory state. At the time of discharge, the patient did not have any complaints. Consultation of family physician, diet and hepatoprotectors (Silibinin) were recommended during one month. Abdominal ultrasound control and laboratory control of blood biochemical parameters were recommended to be performed one month later.

ORCID ID авторів:

Курділь Н. В. (ORCID ID 0000-0001-7726-503X).

Conclusions

The problem of acute poisoning with paracetamol remains urgent in toxicology practice due to significant increase in the number of such poisonings among patients of different age groups. Using an antidote, ACC (Acetylcysteine, NAC) is effective in case of timely treatment of patients. The development of toxic hepatitis, pancreatitis and renal failure are typical complications of acute paracetamol poisonings and require complex treatment. The biomarkers of toxic process are ASAT, ALAT, GGTP in blood, PTI and INR.

Надійшла: 1 вересня 2019 р.

Прийнята до друку: 16 жовтня 2019 р.

Контактна особа: Курділь Наталія Віталіївна, старший науковий співробітник, ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л. І. Медведя МОЗУ», буд. 6, вул. Героїв Оборони, м. Київ, 03680. Тел.: + 38 050 462 00 02. Електронна пошта: kurdil_nv@ukr.net.

Непролиферативные и пролиферативные поражения женской репродуктивной системы крыс и мышей

(по материалам Проекта INHAND (Международная гармонизация номенклатуры и диагностических критериев поражения крыс и мышей)

D. Dixon, R. Alison, U. Bach et al. Nonproliferative and Proliferative Lesions of the Rat and Mouse Female Reproductive System. J. Toxicol Pathol. 2014. V. 27 (3&4 Suppl). 1S–107S

Продолжение, начало в Т. 13, № 2/2019–Т. 13, № 4/2019

Фолликул, лютеинизированный (N) яичник (рис. 43 и 44)

Вид

Мышь, Крыса

Синонимы

Лютеинизированный, невалютационный фолликул; Лютеинизированный неконтролируемый фолликул

Модификация

Кистозный

Патогенез/клетка происхождения

В общем, лютеинизированный фолликул (LF) развивается в результате недостаточной секреции лютеинизирующего гормона (ЛГ) в период до овуляции или от ингибирования циклооксигеназы 2. Третичный фолликул развивается нормально, но не овулирует, а под влиянием низких уровней ЛГ гранулезные клетки трансформируются в лютеиновые клетки.

Диагностические признаки:

– отличительной чертой лютеинизированного фолликула является

наличие удерживаемого (дегенерирующего) ооцита в лютеинизированной структуре, подобной желтому телу;

- выстлан от одного до нескольких слоев кубовидными или сплюснутыми гранулезными клетками, покрывающимися на тонкой стенке и часто окруженными текальными клетками;
- частичная лютеинизация гранулезных клеток, выстилающих стенку, очевидна;
- лютеинизация часто асимметрична в фолликулярной стенке;
- не больше, чем нормальный поздний третичный фолликул;
- кистозный лютеинизированный фолликул больше, чем нормальный третичный фолликул, и имеет центральную полость, которая содержит невосстановленный ооцит.

Дифференциальные диагнозы

Для фолликулов, лютеинизированных: Поздний третичный (превуляторный) фолликул:

- содержит ооцит и хорошо развитый текальный слой;
- отсутствует лютеинизация.

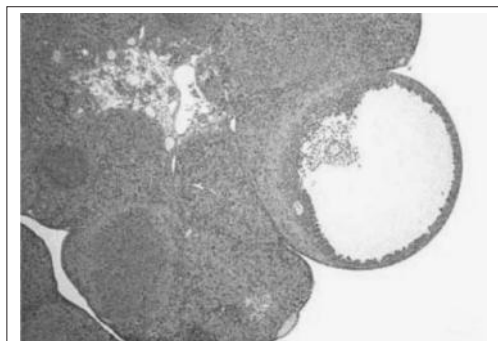


Рис. 43. Кистозный лютеинизированный фолликул, яичник, крыса

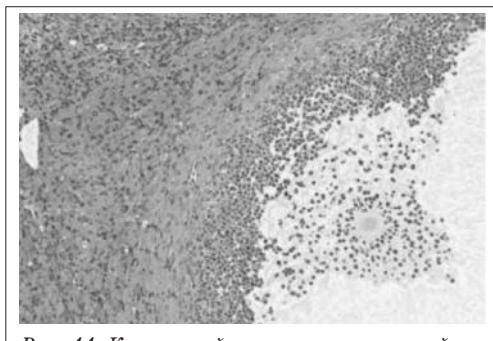


Рис. 44. Кистозный лютеинизированный фолликул. Отмечено вовлечение stromal oophorus complex, яичник, крыса

Атретический поздний третичный фолликул:

- содержит дегенерирующий ооцит;
- слои гранулезных клеток варьируют от нескольких до многих;
- в гранулезных клетках – апоптоз;
- не больше, чем нормальный поздний третичный фолликул.

Для фолликула, лютеинизированного, кистозного:

Киста фолликулярная:

- тонкостенная, заполненная бледно-ацидофильным до амфобильного остатком или кровью, эпителий равномерно кубовидный;
- отсутствует лютеинизация;
- может содержать вырожденный ооцит.

Киста лютеинизированная:

- выстлана от одного до нескольких слоев крупными многоугольными лютеинизированными клетками;
- полная лютеинизация; по существу нет областей нелютеинизированных гранулезных клеток;
- больше, чем нормальное желтое тело;
- центральная полость не содержит вырожденный ооцит.

Киста эпителиальная:

- присутствует в яичнике;
- выстлана сплюснутым кубовидным (до нижнего столбчатого) эпителием.

Киста бурсальная:

- обволакивает яичник, но не присутствует в пределах его самого;
- выстлана простым плоскоклеточным эпителием.

