Міністерство освіти і науки України

Запорізький національний університет

Кваліфікаційна наукова робота
на правах рукопису

ЛОГВІНЕНКО НАТАЛЯ ВОЛОДИМИРІВНА

УДК

ДИСЕРТАЦІЯ

ЗМІНИ БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ У ЩУРІВ ПРИ ГОСТРОМУ ГЕПАТИТІ ТА ЙОГО КОРЕКЦІЯ ЗА ДОПОМОГОЮ НОВИХ ПОХІДНИХ ПТЕРИДИНУ

091 – Біологія, освітньо-наукова програма «Біологія»

09 Біологія

Подається на здобуття ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____Н.В.Логвіненко

Наукові керівники:

Омельянчик Людмила Олександрівна, доктор фармацевтичних наук, професор;

Швець Володимир Миколайович, доктор біологічних наук, професор

Запоріжжя – 2026

АНОТАЦІЯ

Логвіненко Н.В. Зміни біохімічних показників у щурів при гострому гепатиті та його корекція за допомогою нових похідних птеридину. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія (Галузь знань 09 Біологія). – Запорізький національний університет Міністерства освіти і науки України, Запоріжжя, 2026.

Представлена робота є комплексним дослідженням, спрямованим на пошук біологічно активних сполук серед *S*-птеридинів для корекції біохімічних показників при гострому гепатиті індукованому тетрахлорметаном.

Для встановлення перспективних напрямів експериментальних досліджень було проведено огляд літературно-патентних даних, який показав, що захворювання печінки залишаються актуальною медико-біологічною проблемою, що пов’язано з її центральною роллю у підтриманні метаболічного гомеостазу, біотрансформації ксенобіотиків та знешкодженні токсичних речовин. Особливе значення мають токсичні ураження печінки, розвиток яких супроводжується порушенням структурно-функціонального стану гепатоцитів, змінами метаболічних процесів, активацією перекисного окиснення ліпідів та формуванням оксидативного стресу. Дисбаланс між утворенням активних форм кисню та функціонуванням антиоксидантної системи сприяє пошкодженню клітинних мембран, білків та інших біомолекул і є однією з важливих патогенетичних ланок токсичного ураження печінки. У зв’язку з цим актуальним залишається пошук нових біологічно активних сполук, здатних впливати на метаболічні порушення, обмежувати інтенсивність вільнорадикальних процесів та підвищувати стійкість гепатоцитів до дії гепатотоксичних чинників.

Метою дисертаційної роботи було вивчити особливості метаболізму та зміни біохімічних показників у щурів при гострому тетрахлорметановому гепатиті й оцінити ефективність захисної дії нових похідних птеридину.

Для реалізації поставленої мети застосовано комплексний експериментальний підхід, що поєднував методи *in silico*, *in vitro* та *in vivo*. Проведено прогнозування можливих біологічних ефектів і параметрів токсичності нових S-заміщених птеридинів із використанням ProTox- II, SwissADME-аналізу. Методами *in vitro* досліджено антирадикальну та антиоксидантну активність сполук і здійснено відбір сполуки-лідера для подальших експериментів. В умовах *in vivo* досліджено токсичність відібраних сполук та їх гепатопротекторні властивості на моделі гострого CCl_4-індукованого гепатиту у щурів.

Функціональний стан печінки оцінювали за комплексом біохімічних показників, що включав активність аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази та лужної фосфатази, вміст загального і прямого білірубіну, загального білка, альбуміну, сечовини та показники тимолової проби. Для характеристики прооксидантно-антиоксидантного балансу визначали вміст дієнових кон'югатів, малонового діальдегіду, основ Шиффа та карбонільованих білків, активність супероксиддисмутази й каталази, а також стан глутатіонової ланки антиоксидантного захисту. Морфологічними та імуногістохімічними методами оцінювали структурні зміни печінкової тканини та експресію маркерів, пов'язаних із розвитком пошкодження й антиоксидантною відповіддю.

Комплексний скринінг *S*-заміщених 6-R^1-7-R^2-2-тіоксо-2,3-дигідроптеридин-4(1H)-онів показав перспективність використання поєднання *in silico* та *in vitro* методології для попереднього відбору потенційних гепатопротекторних сполук. Дослідження гострої токсичності продемонструвало, що модифікація тіогрупи та одержання водорозчинних похідних сприяють зниженню токсичності досліджуваних речовин. За отриманими параметрами сполуки були віднесені до IV–VI класів токсичності – малотоксичних, практично нетоксичних або нетоксичних речовин. На підставі сукупності отриманих результатів для подальшого поглибленого дослідження відібрано сполуку 4.1 – Тіоптерин (DCTP).

Результати *in vitro* досліджень показали, що Тіоптерин відповідає критеріям «лікоподібності», характеризується відсутністю інгібуючого впливу на CYP2C9 та проявляє високу антиоксидантну активність. Сукупність прогнозованих фармакокінетичних характеристик, низької токсичності та антиоксидантних властивостей стала підставою для подальшого дослідження сполуки на експериментальній моделі токсичного ураження печінки.

Моделювання гострого гепатиту відбувалося шляхом введення тетрахлорметану щурам лінії Wistar протягом двох днів та обраної сполуки протягом 14 днів. Введення CCl_4 супроводжувалося вираженими метаболічними та структурно-функціональними порушеннями печінки. У тварин з експериментальною патологією встановлено пошкодження клітинних мембран гепатоцитів, посилення процесів перекисного окиснення ліпідів та зміни біохімічних маркерів функціонального стану печінки. Виявлено підвищення активності АЛТ, АСТ, лужної фосфатази, вмісту загального і прямого білірубіну та показників тимолової проби, що підтверджувало розвиток цитолітичного синдрому та порушення функціонального стану печінки.

Застосування сполуки DCTP при CCl_4-індукованому гострому гепатиті сприяло обмеженню цитолітичних процесів, нормалізації досліджуваних біохімічних показників та підтриманню білоксинтезувальної і детоксикаційної функцій печінки. Гепатопротекторний ефект сполуки супроводжувався зменшенням вираженості метаболічних порушень, спричинених дією тетрахлорметану. За окремими дослідженими показниками, зокрема впливом на активність АСТ, вміст дієнових кон’югатів, основ Шиффа та карбонільованих білків, дія Тіоптерину (DCTP) була вираженішою порівняно з референтним препаратом Тіотриазоліном.

Встановлено суттєві зміни прооксидантно-антиоксидантної рівноваги при експериментальному токсичному ураженні печінки. Інтенсифікація вільнорадикальних процесів супроводжувалася накопиченням продуктів перекисного окиснення ліпідів та окиснювальної модифікації білків. Застосування Тіоптерину сприяло зниженню вмісту дієнових кон’югатів,

малонового діальдегіду й основ Шиффа у гомогенаті печінки та карбонільованих білків у мітохондріальній фракції, що свідчить про обмеження інтенсивності вільнорадикального окиснення.

Одночасно встановлено активацію захисно-компенсаторних механізмів антиоксидантної системи. Під впливом Тіоптерину підвищувалася активність ферментативної ланки антиоксидантного захисту, зокрема супероксиддисмутази та каталази, а також відновлювався стан неферментативної ланки за участю відновленого глутатіону. Сукупність отриманих результатів свідчить, що антиоксидантний компонент є важливою складовою гепатопротекторної дії Тіоптерину та сприяє збереженню структурно-функціонального стану клітин печінки в умовах вираженого CCl_4-індукованого оксидативного стресу.

Біохімічні зміни при гострому токсичному ураженні печінки підтверджувалися результатами морфологічного дослідження. У тварин із CCl_4-індукованим гепатитом виявлено масивні центральні, привенулярні та проміжні геморагічні коагуляційні некрози печінкових часточок, а також численні жирові краплі, що підтверджувало розвиток вираженого токсичного пошкодження печінкової тканини.

На тлі застосування Тіоптерину спостерігалося зменшення вираженості патологічних морфологічних змін і відновлення структур гепатоцитів та тканини печінки в цілому. При цьому повного відновлення структури печінкової часточки не відбувалося, однак порівняно з тваринами з некоригованою патологією та групою корекції Тіотриазоліном простежувалася виражена тенденція до структурно-функціонального відновлення печінкової тканини.

Імуногістохімічні дослідження підтвердили результати біохімічного та морфологічного аналізу. При CCl_4-індукованому гострому гепатиті спостерігалися зміни експресії Nrf2 та Lipocalin-2, пов’язані з оксидативним стресом і пошкодженням печінки. У групі тварин, які отримували речовину DCTP, рівень експресії Nrf2 наближався до показників інтактних тварин, а зміни Lipocalin-2 узгоджувалися зі зменшенням вираженості пошкодження печінкової тканини. Отримані результати разом із даними біохімічних досліджень

підтверджують антиоксидантний, гепатопротекторний та протизапальний потенціал досліджуваної сполуки.

Таким чином, комплексне застосування *in silico, in vitro* та *in vivo* підходів дозволило обґрунтувати перспективність пошуку гепатопротекторних агентів серед *S*-заміщених похідних птеридину та виділити Тіоптерин (DCTP) як сполуку-лідер. Його гепатопротекторна дія при гострому тетрахлорметановому гепатиті реалізується через обмеження цитолітичних процесів, зменшення інтенсивності перекисного окиснення ліпідів і окиснювальної модифікації білків, підтримання антиоксидантної системи та зменшення структурних пошкоджень печінкової тканини.

Наукова новизна одержаних результатів

Розширено та доповнено сучасні уявлення про біохімічні механізми метаболічних порушень, що формуються в організмі щурів за умов гострого тетрахлорметанового ураження печінки, та можливість їх корекції новосинтезованими S-заміщеними похідними птеридину.

Комплексним застосуванням методів *in silico, in vitro* та *in vivo* обґрунтовано перспективність *S*-заміщених 6-R^1-7-R^2-2-тіоксо-2,3-дигідроптеридин-4(1H)-онів як потенційних гепатопротекторних агентів. Показано, що структурна модифікація досліджуваних птеридинів та одержання водорозчинних похідних супроводжуються зниженням гострої токсичності, що дозволило віднести досліджені сполуки до IV–VI класів токсичності.

За сукупністю результатів *in silico* та *in vitro* досліджень вперше виділено сполуку 4.1–Тіоптерин (DCTP), яка характеризується відповідністю критеріям «лікоподібності», відсутністю інгібуючого впливу на CYP2C9 та високою антиоксидантною активністю.

Доповнено уявлення про характер метаболічних змін при гострому CCl_4–індукованому гепатиті та показано взаємозв’язок між порушенням біохімічних показників функціонального стану печінки, активацією процесів вільнорадикального окиснення, змінами антиоксидантної системи та морфологічним пошкодженням печінкової тканини.

Вперше встановлено, що застосування Тіоптерину за умов гострого тетрахлорметанового ураження печінки обмежує цитоліз, знижує інтенсивність перекисного окиснення ліпідів та окиснювальної модифікації білків, сприяє активації ферментативної і неферментативної ланок антиоксидантного захисту та зменшує вираженість структурних змін печінкової тканини.

Показано, що гепатопротекторна дія Тіоптерину поєднується з його антиоксидантними властивостями та супроводжується змінами експресії імуногістохімічних маркерів Nrf2 та Lipocalin-2. Встановлена сукупність біохімічних, морфологічних та імуногістохімічних змін поглиблює уявлення про механізми захисної дії *S*-заміщених птеридинів при токсичному ураженні печінки.

Отримані результати створюють експериментальне підґрунтя для подальшого дослідження похідних птеридину як перспективних біологічно активних сполук для корекції метаболічних порушень, пов’язаних із токсичним ураженням печінки.

Практичне значення отриманих результатів

Результати проведеного дослідження розширюють теоретичні уявлення про біохімічні механізми розвитку гострого токсичного ураження печінки та роль прооксидантно-антиоксидантного дисбалансу у формуванні структурно-функціональних змін гепатоцитів.

Обґрунтовано перспективність використання послідовної методології *in silico – in vitro – in vivo* для пошуку та первинного відбору нових біологічно активних речовин із потенційними гепатопротекторними властивостями серед *S*-заміщених похідних птеридину.

Отримані експериментальні результати щодо гепатопротекторної та антиоксидантної активності Тіоптерину (DCTP) можуть бути використані як основа для подальшого поглибленого вивчення біологічної активності *S*- заміщених птеридинів та механізмів їх впливу на метаболічні процеси при токсичних ураженнях печінки.

Експериментальні узагальнення дисертаційної роботи можуть бути використані у освітньо-науковому процесі під час викладання дисциплін: «Біохімія», «Гістологія», «Імунологія» на кафедрі фізіології, імунології та біохімії з курсом цивільного захисту та медицини Запорізького національного університету; при викладанні дисциплін «Хімія лікарських речовин», «Медична хімія», «Комп'ютерний дизайн лікарських речовин», «Основи фармакології» та «Органічна хімія» на кафедрі фізичної, органічної та неорганічної хімії Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара; під час викладання дисципліни «Біологічна хімія» на кафедрі клінічної лабораторної діагностики та біологічної хімії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету, зокрема в лекційних та практичних курсах. Встановлені закономірності розвитку CCl_4–індукованого гострого гепатиту та його експериментальної корекції новосинтезованими *S*-похідними птеридину становлять інтерес для подальших біохімічних і експериментально-біологічних досліджень.

Особистий внесок здобувача

Дисертаційне дослідження виконано здобувачкою за безпосередньої участі у всіх основних етапах роботи. Авторкою здійснено пошук, систематизацію та критичний аналіз наукової літератури за тематикою дисертації, проведено експериментальні дослідження та виконано статистичну обробку отриманих результатів. У співпраці з науковими керівниками було сформульовано мету та завдання дисертаційного дослідження, розроблено дизайн і сплановано проведення 48 експериментів. Здобувачкою проведено аналіз та узагальнення одержаних результатів. За участі наукових керівників було здійснено їх наукову інтерпретацію та підготовлено рукописи наукових публікацій. Основні положення та висновки дисертаційної роботи обґрунтовані результатами проведених досліджень. Авторка не запозичувала ідеї та/або результати роботи інших співавторів у сумісних публікаціях.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 12 наукових праць, зокрема 4 наукові статті, які індексуються у міжнародній наукометричній базі

Scopus. Із них 1 стаття опубліковані у виданні, що належать до I квартилю, одна – до II квартилю, одна – до III квартилю, одна – до IV квартилю. Окрім того, опубліковано 8 тез доповідей у збірниках матеріалів науково-практичних конференцій.

Апробація результатів дисертації

Основні положення та результати дисертаційної роботи доповідались і обговорювались на: “Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів” (Ternopil–2022р); Шоста міжнародна наукова конференція актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології. (Dnipro–2022); VI Науково-практична internet-конференція з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція» (м. Харків–2023 р.); Конференція з міжнародною участю “Youth Science–2024” (м. Вінниця, 17 травня 2024р.); VII Міжнародна науково-практична конференція «Сучасні проблеми біології, екології та хімії». (м. Запоріжжя, 25–27 квітня 2024р.); The 7th International Scientific Conference “Current problems of biochemistry, cell biology and physiology” (3–4 October 2024 Dnipro, Ukraine); II Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю “Міждисциплінарні підходи до створення ліків”. (м. Одеса, 14–15 квітня 2026 року); II Всеукраїнська науково-практична конференція «Актуальні проблеми та перспективи розвитку природничих, медичних та фармацевтичних наук» (25 квітня 2026 року, м. Запоріжжя, Україна)

Ключові слова*: гостра токсичність, in silico, in vivo, печінка, оксидативний стрес, гепатопротекторна активність, ферментативна система, антирадикальна та антиоксидантна активність, прооксидантно-антиоксидантна система, перикисне окиснення ліпідів, тетрахлорметановий гепатит у щурів, біохімічні показники, S- гетероцикли, біологічно активні речовини*

ANNOTATION

Logvinenko N.V. Changes in biochemical parameters in rats with acute hepatitis and its correction using new pteridine derivatives. – Qualification scientific work as a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the specialty 091 – Biology (09 – Biology). – Zaporizhzhia National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Zaporizhzhia, 2026.

The present dissertation constitutes a comprehensive study aimed at identifying biologically active compounds among *S*-substituted pteridine derivatives for the correction of biochemical alterations associated with acute carbon tetrachloride-induced hepatitis.

To identify promising directions for experimental research, a comprehensive review of the relevant scientific and patent literature was conducted. The analysis demonstrated that liver diseases remain a major biomedical concern due to the central role of the liver in maintaining metabolic homeostasis, xenobiotic biotransformation, and the detoxification of toxic substances. Toxic liver injury is of particular importance, as its development is accompanied by disturbances in the structural and functional integrity of hepatocytes, alterations in metabolic processes, activation of lipid peroxidation, and the development of oxidative stress. An imbalance between the generation of reactive oxygen species and the capacity of the antioxidant defense system contributes to damage to cellular membranes, proteins, and other biomolecules and represents an important pathogenetic mechanism underlying toxic liver injury. Therefore, the search for novel biologically active compounds capable of correcting metabolic disturbances, limiting the intensity of free-radical processes, and increasing hepatocyte resistance to hepatotoxic factors remains highly relevant.

The aim of the dissertation was to investigate metabolic features and alterations in biochemical parameters in rats with acute carbon tetrachloride-induced hepatitis and to evaluate the efficacy of the protective effects of novel pteridine derivatives.

To achieve this aim, a comprehensive experimental approach integrating i*n silico, in vitro,* and *in vivo* methods was employed. The potential biological effects and toxicity parameters of novel S-substituted pteridines were predicted using ProTox- II, SwissADME analysis, and molecular docking. *In vitro* studies were performed to evaluate the antiradical and antioxidant activities of the compounds and to select a lead compound for subsequent experiments. *In vivo* studies assessed the toxicity of the selected compounds and their hepatoprotective properties in a rat model of acute CCl_4–induced hepatitis.

The functional state of the liver was assessed using a panel of biochemical parameters, including the activities of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and alkaline phosphatase; the concentrations of total and direct bilirubin, total protein, albumin, and urea; and the thymol turbidity test. The prooxidant–antioxidant balance was characterized by determining the levels of diene conjugates, malondialdehyde, Schiff bases, and protein carbonyls; the activities of superoxide dismutase and catalase; and the status of the glutathione-dependent component of the antioxidant defense system. Morphological and immunohistochemical methods were used to assess structural alterations in liver tissue and the expression of markers associated with tissue injury and the antioxidant response.