Киста, неспецифическая:

- если источник или тип кисты яичника не является очевидным, термин «киста неспецифическая» может быть наиболее подходящим диагнозом.

Комментарий

При действии Ehemestane, перорального стероидного ингибитора ароматазы, присутствие ооцитов в лютеинизированных структурах встречается в дополнение к отсутствию недавних базофильных желтых тел, повышенной атрезии антральных фолликулов и интерстициальной клеточной гиперплазии. Считалось, что вызванные лекарственными средствами повышенные уров-

ни цАМФ ответственны за это явление. Ингибиторы циклооксигеназы 2 (COX-2) или агонисты PPAR γ предотвращают овуляцию (захваченный *Cumulus Oophorus Complex*, СОС) путем ингибирования фолликулярного разрыва, и это также приводит к возникновению лютеинизированных фолликулов у грызунов. Захваченные СОС можно найти в фолликулах, но также и внутри интерстиция яичника. Сообщалось, что ослизнение связанных с ооцитом гранулезных клеток в СОС начинается слишком рано из-за распада внеклеточного матрикса. Ослизнение *cumulus oophorus* обычно происходит перивуляторно и в основном вне яичника, после овуляции.

Вакуолизация, текальная клетка (N), яичник (рис. 45)

Вид

Мышь, Крыса

Модификации

Увеличение, Снижение

Патогенез/клетка происхождения

Вакуолизация текальных клеток может происходить из-за ингибирования синтеза стероидов, приводящего к накоплению липидов внутри клеток. Другие клетки, продуцирующие стероиды, такие как клетки надпочечников, также могут быть затронуты.

Диагностические признаки:

- текальные клетки имеют нормальную мелкую вакуолизацию, связанную с синтезом стероидов, увеличение и уменьшение вакуолизации

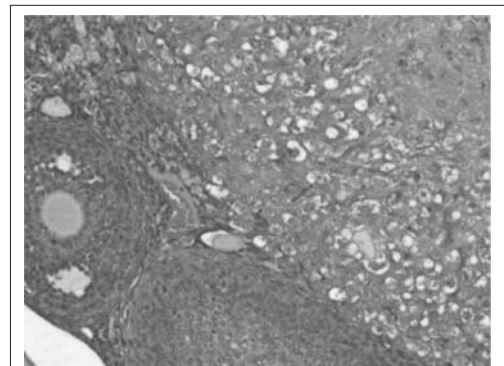


Рис. 45. Вакуолизация, текальная клетка, яичник, мышь

должно быть больше или меньше соответственно, чем обычно;

- клетки с повышенной вакуолизацией могут оказаться больше обычного размера.

Дифференциальные диагнозы

Вакуолизация, интерстициальная клетка:

- интерстициальные клетки имеют нормальную мелкую вакуолизацию, связанную с синтезом стероидов, повышенная вакуолизация должна быть больше, чем обычно;
- клетки с повышенной вакуолизацией могут оказаться больше обычного размера.

Фосфолипидоз:

- вакуоли, присутствующие в цитоплазме клеток;
- в ультраструктуре вакуоли имеют аномальные слоистые включения.

Комментарий

Увеличение или уменьшение вакуолизации может быть связано с изменениями синтеза стероидов или фосфолипидозом. Катионные амфифильные соединения могут вызывать фосфолипидоз. При ультраструктурном исследовании вакуоли содержат аномальные ламелированные включения.

Вакуолизация, гранулезная клетка (N), яичник (рис. 46)

Вид

Мышь, Крыса

Синонимы

Жировые изменения

Модификации

Увеличение, Снижение

Патогенез/клетка происхождения

Вакуолизация гранулезных клеток может произойти из-за ингибирования синтеза стероидов, приводящего к накоплению липидов внутри клеток. Другие клетки, продуцирующие стероиды, такие как клетки надпочечников, также могут быть затронуты.

Диагностические признаки:

- у гранулезных клеток нормальная мелкая вакуолизация, связанная с

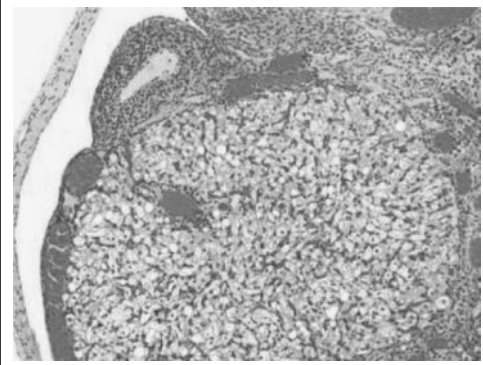


Рис. 46. Вакуолизация, гранулезная клетка, яичник, крыса

синтезом стероидов, увеличение и уменьшение вакуолизирования должно быть, соответственно, больше или меньше, чем обычно;

- клетки с повышенной вакуолизацией могут оказаться больше обычного размера.

Дифференциальные диагнозы

Нет.

Комментарий

Увеличение или уменьшение вакуолизации может быть связано с изменениями синтеза стероидов или фосфолипидозом. Катионные амфифильные соединения могут вызывать фосфолипидоз. При ультраструктурном исследовании вакуоли содержат аномальные ламелированные включения.

Вакуолизация, интерстициальная клетка (N), яичник (рис. 47)

Вид

Мышь, Крыса

Синонимы

Жировые изменения

Модификации

Увеличение, Снижение

Патогенез/клетка происхождения

Вакуолизация интерстициальных клеток может произойти из-за ингибирования синтеза стероидов, приводящего к накоплению липидов внутри клеток. Другие клетки, продуцирующие стероиды, такие как клетки надпочечников, также могут быть затронуты.

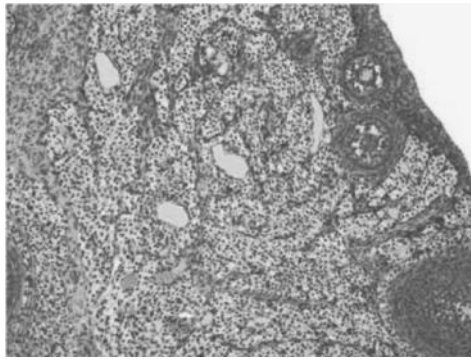


Рис. 47. Вакуолизация, интерстициальная клетка, яичник, крыса

Диагностические признаки:

- интерстициальные клетки имеют нормальную мелкую вакуолизацию, связанную с синтезом стероидов, увеличение и уменьшение вакуолизации должно быть больше или меньше, чем обычно;
- клетки с повышенной вакуолизацией могут оказаться больше обычного размера.

Дифференциальные диагнозы

Вакуолизация, текальная клетка:

- прекрасная вакуолизация, связанная с синтезом стероидов, повышенная вакуолизация должна быть больше, чем обычно;
- клетки с повышенной вакуолизацией могут оказаться больше обычного размера.

Гипертрофия, интерстициальная клетка:

- интерстициальные клетки, расположенные в пачках (*cords*) или гнездах (*nests*), увеличены и полиэдральны с достаточно прозрачной бледно-эозинофильной, иногда вакуолизированной цитоплазмой;
- снижение ядерно-цитоплазматического отношения.

Комментарий

Увеличение или уменьшение вакуолизации может быть связано с изменениями синтеза стероидов или фосфолипидом. Катионные амфифильные соединения могут вызывать фосфолипидоз. При ультраструктурном исследовании вакуоли содержат аномальные ламелированные включения.

Вакуолизация, желтое тело (N), яичник (рис. 48 и 49)

Вид

Мышь, Крыса

Патогенез/клетка происхождения

Вакуолизация лютеиновых клеток может произойти из-за ингибирования синтеза стероидов, приводящего к накоплению липидов в клетке. Лютеальные клетки также могут быть затронуты в случаях фосфолипидоза.

Диагностические признаки:

- микровезикулярная или макровезикулярная цитоплазматическая вакуолизация лютеиновых клеток в желтом теле, отличная от желтого тела самой последней овуляции при диэструсе/проэструсе;
- лютеиновые клетки могут увеличиваться;
- отсутствие значительного лютеолиза в пораженном желтом теле;

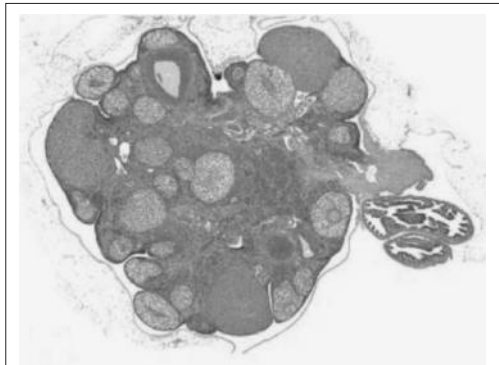


Рис. 48. Вакуолизация, желтое тело, яичник, крыса

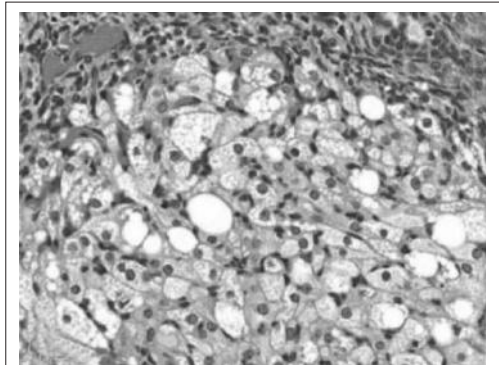


Рис. 49. Вакуолизация, желтое тело, яичник, крыса

- общий размер желтого тела может быть увеличен.

Дифференциальные диагнозы

Гипертрофия, желтого тела
 Нормальная вакуолизация:

- микровезикулярная вакуолизация является нормальной в желтом теле самой последней овуляции во время диэструса и раннего проэструса;
- макровезикулярная вакуолизация с лютеолизом является нормальной в желтом теле самой последней овуляции в период от середины до позднего проэструса.

Комментарий

Вакуолизация обычно наблюдается как часть дегенерации, наблюдаемой при проэструсе; это не должно быть диагностировано. Рост числа вакуолизованных желтых тел или вакуолизации, наблюдаемой в желтом теле самой последней овуляции, отличной от проэструса, должны быть диагностированы. Вакуолизованные желтые тела были описаны с антрациклиновыми соединениями. Пеннистая цитоплазматическая вакуоляция может быть показателем фосфолипидоза. Фосфолипидоз можно индуцировать катионными амфифильными соединениями. При ультраструктурном анализе вакуоли содержат аномальные пластинчатые включения. Вакуолизация может вызвать увеличение лютеиновых клеток, и ее может быть трудно отличить от лютеиновой гипертрофии.

Минерализация (N) яичника (рис. 50 и 51)

Вид

Мышь, Крыса

Модификации

Ооциты, желтые тела, интерстициальные клетки

Патогенез/клетка происхождения

Неопределенная этиология.

Диагностические признаки:

- минерализация ооцитов, желтых тел и интерстициальных клеток характеризуется зернистым базофильным

материалом, частично или полностью заменяющим структуры резидентов.

Дифференциальные диагнозы
 Нет.

Комментарий

Минерализация ооцитов и интерстициальных клеток яичника может стать более заметной в преклонном возрасте.