Comprehensive screening of *S*-substituted 6-R^1-7-R^2-2-thioxo-2,3-dihydropteridin-4(1H)-ones demonstrated the potential of combining *in silico* and *in vitro* methodologies for the preliminary selection of potential hepatoprotective compounds. Acute toxicity studies showed that modification of the thiol group and the preparation of water-soluble derivatives contributed to a reduction in the toxicity of the investigated compounds. According to the obtained parameters, the compounds were classified into toxicity classes IV–VI, corresponding to low-toxicity, practically non-toxic, or non-toxic substances. Based on the overall findings, compound 4.1, Thiopterin (DCTP), was selected for further in-depth investigation.

The *in vitro* findings demonstrated that Thiopterin met the criteria for drug-likeness, showed no inhibitory effect on CYP2C9, and exhibited high antioxidant

activity. The combination of its predicted pharmacokinetic characteristics, low toxicity, and antioxidant properties provided the rationale for further investigation of this compound in an experimental model of toxic liver injury.

Acute hepatitis was induced by administering carbon tetrachloride to Wistar rats for two days, whereas the selected compound was administered for 14 days. CCl_4 administration resulted in pronounced metabolic and structural-functional alterations in the liver. Animals with experimentally induced pathology exhibited hepatocyte membrane damage, enhanced lipid peroxidation, and alterations in biochemical markers of liver function. Increased activities of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and alkaline phosphatase, together with elevated total and direct bilirubin concentrations and thymol turbidity test values, confirmed the development of cytolytic syndrome and impaired hepatic function.

Administration of DCTP in acute CCl_4–induced hepatitis limited cytolytic processes, promoted normalization of the investigated biochemical parameters, and supported the protein-synthetic and detoxification functions of the liver. The hepatoprotective effect of the compound was accompanied by a reduction in the severity of metabolic disturbances induced by carbon tetrachloride. For several parameters, including AST activity and the levels of diene conjugates, Schiff bases, and protein carbonyls, the effects of Thiopterin (DCTP) were more pronounced than those observed with the reference drug Thiotriazolin.

Substantial alterations in the prooxidant – antioxidant balance were observed in experimental toxic liver injury. Intensification of free-radical processes was accompanied by the accumulation of lipid peroxidation products and products of oxidative protein modification. Thiopterin administration reduced the levels of diene conjugates, malondialdehyde, and Schiff bases in liver homogenates, as well as protein carbonyls in the mitochondrial fraction, indicating attenuation of free-radical oxidation.

At the same time, activation of the protective and compensatory mechanisms of the antioxidant system was observed. Thiopterin increased the activity of the enzymatic antioxidant defense system, particularly superoxide dismutase and catalase, and promoted restoration of the non-enzymatic component involving reduced

glutathione. Taken together, these findings indicate that the antioxidant component constitutes an important mechanism underlying the hepatoprotective action of Thiopterin and contributes to increased resistance of liver cells under conditions of pronounced CCl_4-induced oxidative stress.

The biochemical alterations associated with acute toxic liver injury were corroborated by morphological findings. Animals with CCl_4-induced hepatitis exhibited extensive central, perivenular, and intermediate hemorrhagic coagulative necrosis of the hepatic lobules, as well as numerous lipid droplets, confirming the development of severe toxic injury to the liver tissue.

Thiopterin administration reduced the severity of pathological morphological alterations and promoted restoration of hepatocyte structure and liver tissue architecture. Although complete restoration of hepatic lobular architecture was not achieved, a pronounced tendency toward structural and functional recovery of liver tissue was observed compared with animals with untreated pathology and those receiving Thiotriazolin.

Immunohistochemical findings corroborated the results of the biochemical and morphological analyses. Acute CCl_4- induced hepatitis was associated with alterations in Nrf2 and Lipocalin-2 expression related to oxidative stress and liver injury. In animals treated with DCTP, Nrf2 expression approached the levels observed in intact animals, whereas changes in Lipocalin- 2 expression were consistent with a reduction in the severity of liver tissue injury. Together with the biochemical findings, these results support the antioxidant, hepatoprotective, and anti-inflammatory potential of the investigated compound.

Thus, the integrated application of *in silico, in vitro*, and *in vivo* approaches substantiated the potential of *S*-substituted pteridine derivatives as a source of hepatoprotective agents and enabled the identification of Thiopterin (DCTP) as a lead compound. Its hepatoprotective activity in acute carbon tetrachloride-induced hepatitis is mediated by attenuation of cytolytic processes, reduction of lipid peroxidation and oxidative protein modification, maintenance of antioxidant defense mechanisms, and mitigation of structural damage to liver tissue.

Scientific Novelty of the Results

Current understanding of the biochemical mechanisms underlying metabolic disturbances in rats with acute carbon tetrachloride-induced liver injury and the possibility of their correction using newly synthesized S-substituted pteridine derivatives has been expanded and further developed.

The integrated application of *in silico, in vitro,* and *in vivo* methods substantiated the potential of *S*-substituted 6-R^1-7-R^2-2-thioxo-2,3-dihydropteridin-4(1H)-ones as prospective hepatoprotective agents. Structural modification of the investigated pteridines and the preparation of water-soluble derivatives were shown to be associated with reduced acute toxicity, allowing the investigated compounds to be classified into toxicity classes IV–VI.

Based on the combined results of *in silico* and *in vitro* studies, compound 4.1, Thiopterin (DCTP), was identified for the first time as a lead compound characterized by compliance with drug-likeness criteria, absence of an inhibitory effect on CYP2C9, and high antioxidant activity.

The understanding of metabolic alterations associated with acute CCl_4- induced hepatitis has been further expanded, and the relationship between disturbances in biochemical indicators of liver function, activation of free-radical oxidation, alterations in the antioxidant system, and morphological damage to liver tissue has been demonstrated.

For the first time, Thiopterin administration under conditions of acute carbon tetrachloride-induced liver injury was shown to limit cytolysis, reduce the intensity of lipid peroxidation and oxidative protein modification, promote activation of both enzymatic and non-enzymatic components of antioxidant defense, and decrease the severity of structural alterations in liver tissue.

The hepatoprotective effect of Thiopterin was shown to be associated with its antioxidant properties and accompanied by alterations in the expression of the immunohistochemical markers Nrf2 and Lipocalin-2. The identified combination of biochemical, morphological, and immunohistochemical alterations provides further

insight into the mechanisms underlying the protective effects of S-substituted pteridines in toxic liver injury.

The findings provide an experimental basis for further investigation of pteridine derivatives as promising biologically active compounds for the correction of metabolic disturbances associated with toxic liver injury.

Practical Significance of the Results

The results of the study expand the theoretical understanding of the biochemical mechanisms underlying the development of acute toxic liver injury and the role of prooxidant – antioxidant imbalance in the development of structural and functional alterations in hepatocytes.

The feasibility of applying a sequential *in silico – in vitro – in vivo* methodology for the identification and preliminary selection of novel biologically active substances with potential hepatoprotective properties among S-substituted pteridine derivatives has been substantiated.

The experimental findings concerning the hepatoprotective and antioxidant activities of Thiopterin (DCTP) may serve as a basis for further in-depth investigation of the biological activity of *S*- substituted pteridines and the mechanisms underlying their effects on metabolic processes in toxic liver injury.

The experimental findings and generalizations derived from the dissertation may be incorporated into educational and scientific activities in higher education institutions, particularly in lectures and practical courses in Biochemistry, Histology, Immunology, Medicinal Chemistry, Medical Chemistry, Computer-Aided Drug Design, Fundamentals of Pharmacology, and Organic Chemistry. The established patterns of the development of CCl_4–induced acute hepatitis and its experimental correction using newly synthesized *S*-substituted pteridine derivatives are also relevant to further biochemical and experimental biological research.

Personal Contribution of the Applicant

The dissertation research was conducted with the applicant's direct involvement at all major stages of the study. The author performed the search, systematization, and critical analysis of the scientific literature relevant to the dissertation topic, conducted

the experimental studies, and performed statistical analysis of the obtained data. In collaboration with the academic supervisors, the aim and objectives of the dissertation were formulated, the study design was developed, and 48 experiments were planned. The applicant analyzed and summarized the obtained results. With the participation of the academic supervisors, the findings were scientifically interpreted and manuscripts of scientific publications were prepared. The principal statements and conclusions of the dissertation are substantiated by the results of the conducted studies. The author did not appropriate the ideas and/or research results of other co-authors in jointly authored publications.

Publications. Based on the dissertation research, 12 scientific works have been published, including four research articles indexed in the international Scopus database. Of these, one article was published in a Q1 journal, one in a Q2 journal, one in a Q3 journal, and one in a Q4 journal. In addition, eight conference abstracts were published in the proceedings of scientific and practical conferences.

Presentation and Discussion of the Dissertation Results

The principal findings and results of the dissertation were presented and discussed at the following scientific conferences: “Scientific and Technological Progress and Optimization of Technological Processes for the Development of Medicinal Products” (Ternopil, 2022); the Sixth International Scientific Conference “Current Problems of Modern Biochemistry, Cell Biology and Physiology” (Dnipro, 2022); the VI Scientific and Practical Internet Conference with International Participation “Mechanisms of Development of Pathological Processes and Diseases and Their Pharmacological Correction” (Kharkiv, 2023); the Conference with International Participation “Youth Science–2024” (Vinnytsia, May 17, 2024); the VII International Scientific and Practical Conference “Current Problems of Biology, Ecology and Chemistry” (Zaporizhzhia, April 25–27, 2024); the 7th International Scientific Conference “Current Problems of Biochemistry, Cell Biology and Physiology” (Dnipro, Ukraine, October 3–4, 2024); the II All-Ukrainian Scientific and Practical Conference with International Participation “Interdisciplinary Approaches to Drug Development” (Odesa, April 14–15, 2026); and the II All-Ukrainian Scientific

and Practical Conference “Current Problems and Prospects for the Development of Natural, Medical and Pharmaceutical Sciences” (Zaporizhzhia, Ukraine, April 25, 2026).

Keywords: *acute toxicity, in silico, in vivo, liver, oxidative stress, hepatoprotective activity, enzymatic system, radical-scavenging and antioxidant activity, prooxidant-antioxidant system, lipid peroxidation, carbon tetrachloride-induced hepatitis in rats, biochemical indicators, S-heterocycles, biologically active compounds*

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ АВТОРОМ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Maxim Kazunin; Natalia Groma; Inna Nosulenko; Anna Kinichenko; Oleksii Antypenko; Volodymyr Shvets; Oleksii Voskoboinik; Serhii Kovalenko. Thio-containing pteridines: synthesis, modification and biological activity. Archiv der Pharmazie. 2022; Vol. 355, Issue12. doi:10.1002/ardp.202200252. (Scopus Q2)

2. Shvets V.M., Kovalenko S.I., Voskoboinik O.Yu., Groma N.V., Kopiika V.V., Berest G.G., Antypenko O.M. Evaluation of toxicity and hepatoprotector properties of new *S*-pteridine derivatives. Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences. 2023; Vol. 36, No. 1, P.21-26; doi:10.2478/cipms-2023-0006. (Scopus Q3)

3. Lohvinenko N., Shvets V., Berest G., Nosulenko I., Voskoboinik O., Severina H., Okovytyy S., Kovalenko S. Prospects for the use of sulfur-containing pteridines in toxic liver damage. Regulatory Mechanisms in Biosystems. 2024; 15(2)., P. 374-381. doi:10.15421/022453. (Scopus Q1)

4. Lohvinenko, N.; Shvets, V.; Antypenko, O.; Voskoboinik, O.; Bozhkov, A.; Maslak, H.; Oksenych, V.; Kamyshnyi, O.; Okovytyy, S.; Kovalenko, S. The Application of S-Substituted Pteridine for CCl_4–Induced Acute Hepatitis Treatment in Rats. Biomedicines. 2025; 13, 1276. doi:10.3390/ biomedicines13061276. (Scopus 1)

5. Groma N. V., Nosulenko I.S., Berest G.G., Shvets V.M., Kovalenko S.I. Use of *in vitro* methodology and search of antioxidants among *S*-pteridin derivatives. IX науково-практична конференція з міжнародною участю «Науково -технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів»; 22 вересня 2022 року; Тернопіль; 2022. С 22–23.

6. Groma N.V., Nosulenko I.S., Berest G.G., Shvets V.M., Kovalenko S.I. Use of *in silico* approaches in the study of anti-radical, antioxidant effects in a series of *S*-substituted pteridins with potential hepatoprotective effect. VI міжнародна наукова конференція актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології; 6–7 жовтня 2022; Дніпро; 2022. С. 53–54.

7. N. Groma, O. Voskoboinik, V. Shvets. Hepatoprotective activity and toxicity of novel pteridine derivatives. VI Науково-практична internet-конференція з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція». 16 листопада 2023; Харків; 2023. С. 43

8. N.V. Lohvinenko, V.M. Shvets, I.V. Dobrodub. Virtual screening of biologically active substances among *S*-containing derivatives of pteridine. Конференція з міжнародною участю "Youth Science - 2024. 17 травня 2024. Вінниця; 2024. С. 7–8

9. N.V. Lohvinenko, V.M. Shvets. Assessment of toxicity and hepatoprotective properties of new *S*-substituted pteridins. VII Міжнародна науково-практична конференція «Сучасні проблеми біології, екології та хімії». 25–27 квітня 2024. Запоріжжя; 2024. С.46

10. Lohvinenko N., Kovalenko S., Shvets V. ДОСЛІДЖЕННЯ *S*- ЗАМІЩЕНИХ 6-R_1-7-R_2-2-ТІОКСО-2,3-ДИГІДРО-ПТЕРИДИН-4(1Н)-ОНІВ МЕТОДАМИ in silico, in vitro ТА ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ ДЛЯ ОЦІНКИ ПОДАЛЬШОГО ЗАСТОСУВАННЯ ПРИ експериментальних моделях патології печінки. The 7th International Scientific Conference "Current problems of biochemistry, cell biology and physiology". 3–4 жовтня 2025; Дніпро; 2025. С. 58–60.

11. Логвіненко Н.В., Швець В.М., Берест Г.Г., Носуленко І.С., Воскобойнік О.Ю., Коваленко С.І «Drug-design» птеридинів на основі «фолатного циклу» як стратегія пошуку нових гепатопротекторів. І Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю "Міждисциплінарні підходи до створення ліків". 14–15 квітня 2026. Одеса; 2026. С. 114–117

12. Логвіненко Н.В., Швець В.М., Коваленко С.І. Оцінка метаболітотропної дії *S*–птеридинів при експериментальному гепатиті у щурів. ІІ Всеукраїнська науково-практична конференція «Актуальні проблеми та перспективи розвитку природничих, медичних та фармацевтичних наук». 25 квітня 2026; Запоріжжя; 2026

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ.....23
ВСТУП.....25
РОЗДІЛ 1. РОЗРОБКА ГЕПАТОПРОТЕКОРНИХ АГЕНТІВ НА ОСНОВІ СИНТЕТИЧНИХ ТА НАПІВСИНТЕТИЧНИХ СПОЛУК 33
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....65
2.1. Характеристика об’єкта досліджень.....65
2.2. Дослідження з використанням *in silico* методології.....67
2.2.1. Прогнозування критеріїв токсичності *S*-заміщених 2-тіоксо-2,3-дигідроптеридин-4(1H)-онів з використанням програмного забезпечення ProTox-II.....67
2.2.2. Дослідження фізико-хімічних, фармакокінетичних параметрів та критеріїв «drug-like» *S*-заміщених 2-тіоксо-2,3-дигідроптеридин-4(1H)-онів з використанням програмного забезпечення SwissADME.....67
2.2.3. Дослідження спорідненості *S*-заміщених 2-тіоксо-2,3-дигідроптеридин-4(1H)-онів до біологічних мішеней з використанням молекулярного докінгу.....68
2.3. Дослідження з використанням *in vitro* методології.....69
2.3.1. Визначання антирадикальної активності *S*-заміщених 2-тіоксо-2,3-дигідроптеридин-4(1H)-онів.....69
2.3.2. Визначання антиоксидантної активності *S*-заміщених 2-тіоксо-2,3-дигідроптеридин-4(1H)-онів.....69
2.4. Методи *in vivo* (експериментальні методи дослідження) на тваринах.....70
2.4.1. Характеристика об’єкта досліджень.....70
2.4.2. Визначення гострої токсичності на мишах.....71
2.4.3. Дослідження впливу синтезованих сполук на експериментальний гепатит індукований тетрахлорметаном (CCl_4).....71
2.4.3.1 Експериментальна схема підготовки тварин до дослідження.....71

2.4.4. Методика визначення масси тіла тварин.....….....…76
2.4.5. Виділення субклітинних фракцій печінки.....…….....76
2.4.6 Вимірювання біохімічних показників у щурів з CCl_4 гепатитом печінки.....…….....78
2.4.6.1 Методика визначення активності аланінамінотрансферази (АЛТ), аспартатамінотрансферази (АСТ), коефіцієнт де Ріттіса, лужної фосфатази (ЛФ), сечовини, альбумінів, загального білка, прямого та загального білірубіну та тимолової проби.....…….....78
2.4.6.2 Методика визначення вмісту продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів та білків в гомогенаті печінки.....…….....81
2.4.7 Визначення активності ферментів першої лінії антиоксидантного захисту.....…….....83
2.4.8 Визначення вмісту глутатіону і активності ферментів його метаболізму.....……....84
2.5. Методика приготування гістологічних, імуногістохімічних препаратів та підрахунок гепатоцитів.....…….....85
2.6. Статистичні методи.....…….....88
РОЗДІЛ 3. *S*-ПОХІДНІ 6-R1-7-R2-2-ТІОКСО-2,3-ДИГІДРОПТЕРИДИН-4(1H)-ОНІВ ЯК ПЕРСПЕКТИВНІ ГЕПАТОПРОТЕКТОРИ НА ОСНОВІ *IN SILICO* ТА *IN VITRO* МЕТОДОЛОГІЇ ТА ВІДБОРУ НАЙБІЛЬШ АКТИВНИХ СПОЛУК ДЛЯ ПОДАЛЬШОГО ЇХ ВИВЧЕННЯ НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ МОДЕЛЯХ ПАТОЛОГІЇ ПЕЧІНКИ.....……...…...89
3.1 Дослідження токсичності синтезованих сполук у програмі ProTox-II...…….89
3.2 Дослідження токсичності синтезованих сполук *in vivo*.....…..….92
3.3 SwissADME-аналіз.....…….93
3.4 Дослідження молекулярного докінгу.....……..96
3.5 Антиоксидантна та антирадикальна активність.....……102
3.5.1 Антирадикальна активність.....…....105

РОЗДІЛ 4. ЗАСТОСУВАННЯ *S*-ЗАМІЩЕНОГО ПТЕРИДИНУ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ГОСТРОГО ГЕПАТИТУ, ВИКЛИКАНОГО CCl_4, У ЩУРІВ.....113
4.1 Динаміка росту тварин з гострим гепатитом печінки індукованим CCl_4.....113
4.2 Вплив DCTP на структуру печінкової тканини щурів при CCl_4- індукованому гепатиті.....117
4.3 Вимірювання біохімічних показників у тварин з CCl_4-індукованим гепатитом.....127
4.4 Особливості зміни вмісту продуктів вільнорадикального окислення ліпідів у печінці щурів при оксидативному стресі індукованому CCl_4.....138
4.5 Особливості зміни вмісту карбонільованих білків у печінці щурів при оксидативному стресі індукованому CCl_4.....144
4.6 Визначення стану антиоксидантної системи у печінці при ТХМ гепатиті.....147
ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ.....156
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....159
ДОДАТКИ.....184
ДОДАТОК А1. Акт впровадження.....184
ДОДАТОК А2. Акт впровадження.....185
ДОДАТОК А3. Акт впровадження.....186
ДОДАТОК Б. Список опублікованих автором праць за темою дисертації.....187
ДОДАТОК В. Відомості про апробацію результатів дослідження.....190

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ

АДФ – аденозиндифосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

АФІ – активні фармацевтичні інгредієнти

АЛТ – аланінамінотрансфераза

АСТ – аспартатамінотрансфераза

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ДК – дієнові кон’югати

ДМСО – диметилсульфоксид

ДМФА – *N,N*-диметилформамід

МДА – малоновий діальдегід

ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів

$ЛД_{50}$ – середня летальна доза

СОД – супероксиддисмутаза

ЦОГ-2 – циклооксигеназа II типу

ЦТК – цикл трикарбонових кислот

^{1}Н ЯМР – протонний ядерний магнітний резонанс

CO_2 – діоксид вуглецю

GSH – відновлений глутатіон

GSSG – глутатіон дисульфід

GSHPx – глутатіонпероксидази

HCC – гепатоцелюлярна карцинома

H_2O_2 – перекис водню

LCN2 – білок запалення та стресу, який активізується під час пошкоджень гепатотоцитів чи хвороб печінки

MASLD – метаболічна дисфункція

Nrf2 – ядерний фактор 2, пов'язаний з еритроїдом 2

NO – оксид азоту

O_2^{-}• – супероксид аніон-радикал

OH• – гідроксил-радикал

RO• – алкоксил-радикал

ROO• – пероксид-радикал

ROS – активні форми кисню

TNF-α – фактор некрозу пухлин альфа

IC_{50} – концентрація напівмаксимального інгібування

IL-1β – інтерлейкін-1β

IL-6 – інтерлейкін-6

ProTox-II – вебінструмент для оцінки токсичності

SwissADME – вебінструмент для оцінки фармакокінетики, подібності та сумісності малих молекул з ліками

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження.