Инфильтрация, воспалительная клетка (N) яичника (рис. 52)

Вид

Мышь, Крыса

Модификации

Эозинофильная; гистиоцитарная; нейтрофильная; лимфобластная; мононуклеарная; смешанная

Патогенез/клетка происхождения

Перемещение воспалительных клеток из крови, кости, костного мозга

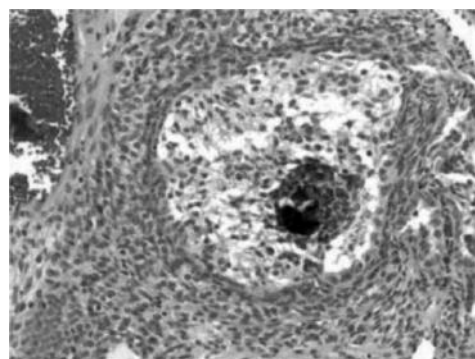


Рис. 50. Минерализация ооцита, яичник, крыса

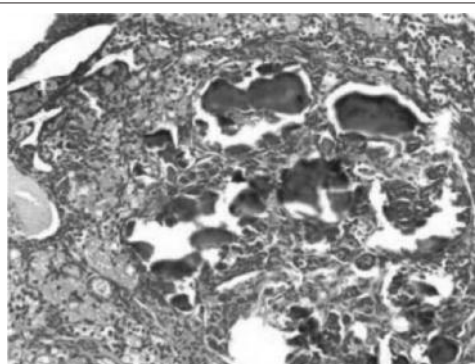


Рис. 51. Минерализация, интерстициальные клетки, яичник, крыса

или гемолимфатических органов в ткани в результате усиления секреции интерлейкинов и/или специфических клеточных хемоаттрактантов.

Диагностические признаки:

- инфильтрация воспалительных клеток в паренхиме яичника;
- основной тип(ы) клеток, содержащих инфильтрат, зависит от производимых специфических интерлейкинов и хемоаттрактантов;
- модификация воспалительной инфильтрации определяется по основному типу клеток, содержащих инфильтрат (его включают > 50 % клеток); если нельзя определить такой тип, так как ни один тип клеток не содержит > 50 % клеток с инфильтратом, то нужно применять термин «смешанный тип» инфильтрации;
- термины «инфильтрат», «воспалительная клетка», «моноклеар», как правило, используются для смешанных инфильтраций, состоящих преимущественно из (> 50 %) лимфоцитов, плазматических клеток, моноцитов и/или гистиоцитов, или когда тип конкретной несегментированной клетки не может быть распознан, но инфильтрат содержит не менее 50 % популяции клеток.

Дифференциальные диагнозы:

Саркома, гистиоцитарная:

- равномерная популяция округлых или овальных клеток с обильной пенистой, эозинофильной цитоплаз-

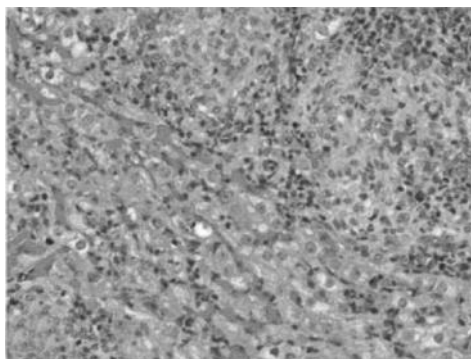


Рис. 52. Воспалительный клеточный инфильтрат, моноклеарный, яичник, крыса

мой и удлинёнными или сплюснутыми ядрами; палисадные опухолевые клетки, окружающие некротические фокусы; митотические фигуры могут быть многочисленными. Опухолевые клетки также обнаруживаются в других органах.

Лимфома, злокачественная:

- мономорфные моноклеарные клетки с клеточной атипией или митотические фигуры, вторгающиеся по всей паренхиме. Обычно не видны гигантские клетки, а селезенка и лимфатические узлы часто остаются не вовлеченными. Опухолевые клетки также могут быть обнаружены в других органах.

Воспаление яичника (любой тип):

- инфильтрация воспалительных клеток (гранулоциты, макрофаги, лимфоциты, плазматические клетки, смешанные), сопровождаемая другими воспалительными изменениями (застой, отеки, кровоизлияния, экссудат, некроз, фиброз и т. д.) в ткани.

Воспаление яичника (N), яичник
(рис. 53)

Вид

Мышь, Крыса

Синонимы

Оофорит

Модификации

Нейтрофильное, лимфобластное, моноклеарное, смешанное. Другие модификации включают гнойные, гранулематозные

Патогенез/клетка происхождения

Повреждение нормального слизистого кожного барьера или прямое введение патогенных организмов в организм и вторичное вовлечение яичника через септицемию. Дополнительно, бактерии могут существовать в организме как скрытые инфекции, и при соответствующих условиях, таких как тяжелый стресс, токсичность или неоплазия и химически индуцированная иммуносупрессия, они могут вызывать тяжелые заболевания с бактериемией или септицемией и изредка – с участием яичника.

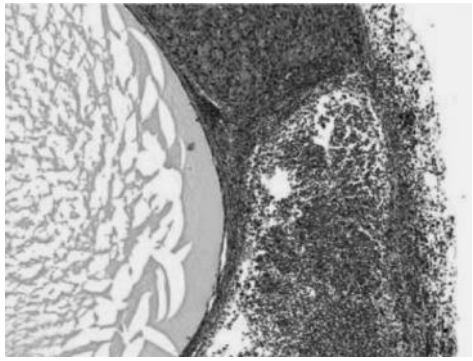


Рис. 53. Воспаление нейтрофильное, яичник, крыса

Диагностические признаки:

- инфильтрация воспалительных клеток в паренхиме яичника, и иногда переходит к яйцеводу или в периварикальный жир;
- доказательства дегенерации/некроза/регенерации тканей присутствуют вместе с другими свидетельствами воспалительного ответа: кровоизлияние, скопление, отек, экссудат, фиброплазия, ангиоэктомия, фиброз;
- могут присутствовать болезнетворные организмы;
- основные вовлеченные клетки различаются в зависимости от возбуждающего агента и воспалительного процесса; модификация воспаления должна определяться основным типом клеток (охватывать как минимум 50 % клеток);
- гранулематозное воспаление имеет эпителиоидные макрофаги как преобладающий тип клеток; иногда наблюдаются фиброз и образование гигантских клеток;
- гнойное воспаление – это специфический диагноз, который предполагает преимущественно нейтрофильное воспаление и большие площади некротической ткани и образования абсцессов.

Дифференциальные диагнозы:

Саркома гистиоцитарная:

- равномерная популяция округлых или овальных клеток с обильной пенистой, эозинофильной цитоплазмой и удлиненными или сплюснутыми ядрами; палисадные опухолевые клетки, окружающие некроти-

ческие фокусы; митотические фигуры могут быть многочисленными. Опухолевые клетки также обнаруживаются в других органах.

Лимфома злокачественная:

- мноморфные мононуклеарные клетки с клеточной атипией или митотические фигуры, вторгающиеся во всю паренхиму. Обычно не видны гигантские клетки, а селезенка и лимфатические узлы часто остаются не вовлеченными. Опухолевые клетки также могут быть обнаружены в других органах.

Инфильтрация, воспалительная клетка:

- инфильтрация воспалительных клеток (гранулоцитарная, макрофагальная, лимфоцитарная, плазматических клеток, смешанная), но другие воспалительные изменения (застой, отек, кровоизлияние, экссудат, некроз, фиброз и т. д.) отсутствуют или степень их выраженности ограничена.

Комментарий

Редко встречается у крыс и мышей. Может наблюдаться при системных инфекциях, вызванных *Mycoplasma pulmonis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pasteurella pneumotropica*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Corynebacterium kutscheri*.

Возрастная атрофия (N) яичника (рис. 54)

Вид

Мышь, Крыса

Патогенез/клетка происхождения

Прекращение нормального эстрального цикла, вызванное возрастом,

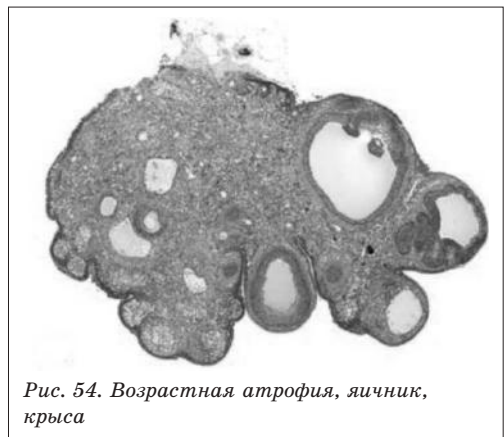


Рис. 54. Возрастная атрофия, яичник, крыса

истощение первичных фолликулов и изменения эндокринной системы, отзывчивость гипоталамо-гипофизарной оси яичников. Результат репродуктивного старения у самки.

Диагностические признаки:

- меньше, чем циклирующий яичник;
- уменьшение количества ооцитов, фолликулов и желтых тел;
- мало или нет первичных фолликулов;
- фолликулы и желтые тела, которые присутствуют, не типичны для нормальной стадии эстрального цикла. В основном три шаблона:
 - мало или нет растущих или антральных фолликулов; желтые тела видимы;
 - никаких желтых тел или недавних желтых тел; видимы большие атретические фолликулы; могут иметься кистозные фолликулы;
 - никаких желтых тел или недавних желтых тел; мало или вообще нет растущих фолликулов;
 - в строме видны избыточные интерстициальные клетки;
 - у пожилых мышей тяжи эпителиальных клеток и каналцев видимы и пронизывают интерстициальную ткань железы;
 - у пожилых крыс часто возникает атрофия яичников, связанная с гиперплазией ряда клеток половой системы стромального происхождения (гранулезные клетки, клетки тека, клетки Сертоли, клетки Лейдига и фибробласты стромального происхождения) и с липофусцином.

Дифференциальные диагнозы:

- Атрофия, вызванная ксенобиотиками или радиацией:
- ксенобиотик-индуцированная атрофия яичников может возникнуть в

результате воздействия радиации или химических веществ, поражающих примордиальные или первичные фолликулы или те, которые отвечают за синтез/высвобождение половых гормонов. Морфологическая дифференциация спонтанной возрастной атрофии от химически индуцированной атрофии яичников у пожилых животных затруднена.

Комментарий

Морфологические закономерности возрастной атрофии яичников варьируют и зависят от многих факторов. Морфология влагалища или матки часто зависит от изменений в яичнике. Если в яичнике имеются видимые атретические или кистозные фолликулы и не хватает желтых тел, во влагалище может отмечаться ороговение, что указывает на увеличение соотношения 17 бета-эстрадиола/прогестерона (постоянный эструс). Альтернативно, животные с видимыми желтыми телами иногда имеют вагинальную муцификацию, указывающую на снижение соотношения 17 бета-эстрадиола/прогестерона (то есть, постоянный диэструс). Возрастная атрофия яичника также сильно зависит от множества факторов, включая вид животных, их породу/линию и условия содержания. Возрастная атрофия яичников часто не диагностируется в исследованиях канцерогенности, и ее возникновение у пожилых животных, видимо, недооценивается.