Печінка є одним із ключових органів підтримання метаболічного гомеостазу організму. Її функціональна активність забезпечує регуляцію обміну вуглеводів, ліпідів і білків, участь у синтезі та перетворенні біологічно активних сполук, а також біотрансформацію і знешкодження ендогенних та екзогенних речовин [1–4]. Особливості кровопостачання та функціональний зв'язок із травною системою зумовлюють постійний контакт печінкової тканини з метаболітами, ксенобіотиками та іншими потенційно токсичними агентами, що визначає її високу чутливість до дії гепатотоксичних чинників [4–6].

Захворювання печінки становлять актуальну медико-біологічну проблему та охоплюють широкий спектр патологічних станів різної етіології, що відповідають приблизно 4% у структурі загальної смертності (тобто один із кожних 25 випадків смерті у світі) [7–10]. Особливе місце серед них займають токсичні ураження, розвиток яких пов'язаний із порушенням структурно-функціонального стану гепатоцитів, змінами внутрішньо-клітинного метаболізму та зниженням функціональних резервів печінки [7, 11].

Однією з провідних патогенетичних ланок токсичного пошкодження печінки є формування оксидативного стресу, зумовленого порушенням рівноваги між утворенням активних форм кисню та ефективністю антиоксидантних механізмів клітини [12]. Надмірне утворення вільнорадикальних продуктів сприяє активації перекисного окиснення ліпідів, окиснювальній модифікації білків, порушенню функціонування біологічних мембран і мітохондрій та, як наслідок, поглибленню структурно-функціонального пошкодження гепатоцитів [12, 13].

Важливу роль у підтриманні окисно-відновного гомеостазу клітин печінки відіграє антиоксидантна система, до складу якої входять ферментативні та неферментативні компоненти. Супероксиддисмутаза і каталаза забезпечують послідовне знешкодження активних форм кисню, тоді як глутатіонова система

бере участь у підтриманні внутрішньоклітинного редокс-балансу та захисті біомолекул від окиснювального пошкодження. Порушення узгодженої роботи цих механізмів за умов токсичного впливу може сприяти накопиченню продуктів вільнорадикального окиснення та прогресуванню пошкодження печінкової тканини [11–13].

Експериментальне моделювання токсичного ураження печінки є важливим підходом до дослідження зазначених біохімічних порушень і пошуку потенційних засобів їх корекції. Однією з класичних моделей гострого токсичного пошкодження печінки є інтоксикація тетрахлорметаном (CCl_4). Його біотрансформація супроводжується утворенням реакційноздатних радикальних метаболітів, які ініціюють вільнорадикальні процеси, спричиняють пошкодження мембранних структур гепатоцитів та формування комплексу метаболічних і морфологічних змін.

У зв'язку з цим актуальним напрямом експериментальної біохімії залишається пошук нових біологічно активних речовин, здатних обмежувати метаболічні порушення при токсичному ураженні печінки, знижувати інтенсивність вільнорадикального окиснення та підтримувати функціонування антиоксидантної системи.

Перспективними у цьому аспекті є похідні птеридину - гетероциклічні сполуки, структурна модифікація яких дозволяє одержувати речовини з різними видами біологічної активності. Поєднання методів *in silico, in vitro* та *in vivo* дає можливість послідовно оцінити токсикологічні, фармакокінетичні й біологічні характеристики новосинтезованих похідних, провести первинний скринінг та обґрунтовано відібрати найбільш перспективні сполуки для поглибленого експериментального дослідження.

З огляду на це дослідження змін біохімічних показників, стану прооксидантно-антиоксидантної системи та структурно-функціональних характеристик печінки при гострому тетрахлорметановому гепатиті, а також оцінка можливості корекції встановлених порушень новими *S*-заміщеними

похідними птеридину є актуальним напрямом, що має теоретичне та експериментальне значення.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота виконувалась в рамках науково-дослідної теми науково-дослідної роботи кафедри фізіології, імунології та біохімії з курсом цивільного захисту та медицини: «Біохімічні зміни метаболічних процесів у щурів при гострому та хронічному гепатитах» за договором №0124U002643 біологічного факультету Запорізького національного університету.

Мета дослідження: Вивчити особливості метаболізму та зміни біохімічних показників у щурів при гострому тетрахлорметановому гепатиті, і оцінити ефективність захисної дії нових похідних птеридина.

Задачі дослідження:

1. Дослідити порушення антитоксичної функції печінки і стану метаболізму при гострій гепатотоксичності індукованої тетрахлорметаном.

2. Дослідити динаміку росту маси тіла і відносної маси органів у тварин з CCl_4 гепатитом печінки;

3. Методами *in silico* (молекулярний докінг, ProTox- II, SwissADME-аналіз) провести прогнозування можливих біологічних ефектів і параметрів токсичності вперше синтезованих конденсованих похідних птеридина.

4. Методами *in vitro* вивчити антирадикальну та антиоксидантну дію вперше синтезованих конденсованих *S*-птеридинів. Вибір *хім-сполуки* для подальших досліджень;

5. Вивчити зміни метаболізму і параметри токсичності сполук, відібраних для досліджень *in vivo,* а також морфологічні зміни печінки досліджуваних тварин імуногістохімічними маркерами.

6. Дослідити вплив обраної сполуки на деякі біохімічні показники у тварин із CCl_4–індукованим гепатитом печінки, а саме визначення впливу Тіоптерину на активність аланінамінотрансферази (АЛТ), аспартатамінотрансферази (АСТ), загального та прямого білірубіну, лужної фосфатази (ЛФ), загального білку, альбумінів та сечовини;

7. Оцінити активність ферментів першої лінії антиоксидантного захисту: СОД, каталази, окисленого і відновленого глутатіону в мітохондріальній фракції печінки. Провести оцінку прооксидантних маркерів оксидативного стресу: дієнових кон'югатів, малонового діальдегіду, шифових основ та карбонільованих білків.

Об'єкт дослідження – біохімічні процеси в організмі дорослих щурів-самців (180–250 г) лінії Wistar при тетрахлорметановій (CCl_4) інтоксикації печінки, корекція їх порушень за допомогою *S*- похідних птеридина.

Предмет дослідження – кількісні та функціональні зміни показників прооксидантної і антиоксидантної систем в організмі тварин при ураженні тетрахлорметановим гепатитом на тлі корекції новосинтезованими *S*- похідними птеридинами з гепатопротекторною, антиоксидантною та антирадикальною активністю.

Наукова новизна проведеної роботи

Розширено та доповнено сучасні уявлення про біохімічні механізми метаболічних порушень, що формуються в організмі щурів за умов гострого тетрахлорметанового ураження печінки, та можливість їх корекції новими *S*-заміщеними похідними птеридину.

Комплексним застосуванням методів *in silico, in vitro* та *in vivo* обґрунтовано перспективність *S*-заміщених 6-R^1-7-R^2-2-тіоксо-2,3-дигідроптеридин-4(1H)-онів як потенційних гепатопротекторних агентів. Показано, що структурна модифікація досліджуваних птеридинів та одержання водорозчинних похідних супроводжуються зниженням гострої токсичності, що дозволило віднести досліджені сполуки до IV–VI класів токсичності.

За сукупністю результатів *in silico* та *in vitro* досліджень вперше виділено сполуку 4.1–Тіоптерин (DCTP), яка характеризується відповідністю критеріям «лікоподібності», відсутністю інгібуючого впливу на CYP2C9 та високою антиоксидантною активністю.

Доповнено уявлення про характер метаболічних змін при гострому CCl_4-індукованому гепатиті та показано взаємозв'язок між порушенням

біохімічних показників функціонального стану печінки, активацією процесів вільнорадикального окиснення, змінами антиоксидантної системи та морфологічним пошкодженням печінкової тканини.

Вперше встановлено, що застосування Тіоптерину за умов гострого тетрахлорметанового ураження печінки обмежує цитоліз, знижує інтенсивність перекисного окиснення ліпідів та окиснювальної модифікації білків, сприяє активації ферментативної і неферментативної ланок антиоксидантного захисту та зменшує вираженість структурних змін печінкової тканини.

Показано, що гепатопротекторна дія Тіоптерину поєднується з його антиоксидантними властивостями та супроводжується змінами експресії імуногістохімічних маркерів Nrf2 та Lipocalin-2. Встановлена сукупність біохімічних, морфологічних та імуногістохімічних змін поглиблює уявлення про механізми захисної дії *S*-заміщених птеридинів при токсичному ураженні печінки.

Отримані результати створюють експериментальне підґрунтя для подальшого дослідження похідних птеридину як перспективних біологічно активних сполук для корекції метаболічних порушень, пов’язаних із токсичним ураженням печінки.

Практичне значення отриманих результатів

Результати проведеного дослідження розширюють теоретичні уявлення про біохімічні механізми розвитку гострого токсичного ураження печінки та роль прооксидантно-антиоксидантного дисбалансу у формуванні структурно-функціональних змін гепатоцитів.

Обґрунтовано перспективність використання послідовної методології *in silico – in vitro – in vivo* для пошуку та первинного відбору нових біологічно активних речовин із потенційними гепатопротекторними властивостями серед *S*- заміщених похідних птеридину.

Отримані експериментальні результати щодо антиоксидантної та гепатопротекторної активності Тіоптерину можуть бути використані як основа для подальшого поглибленого вивчення біологічної активності S- заміщених

птеридинів та механізмів їх впливу на метаболічні процеси при токсичних ураженнях печінки.

Експериментальні узагальнення дисертаційної роботи можуть бути використані у освітньо-науковому процесі під час викладання дисциплін: «Біохімія», «Гістологія», «Імунологія» на кафедрі фізіології, імунології та біохімії з курсом цивільного захисту та медицини Запорізького національного університету; при викладанні дисциплін «Хімія лікарських речовин», «Медична хімія», «Комп'ютерний дизайн лікарських речовин», «Основи фармакології» та «Органічна хімія» на кафедрі фізичної, органічної та неорганічної хімії Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара; під час викладання дисципліни «Біологічна хімія» на кафедрі клінічної лабораторної діагностики та біологічної хімії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету, зокрема в лекційних та практичних курсах. Встановлені закономірності розвитку CCl_4–індукованого гострого гепатиту та його експериментальної корекції новосинтезованими *S*-похідними птеридину становлять інтерес для подальших біохімічних і експериментально-біологічних досліджень.

Особистий внесок здобувача

Дисертаційне дослідження виконано здобувачкою за безпосередньої участі у всіх основних етапах роботи. Авторкою здійснено пошук, систематизацію та критичний аналіз наукової літератури за тематикою дисертації, проведено експериментальні дослідження та виконано статистичну обробку отриманих результатів. У співпраці з науковими керівниками було сформульовано мету та завдання дисертаційного дослідження, розроблено дизайн і сплановано проведення 48 експериментів. Здобувачкою проведено аналіз та узагальнення одержаних результатів. За участі наукових керівників було здійснено їх наукову інтерпретацію та підготовлено рукописи наукових публікацій. Основні положення та висновки дисертаційної роботи обґрунтовані результатами проведених досліджень. Авторка не запозичувала ідеї та/або результати роботи інших співавторів у сумісних публікаціях.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 12 наукових праць, зокрема 4 наукові статті, які індексуються у міжнародній наукометричній базі Scopus. Із них 1 стаття опубліковані у виданні, що належать до I квартилю, одна – до II квартилю, одна – до III квартилю, одна – до IV квартилю. Окрім того, опубліковано 8 тез доповідей у збірниках матеріалів науково-практичних конференцій.

Апробація результатів дисертації

Основні положення та результати дисертаційної роботи доповідались і обговорювались на: "Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів" (Ternopil–2022р); Шоста міжнародна наукова конференція актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології. (Dnipro–2022р); VI Науково-практична internet-конференція з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція» (Харків–2023р.); Конференція з міжнародною участю "Youth Science–2024" (Вінниця, 17 травня 2024р.); VII Міжнародна науково-практична конференція «Сучасні проблеми біології, екології та хімії». (Запоріжжя, 25-27 квітня 2024р.); The 7th International Scientific Conference "Current problems of biochemistry, cell biology and physiology" (3–4 October 2024 Dnipro, Ukraine); II Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю "Міждисциплінарні підходи до створення ліків". (Одеса, 14–15 квітня 2026р); II Всеукраїнська науково-практична конференція «Актуальні проблеми та перспективи розвитку природничих, медичних та фармацевтичних наук» (25 квітня 2026р, Запоріжжя, Україна).

Структура та обсяг дисертації

Дисертаційна робота викладена державною мовою на 191 сторінках машинописного тексту та складається з анотації, списку друкованих праць, вступу, 4 розділів: огляду літератури, матеріалів та методів, власних досліджень, а також загальних висновків, списку використаних джерел (з яких кирилицею –6, латиницею – 198) та додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 161 сторінки друкованого тексту. Роботу ілюстровано 12 таблицями, 59 рисунками.

Подяки

Висловлюю щиру вдячність доктору фармацевтичних наук, професору Коваленку Сергію Івановичу за синтез досліджуваної сполуки–Тіоптерину, використаної під час виконання експериментальної частини дисертаційної роботи.

Окрему й особливу вдячність висловлюю Збройним Силам України за мужність, стійкість і захист, завдяки яким стало можливим продовження наукової роботи, навчання та завершення цієї дисертації в умовах повномасштабної війни.

РОЗДІЛ 1

РОЗРОБКА ГЕПАТОПРОТЕКОРНИХ АГЕНТІВ НА ОСНОВІ СИНТЕТИЧНИХ ТА НАПІВСИНТЕТИЧНИХ СПОЛУК

(ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Захворювання печінки залишаються вагомою медико-соціальною проблемою, щорічно спричиняючи близько двох мільйонів летальних випадків, що відповідає приблизно 4% у структурі загальної смертності (тобто один із кожних 25 випадків смерті у світі) [14]. Переважна частка летальних наслідків зумовлена ускладненнями цирозу та гепатоцелюлярної карциноми, тоді як внесок гострого гепатиту у загальну смертність є відносно меншим; основними етіологічними чинниками розвитку цирозу на глобальному рівні виступають вірусні гепатити, хронічне вживання алкоголю та неалкогольна жирова хвороба печінки, тоді як у патогенезі гострого гепатиту провідну роль відіграють гепатотропні віруси із зростаючим значенням медикаментозно індукованих уражень печінки [14].

З огляду на зазначене, розроблення нових гепатопротекторних препаратів набуває особливої актуальності в умовах зростання поширеності хронічних захворювань печінки та обмеженої ефективності наявних терапевтичних підходів. Важливо відмітити, що об’єктами переважної більшості досліджень спрямованих на пошук інноваційних гепатопротекторних агентів є сполуки природного походження або екстракти рослин. Так, за останній час опублікована серія оглядів в яких узагальнено та систематизовано відомості про гепатопротекторні властивості препаратів рослинного походження [15–21]. В той самий час кількість публікацій, щодо пошуку сполук з гепатопротекторною активністю серед синтетичних або напівсинтетичних речовин є достатньо обмеженою, а систематичні огляди по зазначеній тематиці є малочисельними. Враховуючи зазначене було вирішено провести огляд літературних відомостей

щодо гепатопротекторних властивостей синтетичних та напівсинтетичних речовин.

В 2007 році Fernández-Martínez зі співавторами опублікували результати дослідження гепатопротекторної дії коричної кислоти та ряду її синтетичних похідних (Сполуки 1, Рис. 1.1) в умовах експериментального ураження печінки, індукованого тетрахлорметаном (CCl_4) [22]. Автори спиралися на результати попередніх досліджень, що свідчили про виражену антиоксидантну активність названої групи речовин.