Матеріал підготували:

*Л. Б. Бондаренко, А. В. Матвієнко,
ДУ «Інститут фармакології
та токсикології НАМНУ»*

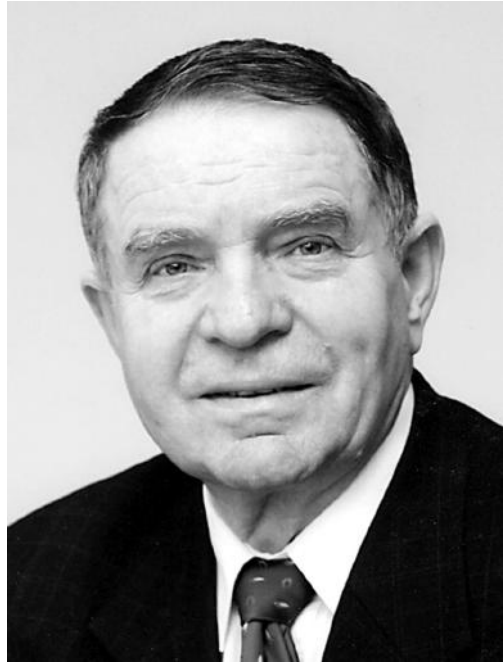
Пам'яті члена-кореспондента НАН і НАМН України, професора, доктора медичних наук Івана Сергійовича Чекмана

26 жовтня 2019 року зупинилося серце видатного вченого, фундатора сучасної української фармакології Івана Сергійовича Чекмана. Іван Сергійович був членом-кореспондентом НАН і НАМН України, професором, доктором медичних наук, членом-кореспондентом Нью-Йоркської академії наук, почесним професором Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського. І. С. Чекман очолював кафедру фармакології (фармакології та клінічної фармакології в 1982–2014 рр.) Київського медичного інституту, надалі Національного медичного університету імені О. О. Богомольця майже півсторіччя (1982–2016 рр.).

І. С. Чекман народився 4 жовтня 1936 року в селі Чаньків Дунаєвецького району Хмельницької області в родині колгоспників. Він рано втратив батька, який у перші дні війни пішов добровольцем на фронт і загинув смертю хоробрих у боях під Харковом у 1943 році.

Після закінчення Чаньківської семирічної школи І. С. Чекман вступив до Кам'янець-Подільського медичного училища. Продовжив навчання у Вінницькому медичному інституті (1955 р.) і став студентом новоутвореного Тернопільського медичного інституту (1958 р.), який закінчив (1961 р.) з відзнакою. За розподіленням Іван Сергійович поїхав на роботу головним лікарем до Лонковецької дільничної лікарні Волочинського району Хмельниччини, через рік став головним лікарем Курилівської дільничної лікарні цього району.

Потяг до більш глибоких знань з лікознавства став підставою для вступу Івана Сергійовича Чекмана в 1963 році до аспірантури на кафедру фармакології Київського медичного інституту, яку очолював всесвітньо відомий вчений академік Олександр Ілліч Черкес.



У 1966 році Іваном Сергійовичем Чекманом була успішно захищена кандидатська дисертація на тему «Експериментальні дослідження похідних пропініламіну», в якій розкриті нові механізми дії інгібіторів MAO. На посаді асистента кафедри фармакології Іван Сергійович Чекман перебував з 1966 по 1969 роки, упродовж 1969–1972 років був обраний на посаду доцента, а з 1972 року – завідувачем кафедри фармакології. У 1982–2014 роках Іван Сергійович очолював кафедру фармакології та клінічної фармакології Київського медичного інституту, надалі – кафедру фармакології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця (2015–2016 рр.). У 1987–1991 роках він був директором Київського НДІ фармакології та токсикології МОЗ УРСР (нині ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»). У 1973 році він захистив докторську дисертацію на тему «Експериментальні дослідження механізмів дії

антиадренергічних засобів», у рамках якої вперше в світі встановив фізико-хімічний механізм дії симпатолітика резерпіну, що стосується його впливу на процеси депонування.

Івану Сергійовичу Чекману був притаманний потяг до малодосліджених і перспективних проблем фармакологічної та токсикологічної науки, широкий спектр яких свідчив не тільки про його професіоналізм, а й блискучу ерудицію, дослідницький хист і наукову інтуїцію. Наукові дослідження І. С. Чекмана охоплюють широке коло медичних проблем – загальна, біохімічна, фізико-хімічна, квантово-хімічна, радіаційна, клінічна фармакологія, нанофармакологія, токсикологія, експериментальна та клінічна фітотерапія.

І. С. Чекмана вважають одним з засновників вітчизняної фізико-хімічної, квантової та нанофармакології. У галузі загальної фармакології І. С. Чекман уперше експериментально встановив, що в розвитку первинної фармакологічної реакції основне значення має властивість ліків утворювати комплекси з біолігандами (альбуміном, амінокислотами, ліпідами, вуглеводами) і біометалами (кальцієм, магнієм, міддю тощо), нікотинамідом, аденіновими нуклеотидами (АТФ, АДФ, АМФ). Ним була визначена теоретична закономірність утворення комплексів серцево-судинних засобів з катіонами біометалів, що дало змогу проводити цілеспрямований синтез сполук різної хімічної природи. Уперше у вітчизняній практиці в 1986 році розроблені методичні рекомендації з доклінічного вивчення нових кардіотонічних засобів, які були затверджені МОЗ СРСР, надалі вдосконалені та затверджені МОЗ України в 2000 році. Результати цих досліджень узагальнені в монографіях, а саме: «Биологические аспекты координационной химии», 1979 р.; «Физическая химия и клиническая фармакология сердечных гликозидов», 1985 р.; «Магний в медицине», 1992 р.; «Магнієвісні препарати: фармакологічні властивості, застосування», 2007 р.; «Кардиотонические стероиды», 2009 р.; «Bioactive natural products: oppor-

tunities and challenges in medical chemistry», 2011 р.

І. С. Чекман продовжив і розвинув науковий напрям свого вчителя академіка О. І. Черкеса – біохімічну фармакологію. У галузі біохімічної фармакології він проводив дослідження з вивчення механізмів дії серцево-судинних препаратів різної будови, метаболічних засобів, антидотів. Отримав нові дані щодо біохімічних механізмів первинного фармакологічного ефекту на органному, клітинному та субклітинному рівнях таких ліків, як серцеві глікозиди, інші серцево-судинні засоби, метаболічні та метаболітотропні препарати (кверцетин, тіотриазолін, суфан, елгацин, яктон, ангіолін), ангіопротектори, антидоти (унітіол, дипіроксим, алоксим). Результати цих досліджень узагальнені в наступних монографіях: «Биохимическая фармакодинамика», 1990 р.; «Микросомальная ферментная система организма», 1996 р.; «Очерки фармакологии средств метаболической терапии», 2001 р.; «Кардиопротекторы», 2005 р.; «Тиотриазолин», 2005 р. «Метаболитотропные препараты», 2007 р.; «Метаболитные и метаболитотропные препараты в системе кардио- и органопротекции», 2009 р.; «Нікотинамід», 2009 р., «Вода – источник жизни», 2012 р.; «Озон и озонотерапия», 2013 р.