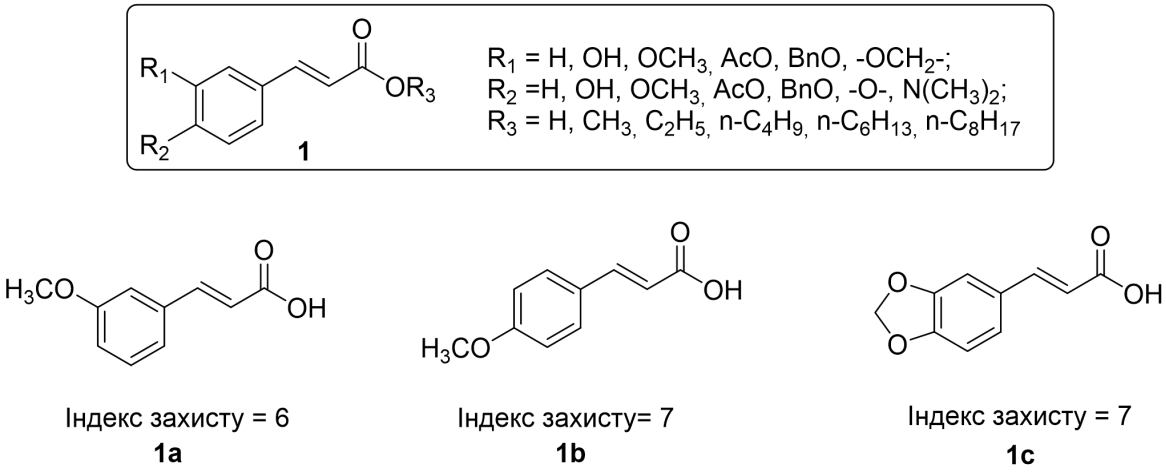


Рисунок 1.1

Оцінку ступеня ураження печінки проводили за активністю сироваткових ферментів (аланінамінотрансферази, лужної фосфатази, γ- глутамілтранспептидази), а також за рівнем продуктів перекисного окиснення ліпідів у печінковій тканині. Для інтегральної оцінки ефективності сполук авторами було запропоновано інтегральний показних «індекс захисту», що враховує вплив кожної сполуки на зазначені біохімічні показники.

Отримані результати свідчать, що гепатопротекторна активність істотно залежить від характеру замісників у ароматичному кільці. Найбільш виражену активність проявляли похідні з метоксигрупою у положенні 3 або 4, а також сполуки, що містять фрагмент 1,3-діоксоланую. В той самий час моногідроксильні похідні або сполуки з об'ємними замісниками (наприклад, дибензилокси-групами) характеризувалися більш низьким рівнем активності.

Найменш активними виявилися похідні з двома гідроксильними, метоксильними або ацетильними групами, естери та сполуки з N,N- диметиламіновим залишком.

Авторами встановлена відсутність кореляції між здатністю інгібувати перекисне окиснення ліпідів і загальною гепатопротекторною дією, що свідчить про участь додаткових механізмів. Зокрема, обговорюється можливий внесок інгібування 5-ліпоксигенази та зниження утворення лейкотрієнів.

У роботі Luo та співавт. представлено підхід до пошуку нових низькомолекулярних сполук із гепатопротекторною активністю, що реалізується через вплив на запальні механізми, зокрема міграцію макрофагів, індуковану хемокіном MCP-1 [23]. У межах дослідження було синтезовано бібліотеку з 53 малих молекул, що належать до кількох структурних класів, зокрема барбітурової (**2**), тіобарбітуратної кислот (**3**), похідних тіазолідону (**4**, **5**), гідантоїнів (**6**) і піролідин-2,5-діонів (**7**) (Рис. 1.2, 1.3).

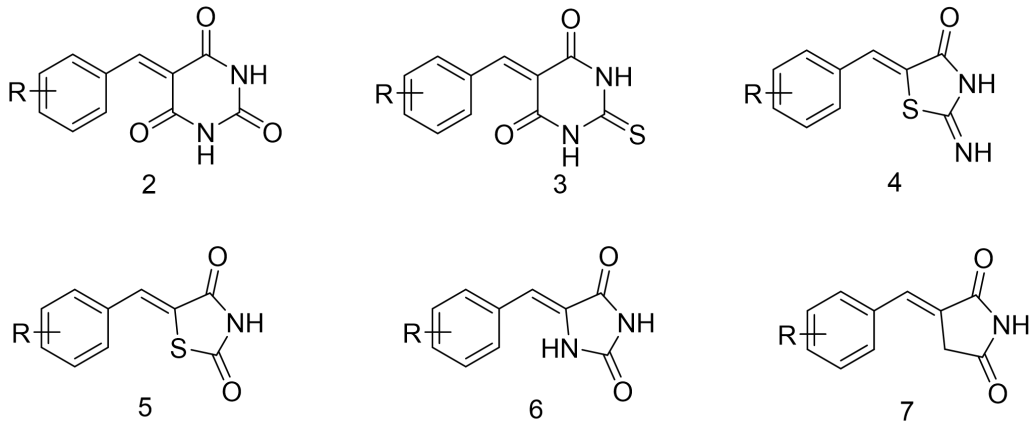


Рисунок 1.2

Біологічну активність оцінювали *in vitro* за здатністю інгібувати хемотаксис макрофагоподібних клітин RAW264.7, стимульований MCP-1. Результати скринінгу показали, що лише обмежена кількість сполук проявляє виражену активність, причому найбільш ефективними виявилися сполуки 3a, 3b, 4a та 7a (Рис. 1.3), для яких значення IC_{50} знаходилися в діапазоні 0,72- 20,47 мкМ. Найбільш активною сполукою виявився 5-(4-метоксибензиліден)тіазолідин-2,4-діон (**4a**), який перевищував активність референтного інгібітора 5-(хіноксалін-6-ілметилен)тіазолідин-2,4-діону (**8**).

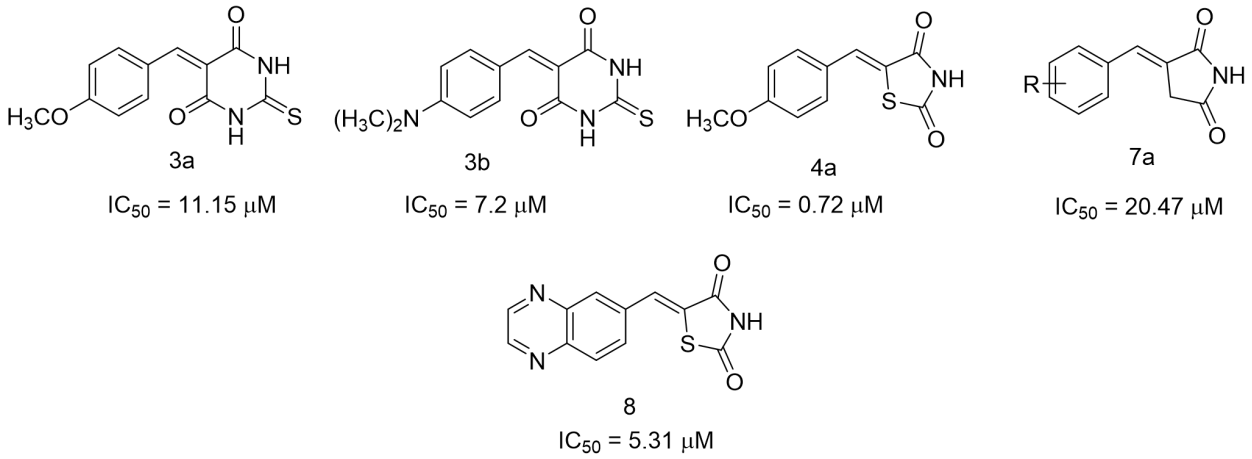


Рисунок 1.3

Подальші *in vivo* дослідження на моделі гострого ураження печінки, індукованого конканаваліном А показали, що пероральне введення сполук **3a**, **3b**, **4a** та **7a** призводить до значного зниження рівнів печінкових ферментів (АЛТ та АСТ), які є маркерами гепатоцелюлярного ушкодження. Гістологічний аналіз тканини печінки підтвердив, що введення сполуки **4a** зменшує некротичні зміни та інфільтрацію запальних клітин, що узгоджується з її здатністю пригнічувати міграцію макрофагів. Додатково було встановлено, що досліджувані сполуки не виявляють токсичності *in vivo*, зокрема при введені речовини **4a** не було зафіксовано патологічних змін у тканинах основних органів (серце, печінка, нирки, легені, селезінка), що підтверджено гістологічними дослідженнями. Представленні результати переконливо свідчать про доцільність пошуку перспективних гепатопротекторів серед синтетичних речовин гетероциклічної природи.

У роботі Chen та співавторів реалізовано підхід до створення гепатопротекторних сполук, що ґрунтується, спрямованій на покращення фізико-хімічних властивостей анетолтритіону (**9**, Рис. 1.4) [24]. Незважаючи на встановлену гепатопротекторну активність та низьку токсичність цієї сполуки, її практичне застосування обмежується низькою розчинністю у воді, що ускладнює створення лікарських форм, особливо для парентерального введення.

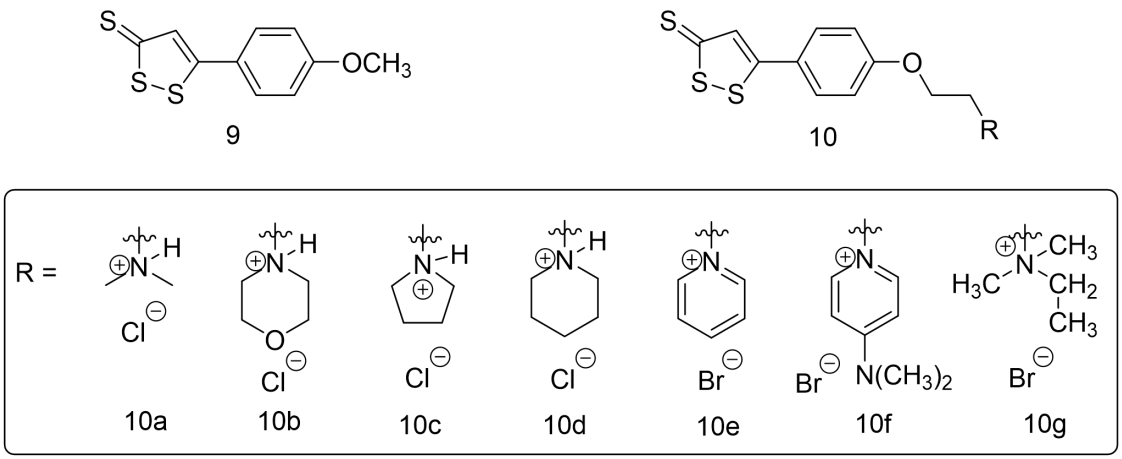


Рисунок 1.4

У межах дослідження одержано серію водорозчинних аналогів анетолтритіону шляхом введення гідрофільних Нітроген-вмісних фрагментів (сполуки **10a-g**, Рис. 1.4). Фармакологічні дослідження проводили на моделі гострого ураження печінки, індукованого CCl_4. Встановлено, що всі досліджувані сполуки знижують рівні маркерних ферментів (АЛТ і АСТ). Найбільш активною виявилася сполука **10a**, яка при дозі 2 мг/кг демонструє ефективність, порівнянну з вихідним анетолтритіоном.

Робота наукового колективу у складі Rajasekaran та співавторів опублікували результати дослідження, що присвячено пошуку гепатопротекторних агентів серед синтезованих основ Маніха з бензотриазольним фрагментом (**11,** Рис. 1.5) [25]. Вибір даного класу сполук обумовлений як широким спектром біологічної активності похідних триазолу, так і здатністю основ Маніха утворювати водорозчинні амонієві солі, що сприяє покращенню фармакокінетичних характеристик.

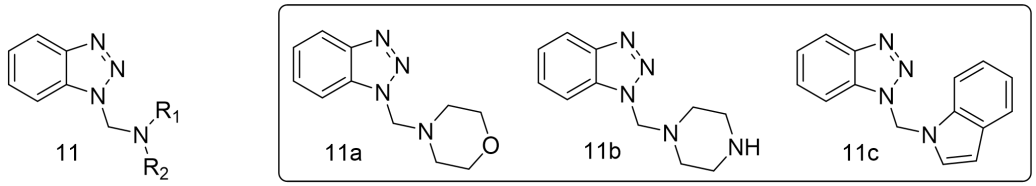


Рисунок 1.5

Оцінку гепатопротекторної активності проводили на моделі токсичного ураження печінки, індукованого тетрахлорметаном. Біохімічними маркерами

ураження печінки слугували рівні трансаміназ (АЛТ, АСТ) та лужної фосфатази (ЛФ), підвищення яких спостерігалося у тварин контрольної групи.

Результати показали, що лише окремі досліджені сполуки проявляють виражену гепатопротекторну активність. Найбільш вираженою гепатопротекторною активністю характеризувалась сполука 4-((1H-бензо[*d*][1,2,3]триазол-1-іл)метил)морфолін (**11a**), яка при дозі 250 мг/кг забезпечувала значне зниження рівнів АЛТ та АСТ порівняно з контрольною групою, і демонструвала активність, співставну зі препаратом порівняння силімарином. Результати гістологічного аналізу печінкової тканини узгоджувався з даними біохімічних досліджень. Так у піддослідних тварин, яким вводилась сполука **11a** спостерігалося часткове відновлення структури гепатоцитів та зменшення жирової дистрофії і некротичних змін.

Sk та співавтори представили результати дослідження біологічної дії нових синтетичних органоселеноціанатів, що містять спіро-конденсований тетралін-піролідиновий фрагмент (**12a-c,** Рис. 1.6), як потенційних гепатопротекторних агентів при кадмій-індукованому токсичному ураженні печінки [26].

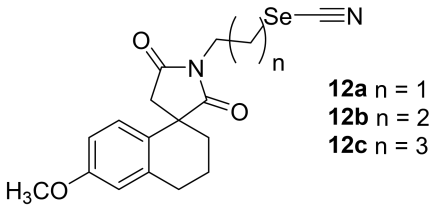


Рисунок 1.6

Показано, що введення кадмію призводило до значного підвищення рівня продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), зниження вмісту відновленого глутатіону (GSH) та пригнічення активності антиоксидантних ферментів, зокрема глутатіон-S-трансферази (GST), каталази і супероксиддисмутази (СОД). Введення синтезованих органоселеноціанатів приводило до нормалізації цих показників, а саме зниження утворення TBARS, підвищення рівня GSH та відновлення активності ферментів антиоксидантного захисту. Також встановлено, що введення досліджених сполук призводило до достовірного

зниження рівнів АЛТ та АСТ у порівнянні з контрольною групою тварин. Результати гістологічних досліджень печінкової тканини узгоджувались з даними біохімічних досліджень. Так, у тварин контрольної групи (інтоксикація кадмієм) виявлялися виражені морфологічні зміни, включаючи некроз, запальну інфільтрацію та порушення структури гепатоцитів. В той самий час піддослідні тварин, яким вводились органоселеноціанати спостерігалося суттєве зменшення патологічних змін та часткове відновлення нормальної гістоархітектоніки печінки.

Аналіз взаємозв'язку «будова–гепатопротективна дія» показав, рівень активності зростає зі збільшенням довжини алкільного ланцюга. Найбільш активною є сполука **12c**. Зазначений факт вірогідно пов'язаний з зростанням ліпофільностію. Автори зазначають, що ймовірним механізмом гепатопротекторної дії органоселеноціанатів пов'язаний із утворенням комплексів, а також з активацією антиоксидантної системи гепатоцитів.

У роботі Wang та співавторів представлено дослідження гепатопротекторної дії нових похідних біфендату, що містять фрагмент тіазолідин-2,4-діону [27].

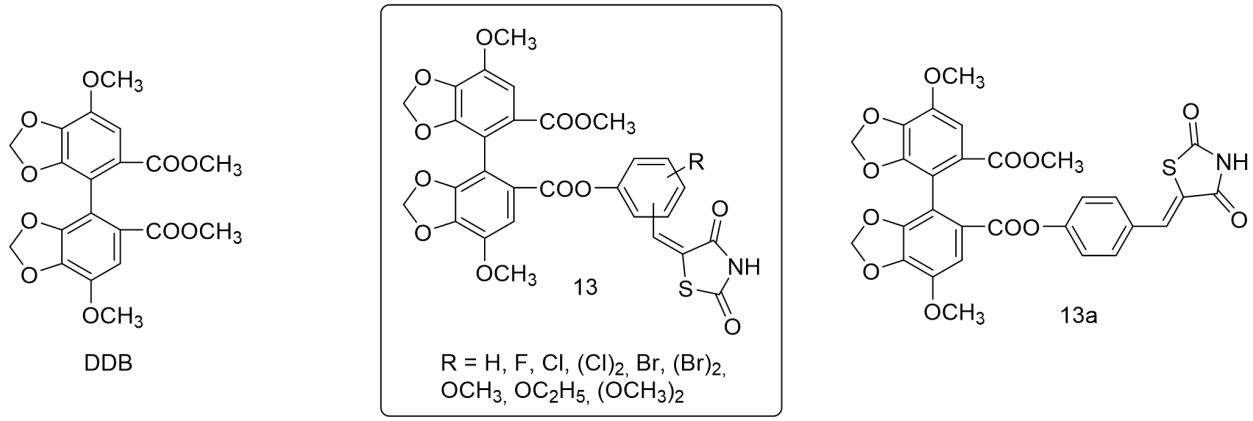


Рисунок 1.7

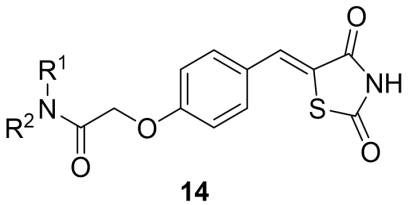
Вибір структурної основи обумовлений тим, що біфендат (DDB, диметил 7,7'-диметокси-[4,4'-бібензо[d][1,3]діоксол]-5,5'-дикарбоксилат), який є синтетичним аналогом шизандрину С, вже застосовується у клінічній практиці для лікування хронічних гепатитів, однак потребує подальшого вдосконалення фармакологічного профілю. Тіазолідин-2,4-діоновий фрагмент є добре відомим

фармакофором, що входить до складу низки лікарських засобів і проявляє багатовекторну дію, в тому числі має протизапальні властивості. Враховуючи зазначене авторами запропоновано дизайн потенційних гепатопротекторів (Рис. 1.7), що оснований на поєднанні біфендатного каркасу з тіазолідин-2,4-діоновим фрагментом. Попередню біологічну оцінку проводили на клітинній моделі запалення. Відповідно до одержаних результатів, усі синтезовані сполуки пригнічували продукцію оксиду азоту (NO), що свідчить про їх виражену протизапальну активність. Найбільш активною виявилась сполука **13a**, яка демонструвала дозозалежне інгібування продукції NO, перевищуючи за ефективністю вихідний біфендат.