У галузі квантової фармакології Іваном Сергійовичем проведені дослідження зі встановлення просторової будови та електронної структури молекул лікарських засобів різних фармакологічних груп, зв'язку між їхньою хімічною структурою та фармакологічною активністю за допомогою програми QSAR, ролі розчинника в механізмі дії препаратів, а також вивчення принципів створення фармакофорів лікарських засобів, *de novo* розробки препаратів для лікування різних захворювань, прогнозування фармакологічної активності лікарських засобів, встановлення білок-лігандних взаємодій під час хімічних реакцій. У видавництві «Наукова думка» у 2012 році вийшла монографія «Квантова фармакологія», в якій узагальнені зазначені здобутки фундаментальної науки. У 2017 році була видана монографія

«Квантова хімія: медико-фармацевтичний аспект», де виділені проблеми дослідження відомих і нових лікарських засобів, можливі шляхи їхнього вирішення за допомогою методів, які застосовує квантова хімія.

У галузі нанофармакології завдяки створенню спільної лабораторії Інституту електроварювання імені Є. О. Патона НАН України та Національного медичного університету імені О. О. Богомольця «Електронно-променевої нанотехнології неорганічних матеріалів для медицини», а також плідній співпраці з НДІ України, досліджені механізми дії наночастинок металів, нанодисперсного кремнезему та деяких нанокompatитів. Особливо важливими є результати наукових пошуків у напрямі визначення квантово-хвильових властивостей наночастинок. Результати роботи висвітлені в наступних монографіях: «Нанофармакологія», 2011 р.; «Основи наномедицини», 2011 р.; «Нанонаука, нанобіологія, нанофармація», 2012 р.; «Природні наноструктури та наномеханізми», 2012 р.; «Аминокислоти – наноразмерные молекулы», 2014 р.; «Роль наночастинок цитратів металів у пошуку нових біоантагоністів ембріотоксичності ацетату свинцю».

У галузі клінічної фармакології І. С. Чекман провів фундаментальні та прикладні дослідження, узагальнені в 6 монографіях і 9 довідниках. Розроблена класифікація побічної дії ліків, представлена в монографії «Осложнения фармакотерапии», 1980 р. У 1986 році вперше випущений довідник «Справочник по клинической фармакологии и фармакотерапии», який витримав 2 видання, а довідник «Рецептурный справочник врача», у свою чергу, витримав 8 видань, випущений загальним накладом 1 мільйон 300 тисяч екземплярів і вже багато років є «настільною» книгою лікарів різних спеціальностей. Крім цього, надруковані «Рецептурный справочник врача эндокринолога», «Нестероидні протизапальні препарати: ефективність, доступність і прийнятність для пацієнта», 2011 р.; «Неотложная помощь в педиатрии», 1976 р.; «Врачебная рецеп-

тура в педиатрической практике. Принципы дозирования лекарств детям» у книзі «Фармакотерапия в педиатрии», 1980 р.; «Фармакология кардиоактивных средств в раннем онтогенезе», 1982 р., «Дерматофармакология», 2010 р.

Аспекти досліджень І. С. Чекмана з токсикології висвітлені в монографії «Доклінічна токсикологія», співавтором якої він є.

Результати експериментальних і клінічних робіт з фітотерапії узагальнені в наступних монографіях: «Растительные лекарственные средства», 1983 р.; «Рецепты сборов лекарственных растений. Нетрадиционные методы лечения», 1992 р.; «Клінічна фітотерапія. Природа лікує», «Фитонциды в эргономике», 1986 р.; «Фитонциды в медицине», 1990 р.; «Екологічна фармакологія», 2000 р.; «Спирулина и здоровье», 2000 р.

Іваном Сергійовичем Чекманом написані змістовні наукові роботи з історії розвитку української фармакології та клінічної фармакології, узагальнені в монографії «Історія лікознавства», 2014 р.

За досягнення в галузі радіаційної біології Іван Сергійович Чекман у 1986 році отримав Державну премію України.

Для успішної підготовки вітчизняних і зарубіжних студентів з клінічної фармакології видано 2 підручника «Клінічна фармакологія», 2008 р., «Clinical pharmacy», 2010 р., 3 навчальних посібника – «Клінічна фітотерапія», 2006 р., «Клиническая фармация», 2009 р., «Побічні реакції серцево-судинних засобів», 2010 р.

Іван Сергійович Чекман підготував 92 книги: монографій – 43, підручників для студентів – 25, довідників та посібників для лікарів – 14, посібників для студентів – 8, словників – 3, художню книгу – 1. Він є автором 87 патентів, а також понад 1000 статей, тез. Під його керівництвом підготовлено 25 докторів і 61 кандидат медичних і фармацевтичних наук.

Особливістю творчості Івана Сергійовича була зацікавленість біографіями великих особистостей, відображенням

їхнього життя та творчості в публікаціях. Так, була видана книга, присвячена життєвим шляхам сім'ї Нобелів, підкреслена роль Альфреда Нобеля у створенні славетно відомого Нобелівського фонду. Іваном Сергійовичем була також написана книга «Вчителі, учні, однодумці», 2016 р., що являє сповідь, наснажену прагненням висловити сердечну подяку батькам, родині, вчителям, колегам, з якими працював і в яких учився, щоб згодом передавати знання та досвід молодим.