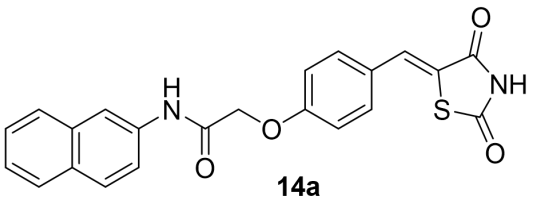
В подальшому гепатопротекторну активність оцінювали на моделі гострого ураження печінки, індукованого конканаваліном А, введення якого призводило до різкого підвищення рівнів трансаміназ (АЛТ, АСТ). Встановлено, що введення сполуки **13a** знижувала рівень АЛТ приблизно на 95%, а АСТ– на 69%, що свідчить про виражену гепатопротекторну дію зазначеної речовини.

Гістологічний аналіз підтвердив біохімічні дані. Так у контрольної групи тварин, спостерігалися значні ушкодження печінки, а саме некроз, запальна інфільтрація, порушення структури тканини. В той самий час у лабораторних тварин з групи, що отримувала сполуку **13a**, спостерігалось істотне зменшення цих змін, зокрема зниження інфільтрації запальних клітин, зменшення некротичних ділянок, а також відновлювалася нормальна архітектоніка печінкової тканини. Одержані результати підтверджують доцільність використання гібрид-фармакофорного підходу при розробці гепатопротекторних агентів.

Ма та співавтори провели дослідження, що спрямовано на пошук нових препаратів для лікування неалкогольної жирової хвороби печінки [28]. Зазначене захворювання є достатньо поширеним та часто асоціюється з інсулінорезистентністю, ожирінням та метаболічним синдромом. Враховуючи зазначене авторами одержано ряд нових похідних 5-бензилідентіазолідин-2,4-діону (**14,** Рис. 1.8).



14



14a

R^1 = циклоалкіл, арил, гетарил;
R_2 = H, CH_3

Рисунок 1.8

Вибір об’єктів дослідження спирався на наявні відомості про біологічну дію тіазолідин-2,4-діонів, а саме їх здатність виступати в якості агоністів PPARγ, здатності підвищувати чутливість тканин до інсуліну, а також їх впливом на рівень адипонектину та лептину. Вважається, що саме зазначені вище гормони мають критичний вплив на розвиток неалкогольної жирової хвороби печінки. In vitro дослідження проводили на моделі диференціації 3T3-L1 пре-адипоцитів в адипоцити із визначенням рівня екпресії адипонектину. Встановлено, що ряд з одержаних сполук індукували експресію адипонектину. Найбільш активною виявилась сполука **14a**, яка обумовила зростання експресії адипонектину на 70,8%, перевищуючи ефект препарату порівняння розиглітазону. Додатково зазначена речовина знижували секрецію лептину, що додатково підтверджує її потенціал у корекції метаболічних порушень. Дослідження *in vivo* на моделі неалкогольної жирової хвороби печінки індукованої дієтою з високим вмістом жирів підтвердили результати попередніх досліджень.

In vivo експерименти на моделі неалкогольної жирової хвороби печінки у щурів (індукованої високожировою/висококалорійною дієтою) підтвердили отримані результати. Пероральне введення сполуки **14a** (25 мг/кг/добу протягом 4 тижнів) призводило до: зниження маси печінки на 17,9%, зменшення вісцерального жиру на 38,7%, зниження рівнів глюкози, інсуліну, тригліцеридів і холестерину. Гістологічний аналіз показав, що ведення сполуки **14a** значно зменшує жирову інфільтрацію печінки, некротичні зміни та запальну інфільтрацію, що свідчить про виражену гепатопротекторну дію. Автори

зазначають, що сполука **14a** є вкрай перспективним експериментальний препаратом для лікування жирової хвороби печінки.

Goel та інші опублікували результати досліджень в яких розробку нових гіпоглікемічних агентів з вираженими гепатопротекторними властивостями [29]. Для проведення структурного дизайну потенційних гепатопротекторів було використано загальновживаний гібрид-фармакофорний підхід. Авторами запропоновано гібридні структури на основі піранонового фармакофору та фрагментів тіазолідин-2,4-діону або фібратів (Рис. 1.9).

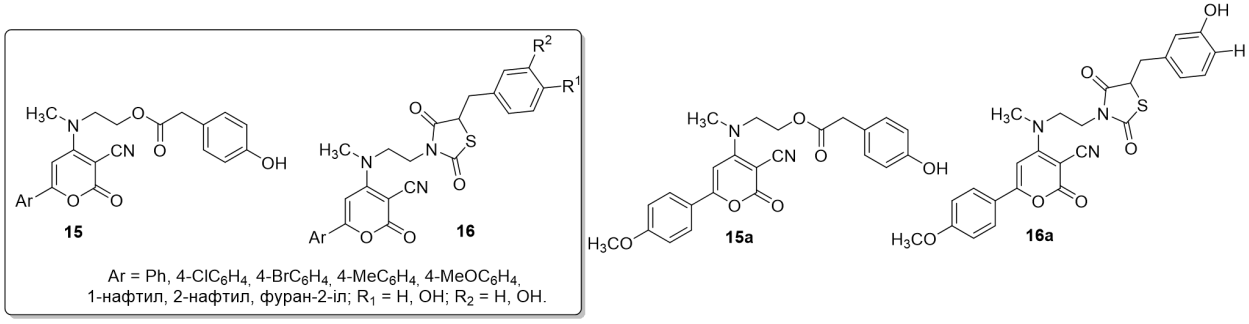
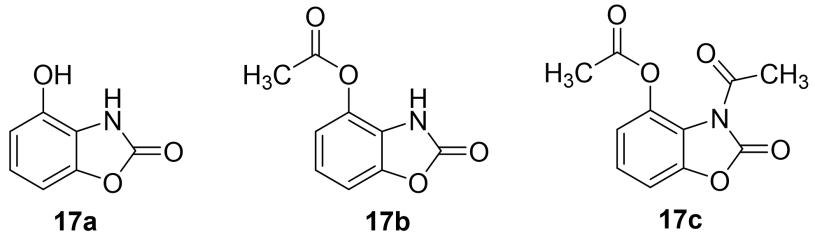


Рисунок 1.9

Біологічну активність сполук оцінювали на клітинній моделі диференціації 3T3-L1 пре-адипоцитів. Встановлено, що окремі речовини (**15a** та **16a**) стимулюють диференціацію пре-адипоцитів і накопичення ліпідів, що свідчить про активацію процесів адипогенезу. Молекулярний механізм цього ефекту пов’язують із активацією генів, відповідальних за ліпогенез, зокрема aP2 і FAS. Гепатопротекторні властивості одержаних молекулярних гібридів досліджували *in vivo* на моделі гострого тіоацетамід-індукованого гепатиту. Встановлено, що введення тіоацетаміду призводило до значного підвищення рівнів АЛТ, АСТ, ЛФ та загального білірубіну. Введення речовин **15a** та **16a** призвело до суттєвого зниження зазначених показників, що свідчить про ефективне відновлення функціонального стану печінки. Гістологічний аналіз печінкової тканини узгоджується з даними гістохімічного дослідження. У тварин, яким вводився тіоацетамідом, спостерігалися виражені структурні порушення печінки, включаючи некроз і деструкцію тканини. В той самий час в групах, що

отримували досліджувані сполуки, відзначалося значне зменшення патологічних змін та відновлення нормальної гістоархітектоніки печінки.

Робота наукового колективу у складі Liu та інших була присвячена дослідженню гепатопротекторної дії алкалоїду *Acanthus ilicifolius A* (4- гідрокси-2(3*H*)-бензоксазолон) та його напівсинтетичних ацетильованих аналогів (Рис. 1.10) [30]. Зазначений напрям дослідження був обраний з огляду на опубліковані раніше дані, що свідчать про виражену гепатопротекторну дію спиртового екстракту *Acanthus ilicifolius*.



Acanthus ilicifolius
алкалоїд А

Рисунок 1.10

Гепатопротекторні властивості сполук досліджували на моделі гострого ураження печінки, індукованого тетрахлорметаном. Біохімічний аналіз показав, що введення CCl_4 супроводжується підвищенням рівнів АЛТ АСТ, LDH і МДА та одночасним зниженням активності антиоксидантних ферментів (СОД, каталаза, GSH, Gpx). Показано, що введення сполук **17** приводив до нормалізації зазначених показників, зокрема значно знижували рівні трансаміназ і продуктів ліпопероксидації та підвищували активність антиоксидантної системи. Імуногістохімічні дослідження показали, що у введення CCl_4 індукує підвищення експресії TNF-α–ключового медіатора запалення, тоді як введення досліджених сполук достовірно знижує рівень даного маркеру. Зазначений факт свідчить про протизапальний ефект сполук **17** як складову загальної гепатопротекторної активності. Проведені авторами гістологічні дослідження повністю узгоджуються з даними біохімічних аналізів. У групі тварин з експериментальною патологією спостерігалися виражені морфологічні зміни, включаючи жирову дистрофію, некроз та порушення архітектоніки печінкової

тканини. Натомість у тварин, що отримували досліджені речовини, відзначалося суттєве зменшення цих патологічних змін і часткове відновлення нормальної структури печінки.

У роботі Не та співавторів представлено синтез та дослідження гепатопротекторної активності синтетичних похідних дибензоциклооктадієнових лігнанів–природних сполук, характерних для рослин родини *Schisandraceae* [31]. Інтерес до зазначених сполук обумовлений тим, що на їх основі були створені відомі гепатопротекторні агенти, зокрема диметил дифеніл бікарбоксилат (DDB). Зазначений факт підтверджує перспективність даного класу сполук як джерела нових лікарських засобів. Авторами їх основі шизандрину (**18**), шизандрину В (**19**) та шизангенолу (**20**) одержано серію галогенованих, ацильованих та окиснених похідних (**21-26**, Рис. 1.11), що дозволило встановити вплив електронних ефектів та стеричних характеристик замісників на рівень гепатопротекторної активності та встановити залежність «структура–біологічна дія».

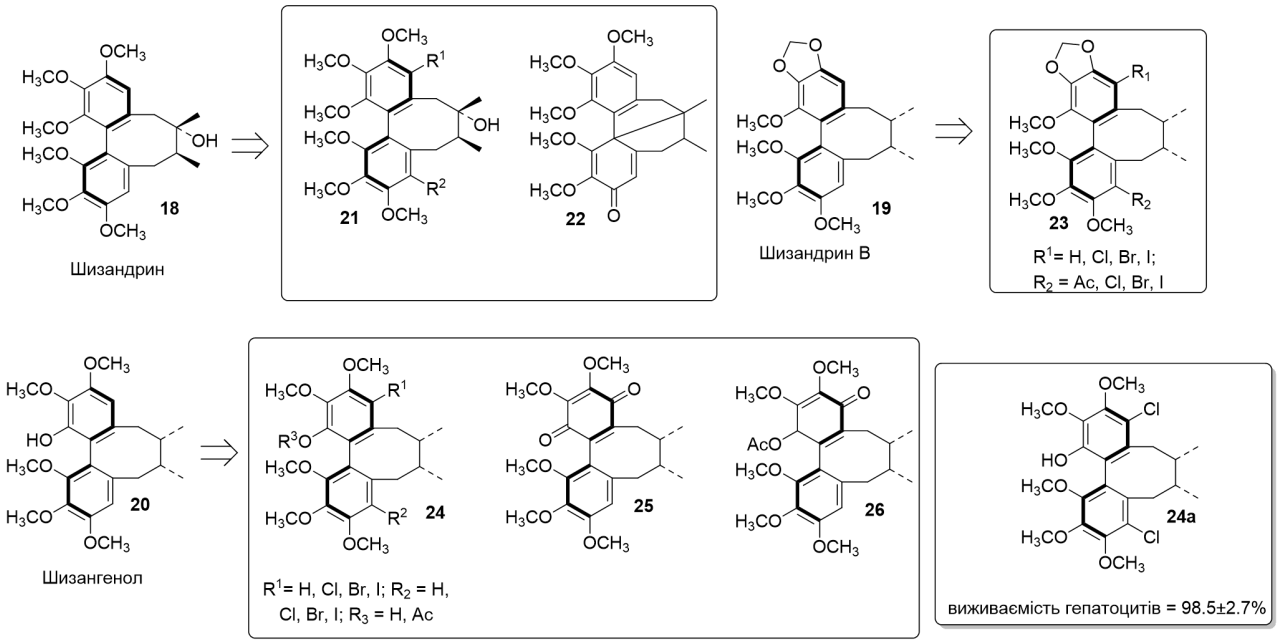


Рисунок 1.11

Біологічну активність одержаних сполук оцінювали *in vitro* на клітинних культурах гепатоцитів з використанням тетрахлорметану для моделювання токсичного ураження. Встановлено, що більшість одержаних речовин

проявляють вищу цитопротекторну активність у порівнянні референс-сполукою (DDB). Так, виживаємість клітин в умовах модельної патології становила 37.3±9.5%. Додавання до клітинних культур сполук, що досліджуються у дозі 0.2 мкг/мкл призводило до значного збільшення відсотку виживаємості клітин, а в окремих випадках до показників виживаємості, що відповідають інтактним клітинам. Найбільш активною виявилася сполука **24a** (дихлорпохідне шизангенолу), для якої показник виживаності клітин становив 98.5±2.7%. Аналіз взаємозв'язку «структура–гепатопротекторна дія» дозволив встановити ряді закономірностей. Показано, що галогенування бензенових фрагментів підвищує гепатопротекторну активність, що на думку авторів пов'язано з електронним ефектом замісника та підвищенням ліпофільності молекул. Також встановлено, що наявність фенольної гідроксильної групи є критичною для прояву біологічної дії, що підтверджується вищою активністю похідних шизангенолу порівняно з аналогами на основі шизандрину. Природа атому галогену також впливає на активність, у ряді випадків хлоровані похідні виявляються більш ефективними, ніж бром- або йодвмісні аналоги.

Tang та співавтори в своїй публікації описали підхід до створення нових гепатопротекторних агентів на основі структурної модифікації природного дитерпеноїдного лактона–андрографоліду (**27**, Рис. 1.12) [32]. Зазначена сполука міститься в рослині *Andrographis paniculata* та характеризується вираженою гепатопротекторною активністю, яка реалізується через індукцію ряду оксидоредуктаз (CYP1A2, CYP2E1 та інші), що приймають участь у метаболізмі ксенобіотиків та є частиною антиоксидантної системи організму. Необхідно зазначити, що застосування андрографоліду в медичній практиці обмежене його низькою розчинністю .

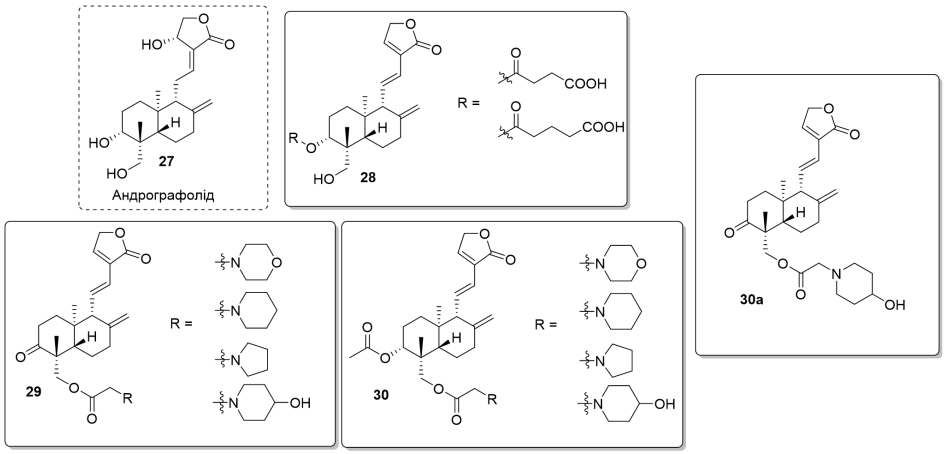


Рисунок 1.12

Для підвищення розчинності у воді авторами проведено структурну модифікацію андрографоліду шляхом введення Нітроген–вмісних насичених гетероциклічних фрагментів та карбоксильних груп (сполуки **28**–**30**, Рис. 1.12).

Гепатопротекторну активність речовин досліджували *in vivo* на моделі гострого CCl_4–індукованого ураження печінки у мишей. Встановлено, що ведення CCl_4 піддослідним тваринам призводило до різкого підвищення рівнів печінкових ферментів АЛТ та АСТ, що є маркерами ушкодження гепатоцитів. Застосування андрографоліду та його похідних сприяло зниженню цих показників, причому найбільш виражений ефект спостерігався для сполуки **30a**, яка значно перевищувала активність вихідної речовини та наближалася до дії референтного препарату силімарину. Результати гістологічних досліджень тканини печінки узгоджувались з біохімічними показниками. У контрольній патологічній групі спостерігалися некроз, вакуолізація гепатоцитів та порушення архітектоніки тканини. Натомість у групах лабораторних тварин, що отримували експериментальні речовини, особливо сполуку **30a**, відзначалося значне зменшення ступеня ушкодження та часткове відновлення нормальної структури печінки. Автори стверджують про наявність прямого кореляційного між водорозчинністю та біологічною активністю та пов’язують це з покращенням абсорбції та біодоступності сполук.

У роботі наукового колективу у складі Ibrahim та інших описано доволі оригінальний підхід до створення гепатопротекторних агентів на основі координаційних сполук перехідних металів, зокрема комплексів міді(II) з

албендазолом [33]. Вибір ліганду обумовлений здатністю альбендазолу (**31,** Рис. 1.13) виступати бідентатним лігандом, що дозволяє ефективно координувати іон Cu^{2+} з утворенням стабільних хелатних структур, потенційно здатних моделювати активні центри металоферментів.