Високий рівень наукових досягнень Івана Сергійовича Чекмана було оцінено обранням його членом-кореспондентом НАН і НАМН України, врученням Державної премії України, присвоєнням звання «Заслужений діяч науки і техніки України», нагородженням орденом «Знак пошани», Почесною грамотою Кабінету Міністрів України, Почесною грамотою Київського міського голови, медалями Ярослава Мудрого, академіка М. Кравкова.

Змістовно наповнені, з яскравим і доступним викладенням, емоційно забарвлені лекції професора І. С. Чекмана завжди з цікавістю відвідували

студенти. Вони ставилися з великою повагою до Івана Сергійовича як до вченого й людини широкої душі, цінували прагнення допомогти кожному студентові в опануванні дисципліни «Фармакологія».

Іван Сергійович Чекман не тільки володів сяючими гранями творчості, обрієм наукового пошуку, прагненням нових досягнень, він був педагогом з великої літери, що виховав не одне покоління лікарів. На життєвому шляху І. С. Чекман був чесною, порядною людиною, патріотом України, постійно прагнув до самовдосконалення, відавав всі сили та знання людям. Пам'ять про І. С. Чекмана буде жити віками, згадувати його науковий і творчий шлях буде не одне покоління вчених-фармакологів і педагогів.

*Кафедра фармакології
Національного медичного
університету імені О. О. Богомольця*

ГО «Асоціація фармакологів України»

*ДУ «Інститут фармакології та
токсикології НАМН України»*

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

Врынчану Н. А., Дудикова Д. М., Гринчук Н. И., Недашковская В. В.
Биопленки. Современное состояние и перспективы антимикробной терапии311

В НАУЧНЫХ ЛАБОРАТОРИЯХ

Бондаренко Л. Б., Карацуба Т. А., Хавич О. А., Шаяхметова А. М., Шарыкина Н. И., Коваленко В. Н., Стратийчук Р. А., Коновалов А. А., Калачинская М. Н. Влияние Ифитиниба на составляющие хроматина и состояние антиоксидантной системы в карциноме Герена и неизмененных тканях матки..... 322

Демченко С. А., Федченкова Ю. А., Бухтиарова Т. А., Бобкова Л. С., Суховеев В. В., Демченко А. М. Синтез и противоопухолевая активность ариламидов 1-(4¹-изопропилфенил)-4-(4²-хлорофенил)-5,6,7,8-тетрагидро-2,4а-диазациклопента [сd]азулен-2-карбоновой кислоты по отношению к клеткам РС-3 рака простаты 331

Капелька И. Г., Штриголь С. Ю. Скрининговое исследование фригопротекторных свойств нестероидных противовоспалительных препаратов при остром общем охлаждении 338

Новодворский Е. Н., Баглай А. Ю., Комаров И. В., Демченко А. М. Синтез и антиоксидантная активность производных 8H-[1,2,4]триазоло[4,3-в][1,2,4] триазин-7-онов 344

Темирова Е. А., Хайтович М. В., Бурлака А. П., Вовк А. В. Модифицирующее влияние N-ацетилцистеина, мелатонина и их сочетания на состояние электронно-транспортной цепи митохондрий и антиоксидантной системы в головном мозге крыс при экспериментальном сахарном диабете 1 типа..... 353

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Маркова С. О., Ващенко Л. К., Писоченко К. В., Зацаринская Е. И., Прийма Т. В., Чижавко Е. Ю., Войтенко Г. М., Курдиль Н. В. Клинический случай успешного лечения токсического гепатита, обусловленного острым отравлением парацетамолом 363

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАТЕЛЕЙ

Непролиферативные и пролиферативные поражения женской репродуктивной системы крыс и мышей 367

ЛИЧНОСТИ

Памяти члена-корреспондента НАН и НАМН Украины, профессора, доктора медицинских наук Ивана Сергеевича Чекмана 375

CONTENT 380

CONTENT

REVIEWS

Vrynchanu N. O., Dudikova D. M., Hrynychuk N. I., Nedashkivska V. V. Biofilms. The current status and prospects of antimicrobial therapy 311

IN SCIENTIFIC LABORATORIES

Bondarenko L. B., Karatsuba T. A., Khavich O. O., Shayakhmetova G. M., Sharykina N. I., Kovalenko V. M., Stratiychuk R. O., Konovalov A. A., Kalachinska M. M. The effect of Ifitinib on chromatin components and antioxidant system in Guerin's carcinoma and unchanged uterine tissues 322

Demchenko S. A., Fedchenkova Yu. A., Bukhtiarova T. A., Bobkova L. S., Sukhoveev V. V., Demchenko A. M. Synthesis and anticancer activity of 1-(4¹-isopropylphenyl)-4-(4²-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,4a-diazacyclopenta[cd]azulene-2-carboxylic acid arylamides against PC-3 prostate cancer cells 331

Kapelka I. G., Shtrygol' S. Yu. The comparative research of frigoprotective properties of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the model of acute general cooling 338

Novodvorskiy Y. N., Bahlai O. Y., Komarov I. V., Demchenko A. M. Synthesis and antioxidant activity of derivatives of 8H-[1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazin-7-ones 344

Temirova O. A., Khaitovych M. V., Burlaka A. P., Vovk A. V. The modifying effect of N-acetylcysteine, melatonin and their combination on the state of the mitochondrial electron transport chain and antioxidant system in the rat brain at experimental diabetes type 1 353

SHORT REPORTS

Markova S. O., Vashchenko L. K., Pesochenko K. V., Zatsarinskaya O. I., Priyma T. V., Chizhavko O. Yu., Voitenko G. M., Kurdil N. V. Clinical Case of Successful Treatment of Toxic Hepatitis Caused by Acute Paracetamol Poisoning 363

INFORMATION FOR RESEARCHERS 367

PERSONALITY 375