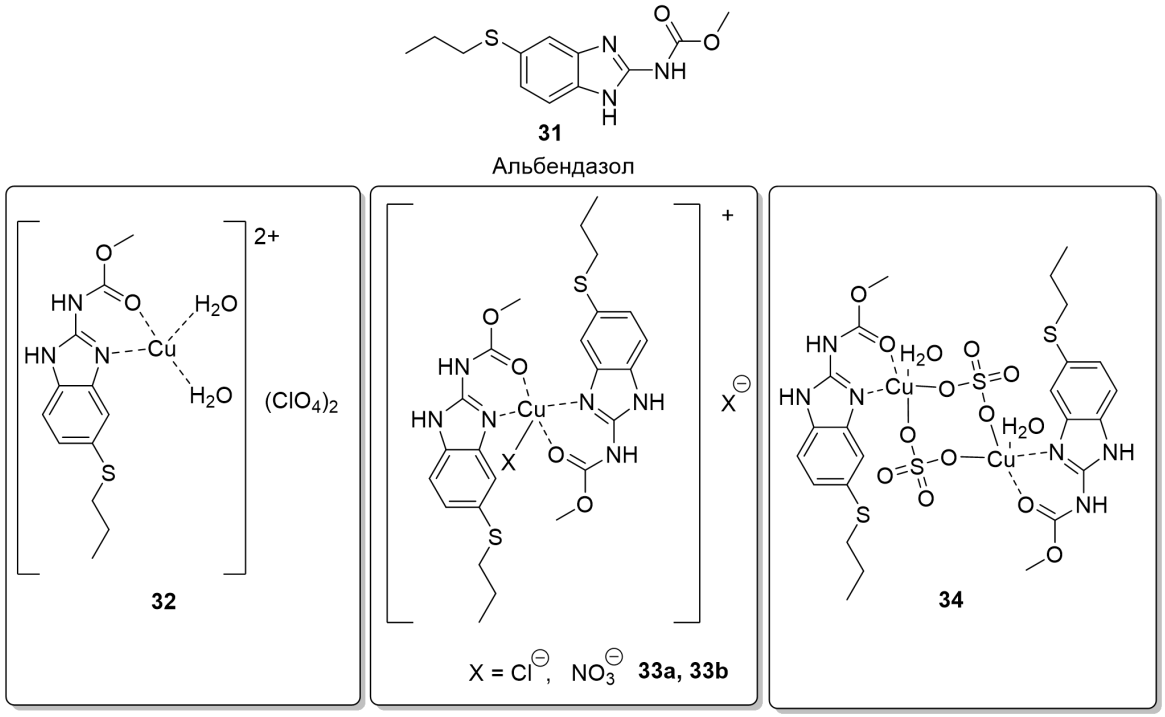


Рисунок 1.13

Біологічна активність оцінювалась на моделі CCl_4–індукованого ураження печінки. У дослідженні показано, що введення комплексів **32**–**34** призводить до відновлення активності ключових антиоксидантних ферментів (СОД, GST) та відновленого глутатіону (GSH), що свідчить про виражений гепатопротекторний ефект.

Робота наукового колективу у складі Bhakuni та інших присвячена дослідженню гепатопротекторних властивостей напівсинтетичних похідних природного флавоноїду морину (JPG-I та JPG-II) на моделі алкоголь-індукованого ураження печінки у щурів [34]. Морин (**35,** Рис. 1.14) є поліфенольною сполукою з встановленими антиоксидантними та метал-хелатуючими властивостями. Зазначені властивості є цінними в контексті створення препаратів для лікування патологічних станів асоційованих з оксидативним стресом, зокрема уражень печінки.

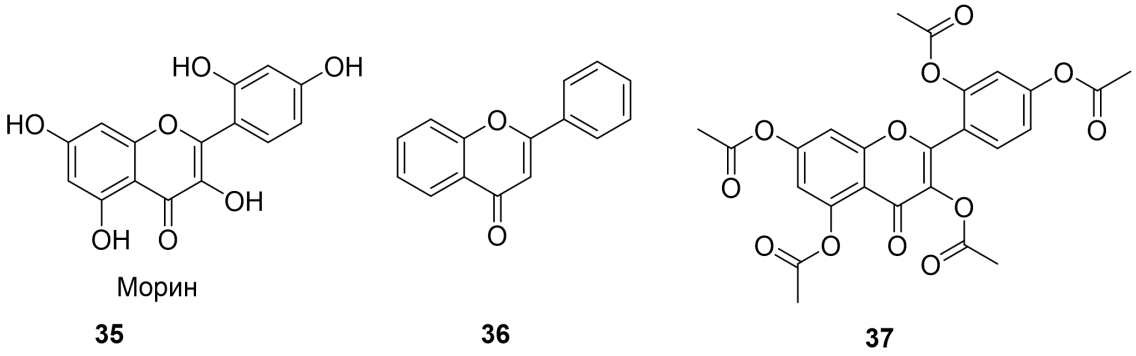


Рисунок 1.14

Біологічна активність оцінювалась на моделі хронічного етенол-індукованого гепатиту. Показано, що у контрольній патологічній групі спостерігалося підвищення рівнів маркерних ферментів (АЛТ, АСТ, ЛФ) та білірубіну, що є класичними маркерами ураження гепатоцитів. Введення, речовин, що досліджуються призводило до достовірного зниження зазначених показників. Додатково встановлено, що алкогольна інтоксикація викликає значне підвищення рівня ліпідної пероксидації (підвищення рівня MDA) та нітритів при одночасному виснаженні глутатіонової системи. Введення напівсинтетичних похідних морину (**36**, **37**) на фоні модельної патології призводило до нормалізації цих показників, а саме зниження рівня MDA та відновлення концентрації GSH. Це свідчить про виражену антиоксидантну дію, що є ключовим механізмом гепатопротекції. Крім того, встановлено значне зниження рівнів прозапальних цитокінів (TNF-α, IL-1β, IL-6) у печінці під дією досліджуваних сполук, що вказує на протизапальний компонент їх дії. За результатами дослідження авторами ідентифіковано сполуку **37** як найбільш активний гепатопротекторний агент з вираженою антиоксидантною та протизапальною дією. Автори пов’язують високу активність сполуки **37** з її підвищеною ліпофільністю. Необхідно відзначити суперечливість даного твердження, оскільки авторами не було проведено дослідження репрезентативної вибірки сполук для встановлення кореляційної залежності між ліпофільністю та гепатопротекторною дією.

Burle ті інші представили результати розробки таурин-вмісних аналогів пептидів з вираженою гепатопротективною та антиоксидантною дією [35].

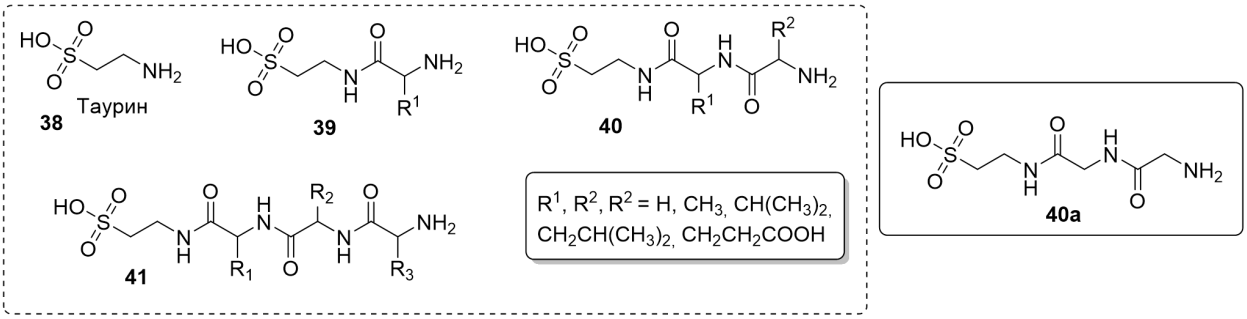
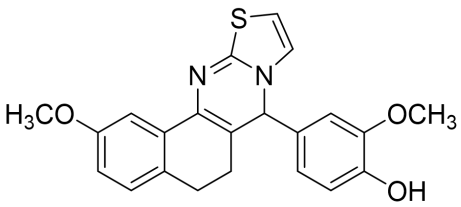


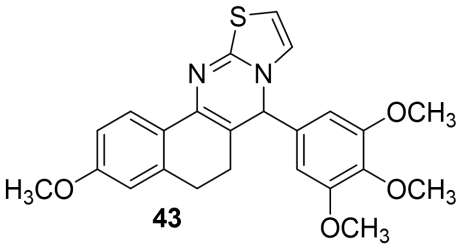
Рисунок 1.15

Авторами одержано ряд структурних аналогів пептидів (**39**–**41**, Рис. 1.15), що разом з фрагментом таурину містять залишки гліцину, аланіну, валіну, лейцину та глутамінової кислоти. Для одержаних пептид подібних речовин проведено докінгові дослідження, встановлено рівень антиоксидантної та гепатопротекторної дії. За результатами проведених досліджень показано, сполука **40a** характеризується найвищим рівнем як антирадикальної активності так і гепатопротекторної дії. Так на моделі зв'язування DPPH-радикалу зазначена сполука проявила активність на рівні IC_{50} становить 43.34 мкМ. Гепатопротекторну активність досліджували *in vivo* на моделі CCl_4-індукованого ураження печінки у щурів. Введення CCl_4 в групі з контрольною патологією призводило до значного підвищення рівнів печінкових ферментів (АЛТ, АСТ, ЛФ) та білірубіну. Застосування досліджених пептидо-подібних речовин, особливо сполуки **40a**, призводило до нормалізації даних показників та частковому відновленню морфології печінки, що підтверджено гістологічними дослідженнями.

В статті Keshari [36] та інших представлено результати дослідження гепатопротективної активності нового класу гетероциклічних сполук, а саме 5*H*-бензо[*h*]тіазоло[2,3-*b*]хіназолінів (**42, 43**, Рис. 1.16). Особливістю даної роботи є те, що гепатопротективна дія сполук вивчалася на тваринах з гепатоцелюлярною карциномою, індукованою N-нітрозодіетиламіном. Було встановлено, що введення останнього призводить до типових ознак ураження печінки: зниження маси тіла, збільшення маси печінки та формування пухлинних вузлів.



42



43

Рисунок 1.16

Розвиток модельованої патології супроводжувався розвитком оксидативного стресу, зниженням рівнів GSH, СОД, каталази та підвищенням вмісту продуктів пероксидного окиснення (МДА, білкові карбоніли). Введення досліджених речовин призводило до часткової нормалізації рівнів зазначених маркерів ураження печінки. Також одержані речовини суттєво знижують рівні маркерів запалення, зокрема IL-1β, IL-2, IL-6 та IL-10, рівень яких суттєво зростає в умовах розвитку патологічного процесу. Особливо важливим є пригнічення експресії IL-6, що підтверджено методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. Результати гістологічних досліджень показали, що введення експериментальних біологічно активних агентів тваринам з модельованою патологією призводить до відновлення структури печінки.

Дослідження Chu та співавторів присвячено розробці напрямків структурної модифікації тритерпеноїду з встановленою гепатопротекторною дією, а саме олеанолевої кислоти (**44**, Рис. 1.17) з метою створення сполук з вираженою гепатопротекторною активністю [37].

Структурна модифікація передбачала введення амінокислотних фрагментів у положення 3 карбоциклічної системи. Така модифікація мала за мету підвищення розчинності сполук у воді та введення додаткового амінокислотного фармакофорного фрагменту (сполуки **45**, Рис. 1.17).

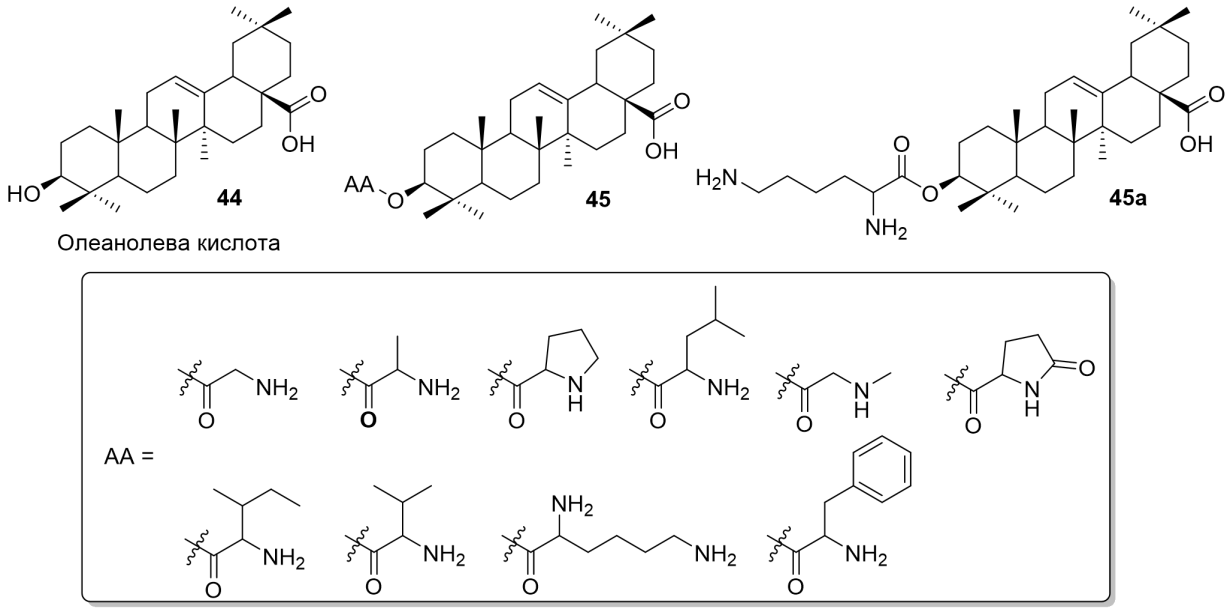


Рисунок 1.17

Відповідно до проведених досліджень *in vivo* на моделі гострого CCl_4- індукованого ураження печінки, виявляє виражену гепатопротективну дію. Так, відповідно до гістологічних досліджень сполука **45a** виявляє виражену гепатопротекторну дію та значно зменшують прояв патологічних змін обумовлених введенням CCl_4, а саме балоноподібний набряк гепатоцитів та інтерстиційна інфільтрація запальними клітинами. Також введення зазначеної речовини призводить до зниження рівнів АЛТ і АСТ майже до рівня інтактних тварин.

Han та співавтори дослідили гепатопротекторну активність напівсинтетичних похідних пікрозиду (**46**)–основного біологічно-активного компонента *Picrorhizae Rhizoma*, яка традиційно використовується у китайській медицині для лікування захворювань печінки [38]. Відомо, що пікрозиди здатні пригнічувати активацію печінкових зірчастих клітин, зменшувати утворення активних форм кисню та продукцію прозапальних факторів, що забезпечує їх виражений гепатопротекторний ефект.

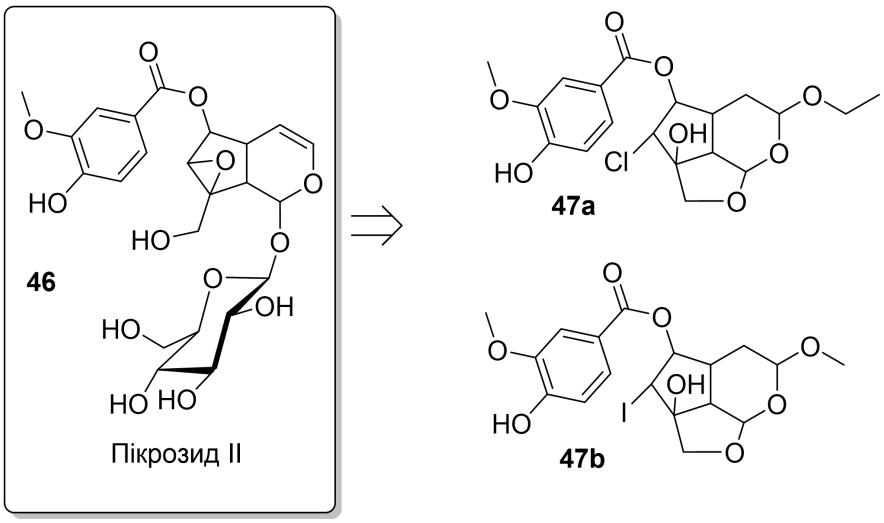


Рисунок 1.18

Біологічну активність оцінювали *in vitro* на клітинній лінії SMMC- 7721, використовуючи модель оксидативного ушкодження клітин. За результатами дослідження встановлено, що напівсинтетичні похідні **47a** та **47b** (Рис. 1.18) за рівнем гепатопротекторної активності перевищують препарат порівняння силімарин. Проведений аналіз взаємозв'язку «будова дія–гепатопротекторна дія» показав, що видалення цукрового залишку є раціональним напрямком структурної модифікації, оскільки присутність остатнього зменшує гепатопротекторну дію сполук даного ряду.

Науковим колективом у складі S. Abu-Melha та співавторів проведено ґрунтовне дослідження [39] біологічних властивостей ряду тіазол-піразольних гетероциклічних гібридних похідних (сполуки **48**, **49**, Рис. 1.19).

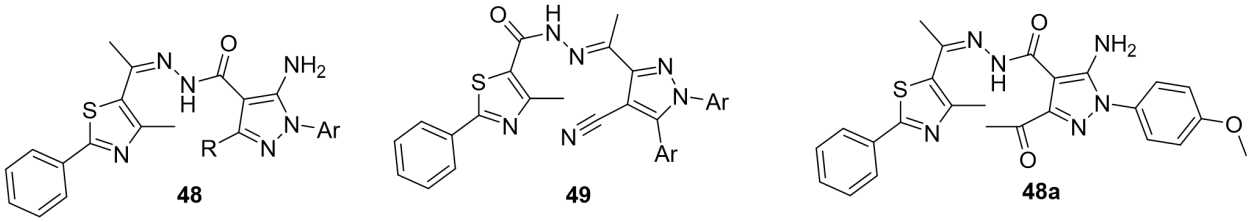


Рисунок 1.19

Дослідження гепатопротекторної активності проводили in vitro на моделі CCl_4–індукованої гепатотоксичності. Показано, що одержані сполуки проявляють помірну або низьку гепатопротекторну активність, яка загалом

суттєво поступалась препарату порівняння силімарину. Найбільш активною речовиною виявилась сполука **48a**.

Bhat та співавтори дослідили гепатопротекторну активність серію нових гібридних похідних дигідропіримідинону/1,4-бензодіоксану, з метою створення ефективних гепатопротекторних агентів [40].

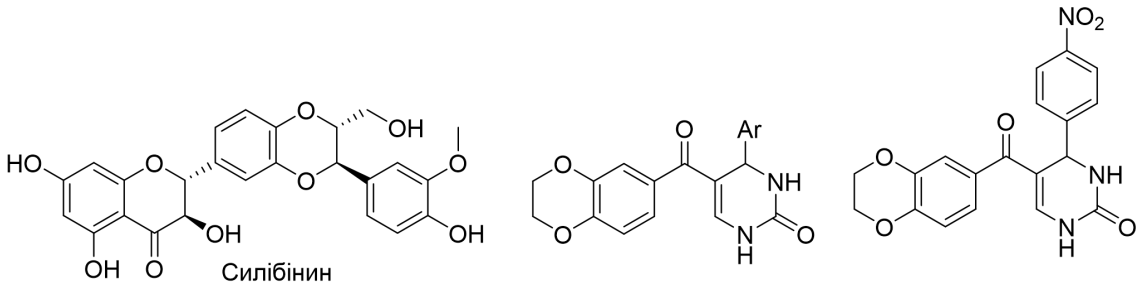


Рисунок 1.20

При дизайні потенційних гепатопротекторів автори спиралися на той факт, що 1,4-бензодіоксановий фрагмент є структурним елементом силібінину (**50**, Рис. 1.20) відомої сполуки природного походження з вираженою гепатопротекторною активністю, а для похідних піримідину описана репаративна активність, в тому числі по відношенню до клітин печінка. Поєднання зазначених фрагментів в одній молекулі дозволяє очікувати від сполук вираженої гепатопротекторної дії за рахунок одночасного впливу на різні ланки патогенезу гепатотоксичності.

Попередній скринінг біологічної активності проводився *in vitro* на моделі CCl_4–індукованої гепатотоксичності. Серед синтезованих сполук найбільш виражену активність продемонструвала сполука **51a** (Рис. 1.20). У дослідах in vitro на клітинах HepG2 вона забезпечувала максимальне відновлення життєздатності клітин після дії CCl_4. Важливо, що сполука не проявляла цитотоксичності щодо нормальних клітин MCF-10A, що свідчить про її низьку токсичність.

Результати *in vivo* підтверджують високу ефективність сполуки, її введення призводить до значного зниження рівнів печінкових ферментів (АСТ,

АЛТ, ЛФ, GGT) та білірубіну, що є прямим маркером зменшення ушкодження гепатоцитів. Крім того, спостерігається нормалізація ліпідного профілю, зниження рівнів холестерину, тригліцеридів, ліпопротеїдів низької та наднизької щільності при одночасному підвищенні ліпопротеїдів високої щільності. Авторами показано, що гепатопротекторна активність досліджених сполук вірогідно асоційована з її антиоксидантної дії. Так, сполука **51a** значно знижує рівень малонового діальдегіду (MDA), відомого маркера перекисного окиснення ліпідів, а також підвищує рівень небілкових тіолів, що свідчить про відновлення антиоксидантної системи клітини. Гістологічні дослідження повністю узгоджуються з даними біохімічних методів демонструючи відновлення нормальної морфології печінки.

У роботі Kapelle та співавторів досліджено гепатопротекторні властивості синтетичних аналогів куркуміну, отриманих із ефірної олії *Cinnamomum cullilawan* [41]. Основним вихідним компонентом цієї олії є сафрол, який завдяки наявності реакційноздатних функціональних груп може використовуватися як прекурсор для синтезу біологічно активних сполук, зокрема аналогу куркуміну **52** (Рис. 1.21).

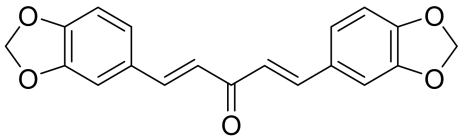


Рисунок 1.21

Актуальність дослідження обумовлена добре відомими гепатопротекторними властивостями куркуміну, природної поліфенольної сполуки, яка здатна знижувати оксидативний стрес, нейтралізувати вільні радикали та сприяти відновленню ушкоджених клітин печінки. Водночас модифікація структури куркуміну дозволяє потенційно покращити його фармакологічні характеристики, включаючи стабільність і біодоступність.

Гепатопротекторну активність сполуки **52** оцінювали *in vivo* на моделі CCl_4–індукованого ураження печінки у мишей. Введення CCl_4 призводить до підвищення рівнів ферментів АЛТ та АСТ, що є класичними маркерами

ушкодження гепатоцитів. Застосування синтетичних аналогів куркуміну сприяє зниженню цих показників. Додатковим підтвердженням ефективності є гістологічні дослідження печінкової тканини. У групах, що отримували синтетичний аналог куркуміну, спостерігається поступове відновлення структури печінки, зменшення жирової інфільтрації та ознаки регенерації клітин. Особливо виражений регенеративний ефект спостерігається при застосуванні у високих дозах (52 мг/200 г маси тіла).

Liu та іншими [42] досліджено антиоксидантні та гепатопротекторні властивості похідного флоридзину, а саме флуоридзин-6-О-міристату. Зазначена речовина була отримана шляхом ферментативного ацилювання природного флавоноїдного глікозиду. Флоридзин (**53**, Рис. 1.22) є природною сполукою з широким спектром біологічних ефектів, в той самий час її практичне застосування ускладняється через низьку проникну здатність через мембрани. Враховуючи зазначене модифікація структури шляхом введення жирнокислотного фрагмента розглядається як ефективний підхід до покращення фармакокінетичних властивостей.

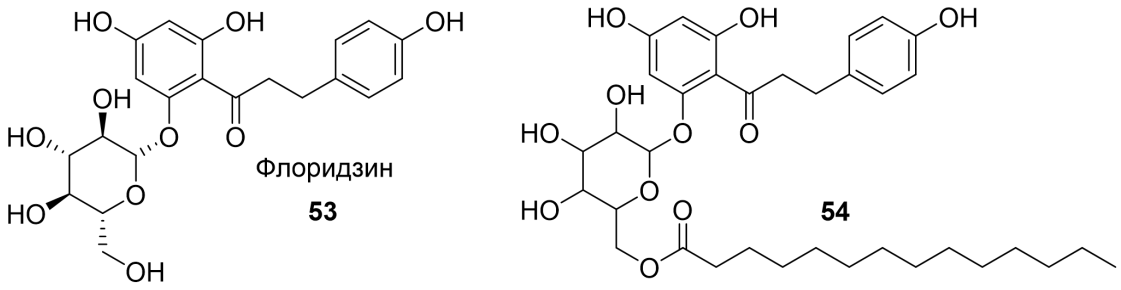


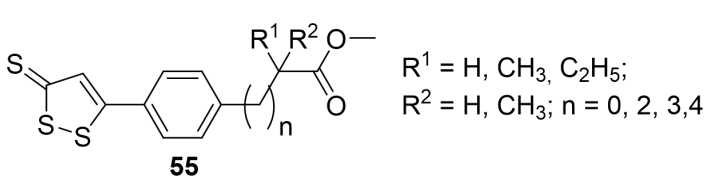
Рисунок 1.22

Антиоксидантні властивості досліджували *in vitro* із використанням методів FRAP, ABTS та DPPH. Встановлено, що одержане ацильоване похідне флоризину (сполука **54**, Рис. 1.22) характеризується вищою загальною антиоксидантною здатністю (FRAP) порівняно з вихідною сполукою, здатність до зв'язування ABTS-радикалу залишається на аналогічному рівні, а DPPH-радикалу на дещо нижчому рівні у порівнянні з природним агентом.

Гепатопротекторну активність ацильованої похідної - оцінювали *in vivo* на моделі гострого CCl_4–індукованого ураження печінки.

За даними експериментальних досліджень введення CCl_4 призводить до різкого підвищення активності АЛТ і АСТ, що свідчить про порушення цілісності клітинних мембран гепатоцитів. Введення сполуки, що досліджується значно знижує рівні цих ферментів, що свідчить про виражену гепатопротекторну дію, яка відповідно до одержаних результатів була на рівні зі сполукою порівняння силімарином. Для встановлення механізмів гепатопротекторної дії авторами додатково досліджено вплив сполуки **54** на антиоксидантну систему організму та рівень ключових маркерів запалення. Встановлено, що введення сполуки, що досліджується на тлі розвинутої CCl_4- індукованої патології призводить до відновлення активності ферментів антиоксидантного захисту (каталаза, супероксидисмутаза, глутатіонпероксидаза). Одночасно спостерігається зниження рівня малонового діальдегіду (МДА), який є маркером перекисного окиснення ліпідів, що свідчить про пригнічення оксидативного стресу. Додатково встановлено вплив на запальні процеси. Зокрема, рівень інтерлейкіну-6 (IL- 6), який значно підвищується при CCl_4–індукованому ушкодженні, суттєво знижується під дією PZM. Це вказує на здатність сполуки модулювати запальну відповідь і стимулювати регенерацію печінкової тканини.

Shao та співавтори представили результати дослідження [43] нових синтетичних сполук, а саме похідних фібратів, що містять додатковий фармакофорний фрагмент 5-(4-гідроксифеніл)-1,2-дитіол-3-тіону (сполуки 55, Рис. 1.23). Дослідження спрямоване на створення багатофункціональних агентів, здатних поєднувати гіполіпідемічну та гепатопротекторну дію.



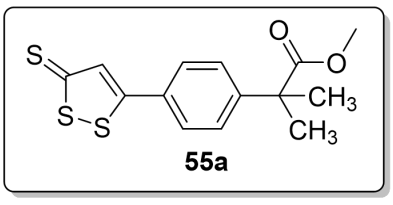
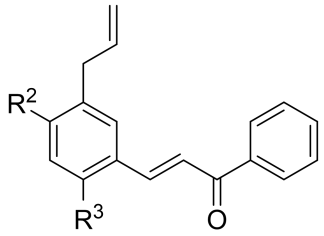


Рисунок 1.23

Оцінку гепатопротекторної дії одержаних речовин проводили для лабораторних тварин з експериментальною гіперліпідемією. Встановлено, що введення сполуки **55a** на фоні модельної патології знижує рівні ферментів АЛТ та АСТ, що підтверджує її гепатопротекторні властивості.

Гістологічні дослідження тканин печінки показали, що у тварин з модельною патологією спостерігається значна жирова інфільтрація, запалення та структурні пошкодження тканини. Введення сполуки **55a** призводить до істотного зменшення накопичення ліпідів у гепатоцитах та відновлення нормальної морфології печінки. Методами біохімічних досліджень встановлено, що введення сполуки **55a** призводило до підвищення активності супероксиддисмутази та зниження рівня малонового діальдегіду (МДА), що свідчить про пригнічення процесів перекисного окиснення ліпідів. Також введення сполуки **55a** призводило до зниження рівнів прозапальних цитокінів TNF-α та IL-6, що вказує на пригнічення запальної відповіді.

У роботі Zhao та інших представлено результати дослідження метою якого було створення інноваційних препаратів здатних впливати на метаболізм та виявляти гіпоглікемічну, гіполіпідемічну та гепатопротекторну активність [44]. Авторами описано дизайн, синтез та біологічну оцінку нових аліл-халконів (сполуки **56**, Рис. 1.24) як інгібіторів білкової тирозинфосфатази 1B.



56

Рисунок 1.24

Серед іншого показано, що введення досліджених сполук експериментальним тваринам з модельованим діабетом призводило до зниження рівнів печінкових ферментів (АЛТ, АКР), а також до зменшення стеатозу печінки, що підтверджено гістологічними дослідженнями.

У роботі Xu та інших описано дизайн да дослідження гепатопротекторної активності водорозчинних аналогів силібініну [45]. Силібінін (**50**) є флавоноїдом широко застосовуваним у терапії захворювань печінки завдяки антиоксидантним, протизапальним та противірусним властивостям, однак його практичне використання обмежене дуже низькою розчинністю у воді та, відповідно, низькою біодоступністю.

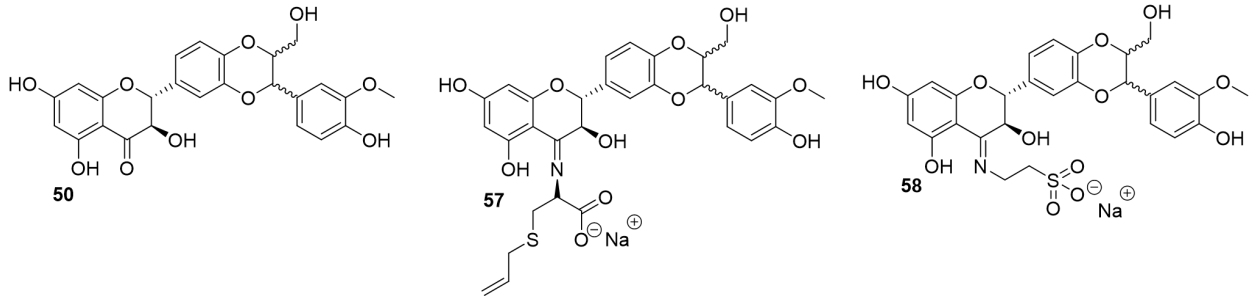


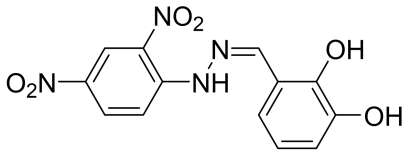
Рисунок 1.25

Авторами проведено структурну модифікацію силібініну, що не змінює хімічну природу фармакофорних фрагментів. На відміну від традиційних підходів, що передбачають модифікацію гідроксильних груп, автори використали карбонільну групу для утворення шиффових основ із сірковмісними амінокислотами та їх аналогами (сполуки **57**, **58,** Рис. 1.25). Такий підхід дозволяє одночасно підвищити гідрофільність молекули, зберегти гідроксильні функціональні групи та ввести додаткові фармакофорні фрагменти. Дослідження показали, що одержані синтетичні похідні мають значно вищу розчинність у воді у порівнянні з силібініном.

Біологічна активність оцінювалася на моделі гострого CCl_4-індукованого ураження печінки. Гістологічний аналіз показав значне зменшення некрозу гепатоцитів у групах тварин яким вводили сполуки **57**, **58,** як у порівнянні з групою контролю, так і групою якій вводився силібінин. Крім того, рівні печінкових ферментів (АЛТ, АСТ) у сироватці крові суттєво знижувалися під дією похідних, що свідчить про їх виражений гепатопротекторний ефект. Додатково встановлено, що введення сполук **57**, **58** призводила до зниження рівнів прозапальних цитокінів (TNF-α, IL-6, IL-1β) та підвищенні рівня

протизапального інтерлейкіну IL-10. Імуногістохімічний аналіз також показав зменшення інфільтрації макрофагів у тканині печінки. Це свідчить про пригнічення запальної відповіді як на клітинному, так і на тканинному рівнях. Також встановлено антиапоптичні властивості одержаних похідних силібінину **57**, **58**.

Науковий колектив у складі Attaullah та інших опублікував [46] результати досліджень гепатопротекторної активності синтетичної сполуки **59** (Рис. 1.26).

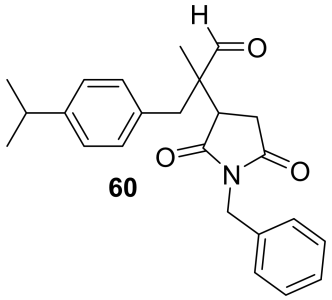


59

Рисунок 1.26

Дослідження гепатопротекторної активності проводилось *in vivo* на моделі інтоксикації парацетамолом. Показано, що введення парацетамолу контрольній патологічній групі призводить до підвищення рівнів маркерів ураження печінки, зокрема АЛТ, ЛФ та білірубіну. Введення дослідженої речовини до достовірного зниження зазначених показників, що вказує на виражену гепатопротекторну дію. Морфологічні дослідження печінки підтверджують біохімічні дані. Введення сполуки **59** призводить до зменшення некротичних зон, нормалізація архітектоніки гепатоцитів та зниження запалення. Додатково авторами встановлено, що сполука **59** проявляє високу антирадикальну активність на моделі зв'язування DPPH-радикалу, що розглядається як ймовірний механізм реалізації гепатопротекторної дії.

Qayyum та співавтори дослідили [47] гепатопротекторну активність нової синтетичної сполуки – похідної сукциніміду (сполука **60**, Рис. 1.27).



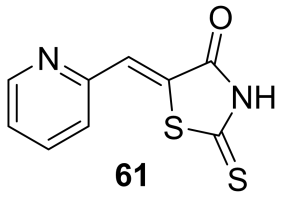
60

Рисунок 1.27

Дослідження гепатопротекторної дії проводилось на моделі фторурацил-індукованої гепатоксичності. Показано, що введення 5-фторурацилу піддослідним тваринам веде до значного підвищення рівнів ключових маркерів ураження печінки, а саме АЛТ, АСТ, ЛФ та білірубіну. Зазначені показники свідчать про пошкодження гепатоцитів та порушення мембранної цілісності. Введення сполуки **60** ефективно нормалізувало ці показники, причому гепатопротекторна активність була дозозалежною.

Гістологічні дослідження підтверджують біохімічні результати. Введення 5-фторурацилу викликало центролобулярний некроз, фіброз і запалення, тоді як введення сполуки **60** сприяло регенерації гепатоцитів і зменшенню патологічних змін. Автори стверджують, що досліджена ними речовина, має потенціал застосування при хіміотерапії 5-фторурацилом для зменшення побічних ефектів останнього.

Mhaidat провів дослідження гепатопротекторних властивостей похідного тіазолідину, а саме 5-(піридин-2-ілметилен)-2-тіоксотіазолідин-4-ону (сполука **61**, Рис. 1.28) в умовах моделі ураження печінки у щурів N-нітрозодиетиламіном [48].



61

Рисунок 1.28

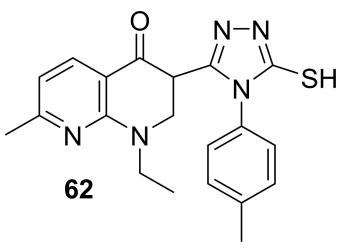
Встановлено, що введення N-нітрозодиетиламіну призводило до виражених біохімічних змін, що проявлялися підвищенням рівнів загального, прямого та непрямого білірубіну, а також активності печінкових ферментів, а саме аспартатамінотрансферази, аланінамінотрансферази та лужної фосфатази, що свідчить про розвиток цитолітичного синдрому. Одночасно спостерігалося

підвищення концентрацій прозапальних цитокінів TNF-α та IL-6, що відображає активацію запального процесу.

Введення сполуки **61** супроводжувалося нормалізацією біохімічних показників функції печінки та зниженням рівнів прозапальних медіаторів, що підтверджено результатами імуноферментного аналізу. Гістологічні дослідження показали, що у тварин під впливом N-нітрозодиетиламіну формуються характерні патологічні зміни, зокрема фіброз, некроз та інфільтрація запальних клітин, тоді як у тварин, які отримували досліджувану сполуку, ці зміни були значно менш вираженими. Дані імуногістохімічного аналізу продемонстрували інтенсивну експресію маркерів HSA та Ki-67 у патологічній групі, що свідчить про активацію проліферативних процесів, тоді як у групі лікування рівень експресії цих маркерів істотно знижувався. Додатково, за допомогою молекулярного докінгу встановлено, що сполука **61** здатна ефективно взаємодіяти з ключовими прозапальними білками, зокрема TNF-α та IL-6, що може пояснювати один із механізмів її біологічної дії.

У роботі Mhaidat та співавторів досліджено гепатопротекторні властивості похідного 5-меркапто-1,2,4-тріазолу (сполука **62**, Рис. 1.29), отриманого на основі налідиксової кислоти, на моделі токсичного ураження печінки, індукованого тетрахлорметаном [48].

Визначення гепатопротекторної активності включало дослідження на мишах, розподілених на чотири групи: контрольну, групу з CCl_4–індукованою гепатотоксичністю, а також групи попереднього та одночасного лікування сполукою **62** в дозі 200 мг/кг. Біохімічні результати демонструють, що введення CCl_4 викликає різке підвищення активності печінкових ферментів АЛТ і АСТ, що є типовим маркером ушкодження гепатоцитів. При застосуванні сполуки ці показники значно знижуються, наближаючись до контрольних значень.

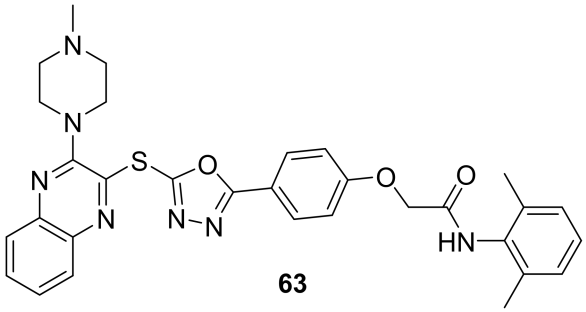


62

Рисунок 1.29

Оксидативний статус тканин також зазнає суттєвих змін. Введення CCl_4 значно підвищує рівень МДА у печінці, що підтверджує інтенсивне пероксидне окиснення ліпідів. Водночас у групах, які отримували сполуку **62**, спостерігається достовірне зниження МДА, що свідчить про антиоксидантну дію сполуки. Введення сполуки **62** додатково нормалізує показники супероксиддисмутази (СОД) та каталази.

У роботі Sonawane та інших розглянуто [49] синтез, структурну характеристику та фармакологічну активність нових похідних 1,3,4-оксадіазолу (сполука **63**, Рис. 1.30).

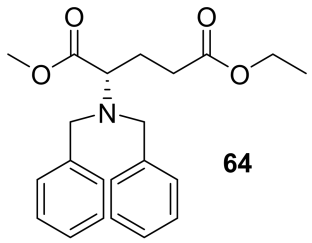


63

Рисунок 1.30

Серед іншого авторами було встановлено, що сполука **63** виявляє виражену гепатопротекторну дію на фоні введення N-нітрозодіетиламіну та тетрахлорметану. Гепатопротекторний ефект проявлявся через зниження рівнів печінкових ферментів (АЛТ, АСТ, ЛФ) та білірубіну. Додатково, встановлено, що сполука **63** сприяє нормалізації рівнів маркерів стану антиоксидантної системи, зокрема супероксиддисмутази (СОД), каталази, глутатіонпероксидази (GPx) та рівень малонового діальдегіду (МДА).

У дослідженні Miao Lv та інших здійснено раціональний дизайн синтетичних похідних на основі структурної модифікації L-теаніну, серед яких сполука **64** (Рис. 1.31) виявилася найбільш перспективним антифібротичним агентом [50].



64

Рисунок 1.31

За результатами *in vitro* експериментів встановлено, що сполука **64** дозозалежно інгібує активацію зірчастих клітин печінки (лінії LX-2 та mHSC), індуковану TGF-β1, що свідчить про її здатність пригнічувати ключові механізми фіброгенезу. У *in vivo* моделях фіброзу печінки - зокрема при перев'язці жовчної протоки у щурів та за умов метіонін-холін-дефіцитної високожирової дієти у мишей сполука **64** достовірно зменшувала ступінь ушкодження печінки, вираженість фіброзу та запальні процеси, демонструючи виражені гепатопротекторні властивості. Авторами встановлено, що сполука **64** здатна безпосередньо взаємодіяти з катепсином D, сприяючи його деградації, що, у свою чергу, призводить до пригнічення експресії генів, пов'язаних із фіброгенезом і запаленням [51].

Таким чином, аналіз сучасних літературних даних свідчить, що, незважаючи на значну кількість досліджень, присвячених пошуку та розробці засобів із гепатопротекторними властивостями, проблема ефективної корекції метаболічних порушень при токсичних ураженнях печінки залишається актуальною. Особливий інтерес становлять синтетичні гетероциклічні сполуки, зокрема похідні птеридину, структурна модифікація яких відкриває можливості для одержання біологічно активних речовин із потенційними антиоксидантними та гепатопротекторними властивостями. Водночас біологічна активність *S*-заміщених похідних птеридину, їх токсикологічні характеристики та здатність впливати на біохімічні механізми токсичного ураження печінки вивчені недостатньо. Зокрема, потребують подальшого дослідження їхній вплив на інтенсивність вільнорадикального окиснення та перекисного окиснення ліпідів, стан ферментативної і неферментативної ланок антиоксидантного захисту,

біохімічні показники функціонального стану печінки та структурні зміни печінкової тканини. Недостатньо з’ясованими залишаються також взаємозв’язки між антиоксидантними властивостями цих сполук та реалізацією їх потенційної гепатопротекторної дії за умов токсичного ураження печінки. Це обґрунтовує доцільність комплексного дослідження *S*-заміщених похідних птеридину із застосуванням *in silico, in vitro* та *in vivo* підходів з метою пошуку перспективних біологічно активних сполук та поглибленого вивчення механізмів їх захисної дії при токсичному ураженні печінки.

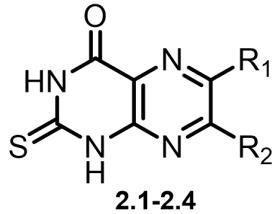
РОЗДІЛ 2
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Характеристика об'єкта досліджень

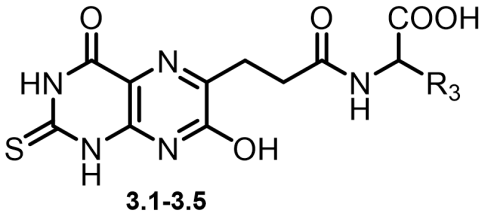
Для пошуку біологічно активних речовин (БАР), які корегують токсичні ураження печінки (гострий гепатит), було використано ряд (22 речовини) *S*- заміщених 2-тіоксо-2,3-дигідроптеридин-4(1*H*)-онів (табл. 2.1). Зазначені речовини були синтезовані на кафедрі органічної хімії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету під керівництвом професора Коваленка С. І. [52]. Для оцінки біологічної активності використані методи віртуального скринінгу (*in silico)* (ProTox- II, SwissADME-аналіз, молекулярний докінг) та *in vitro* (інгібування утворення вільних радикалів) для відбору найактивніших сполук для подальших досліджень. Крім того, для покращення фармакокінетичних та фармако–технологічних характеристик найактивнішої та відносно нешкідливої сполуки **4.4** (3-(2-((карбоксиметил)тіо)-4,7-діоксо-3,4,7,8-тетрагідроптеридин-6-іл)-пропіонової кислоти), була одержана динатрієва сіль **DCTP** [53], яка була використана для подальших досліджень на експериментальних моделях токсичного ураження печінки.

Таблиця 2.1

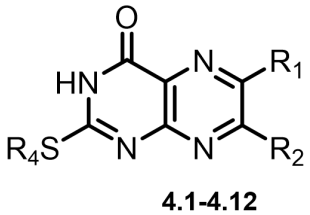
Будова S-заміщених 2-тіоксо-2,3-дигідроптеридин-4(1H)-онів



2.1-2.4



3.1-3.5



4.1-4.12

№ сполук	R_1	R_2	R_3	R_4
1	2	3	4	5
2.1	Me	Me	–	–

Продовження таблиці 2.1

1	2	3	4	5
2.2	Ph	Ph	–	–
2.3	Me	OH	–	–
2.4	–$(CH_2)_2$COOH	OH	–	–
3.1	–	–	H	–
3.2	–	–	Me	–
3.3	–	–	*i*-Pr	–
3.4	–	–	*s*-Bu	–
3.5	–	–	Bn	–
4.1	Me	Me	–	-CH_2COOH
4.2	Ph	Ph	–	-CH_2COOH
4.3	Me	OH	–	-CH_2COOH
4.4	–$(CH_2)_2$COOH	OH	–	-CH_2COOH
4.5	–$(CH_2)_2$COOH	OH	–	-CH(Me)COOH
4.6	Me	Me	–	-$CH_2C(O)NHC_6H_4$Cl-3
4.7	Ph	Ph	–	-$CH_2C(O)NH_2$
4.8	–$(CH_2)_2$COOH	OH	–	-$CH_2C(O)NH_2$
4.9	–$(CH_2)_2$COOH	OH	–	Bn
4.10	–$(CH_2)_2$COOH	OH	–	-$CH_2C_6H_4$F-2
4.11	–$(CH_2)_2$COOH	OH	–	-$CH_2C_6H_4$Cl-2-F-6
4.12	–$(CH_2)_2$COOH	OH	–	-$CH_2C_6H_4Cl_2$-2,6
4.13	–$(CH_2)_2$COOH	OH	–	-$CH(CH(Me)_2)$COOH

***Примітка:** Me – метильна група (–CH_3); Ph – фенільна група (–C_6H_5); OH- гідроксильна група (–OH); i-Pr – ізопропільна група [–$CH(CH_3)_2$]; s-Bu – втор-бутильна (sec-бутильна) група [–$CH(CH_3)CH_2CH_3$]; Bn – бензильна група (–$CH_2C_6H_5$).

2.2. Дослідження з використанням *in silico* методології

2.2.1. Прогнозування критеріїв токсичності *S*-заміщених 2-тіоксо-2,3-дигідроптеридин-4(1H)-онів з використанням програмного забезпечення ProTox-II

Сайт ProTox-II (https://tox-new.charite.de/protox_II/index.php?site=compound_input) використовувався для прогнозування критеріїв токсичності молекул [104]. ProTox-II включає молекулярну подібність, фармакофори, схильність до утворення фрагментів і моделі машинного навчання для прогнозування різних кінцевих точок токсичності (гостра токсичність, гепато–токсичність, цитотоксичність, канцерогенність, мутагенність, імуно–токсичність.

2.2.2. Дослідження фізико-хімічних, фармакокінетичних параметрів та критеріїв «drug-like» *S*-заміщених 2-тіоксо-2,3-дигідроптеридин-4(1H)-онів з використанням програмного забезпечення SwissADME

Віртуальна лабораторія сайту SwissADME (http://www.swissadme.ch/index.php) використана для розрахунку фізико-хімічних дескрипторів, а також для прогнозування параметрів ADME, фармакокінетичних властивостей та оцінки «лікоподібності» досліджуваних сполук [55]. Основні підходи та базова методологія SwissADME, як безкоштовного веб-інструменту для оцінки фармакокінетики та подібності лікарських засобів, описані в наукових публікаціях [54–57].

2.2.3. Дослідження спорідненості *S*-заміщених 2-тіоксо-2,3-дигідроптеридин-4(1H)-онів до біологічних мішеней з використанням молекулярного докінгу

Дослідження проводилися методом гнучкого молекулярного докінгу, як підходу до пошуку молекул зі спорідненістю до конкретної біологічної мішені. Методологія докінгу була валідована за допомогою процедури повторного докінгу нативного *N*-[4-(3-хлораніл-4-ціанофенокси)-циклогексил]-1,1,1-трис(фтораніл)-метансульфонаміду (PDB ID 5A5I) у CYP2C9 (PDB ID 5A5I) [58,59]. Значення середньоквадратичного відхилення (RMSD) між нативною та рефе–рентною конформаціями було розраховано за допомогою онлайн-ресурсу ProFit Results і склало 1,967 Å, що підтверджує відтворюваність отриманих експериментальних даних.

Отримання лігандів. Речовини були сконструйовані за допомогою програми BIOVIADraw 2021, а отримана інформація збережена у форматі .mol. Оптимізацію структур проводили програмою Chem3D за молекулярно-механічним алгоритмом ММ2. Файли були збережені у форматі .pdb. Для перетворення .pdb файлів у .pdbqt використовували програму AutoDock-Tools-1.5.6, кількість активних скручувань встановлювали за замовчуванням [60,61].

Підготовка білків. Для видалення молекул води та лігандів використо–вували програму Discovery Studio Visualizer 2021. Структуру білка зберігали у форматі .pdb [60]. За допомогою програми AutoDockTools-1.5.6 додавали полярні гідрогени та зберігали їх у форматі .pdbqt [59]. Розмір Grid box та його центр визначали відносно нативного ліганду. Розмір сітки: CYP 2C9 (PDB ID 5A5I) x = 71.14, y = 1.59, z = -1.77; розмір x = 18, y = 22, z = 16. Для проведення стикування використовували Vina [60]. Для візуалізації використано Discovery Studio 2021 [61].

2.3. Дослідження з використанням *in vitro* методології

2.3.1. Визначання антирадикальної активності *S*-заміщених 2-тіоксо-2,3-дигідроптеридин-4(1H)-онів

Дослідження антирадикальної активності *in vitro* ґрунтувалося на взаємодії синтезованих сполук з 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразилом (DPPH) [62]. DPPH є стабільним вільним радикалом і його спиртові розчини забарвлені в інтенсивний фіолетовий колір (λmax = 517 нм). DPPH взаємодіє із сполуками, які здатні зв'язуватися з вільними радикалами, утворюючи при цьому продукти жовтого кольору, що не поглинають світло на вищевказаних довжинах хвиль.

Методика дослідження. 2 мл 1 мМ розчину сполуки в ДМСО змішували з 2 мл 0.1 мМ метанольного розчину DPPH, інкубували протягом 30 хв при 25 °С та визначали оптичну густину (λ^{max} = 517 нм). Паралельно визначалась оптична густина 2 мл 0.1 мМ метанольного розчину DPPH в 2 мл ДМСО (ADPPH). Антирадикальну активність (АРА) розраховували за формулою АРА% = (ADPPH – Ад)/ADPPH × 100%. Зважування реагентів та синтезованих сполук проводилось на електронних вагах «ANG200C». оптична густина вимірювалось на спектрофотометрі «ULAB 131UV». Кількість повторів–три рази.

2.3.2. Визначання антиоксидантної активності *S*-заміщених 2-тіоксо-2,3-дигідроптеридин-4(1H)-онів

Дослідження антиоксидантної активності *in vitro* ґрунтувалося на здатності досліджуваних сполук зв'язувати або запобігати утворенню високоактивних радикалів при окисленні ліноленової кислоти [63].

Методика дослідження. 30 мкл 10 мМ розчину сполуки у DMSO та 30 мкл 16 мМ розчину натрію лінолеату в 0.05 М фосфатному буфері (pH 7.4) було додано у кювету, що містила 2.79 мл 0.05 М фосфатного буферу (pH 7.4), що був попередньо термостатований при 37 °С. Реакція окислення буда ініційована

додаванням 150 мкл 40 мМ розчину 2,2'-азо-біс(2-метилпропіон–амідин)дигідрохлориду (ААРН) [63] при 37°С та доступі повітря. Суміш, що утворилась витримували при 37°С протягом 1 год. Оптичну густину реєстрували при λ = 234 нм з використанням спектрофотометру ULab 108 UV. Тролокс (CAS:53188-07-1, Merck) був використаний як препарат порівняння. Кількість повторів–три рази. Антиоксидантну активність розраховували за формулою:

$$АОА\% = ((OD_{контроль}-OD_{експеримент})/OD_{контроль})*100\%.$$

2.4. Методи *in vivo* (експериментальні методи дослідження) на тваринах

2.4.1. Дослідження на експериментальних тваринах

У дослідженнях використовували 112 дорослих щурів-самців (180- 250 г) лінії Wistar (Вістар), а також 48 білих безпородних самців мишей масою (16- 24 г), які утримувалися в стандартних умовах віварію (температура 20±5°С, вологість 65±5%) [64]. Усі маніпуляції проводили згідно із затвердженим протоколом №1 засідання комісії з біоетики біологічного факультету Запорізького національного університету від 09 вересня 2022 року, що керується Конвенцією Ради Європи про біомедицину та у розділах і положеннях Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (із змінами, внесеними згідно із Законами № 1759- VI (1759-17) від 15.12.2009, ВВР, 2010, № 9, ст.76, №5456- VI (5456- 17) від 16.10.2012, ВВР, 2013, № 46, ст.640, № 5456-- VI від 16.10.2012, № 5459- VI (5459- 17) від 16.10.2012, ВВР, 2013, № 48, ст.682, № 406- VII (406-18) від 04.07.2013, ВВР, 2014, № 20- 21, ст.712, № 1193- VII (1193- 18) від 09.04.2014, ВВР, 2014, № 23, ст.873), які стосуються використання тварин в наукових цілях [64].

Догляд за тваринами та експериментальні протоколи проводилися відповідно до вимог Директиви Європейської ради 24 листопада 1986 р. для

догляду та використання лабораторних тварин (86/609/ЄЕС), етичних принципів експериментів на тваринах, прийнятих Першим національним конгресом України з біоетики (2001), міжнародних угод та законодавства України у цій галузі, були схвалені етичним комітетом, а також відповідно до Директиви 2010/63/EU Європейського Парламенту [65].

2.4.2. Визначення гострої токсичності на мишах

Експериментальні дослідження гострої токсичності проведено на 48 білих безпородних самцях мишей вагою 16- 24 грам. Досліджувані речовини вводили внутрішньочеревно у вигляді водної суспензії, що стабілізується Твіном 80, обсягом не більше 1 мл. Контрольній групі тварин вводили фізрозчин та Твін 80 у тому ж обсязі, що і досліджуваним групам. Кожна група складалася з 8 тварин (підбір доз здійснювали з урахуванням віртуальних даних (Табл.1) [66]. Спостереження за тваринами проводили протягом 2-х діб після одноразового введення речовин. Протягом цього часу спостерігали за їх поведінкою, станом шкіри та слизових, реєстрували кількість загиблих тварин у кожній групі. Середньолетальні дози ($ЛД_{50}$) визначали методом Прозоровського [67].

2.4.3 Дослідження впливу синтезованих сполук на експериментальний гепатит індукований тетрахлорметаном (CCl_4)

2.4.3.1 Експериментальна схема підготовки тварин до дослідження

Для оцінки адаптивної відповіді на рівні клітин печінки у дорослих щурів-самців з метою індукування гострого гепатиту печінки тваринам вводили тетрахлорметан (CCl_4), що супроводжувалося інтоксикацією організму [68].

Чотирихлористий вуглець зазвичай використовується як модель гепатотоксичності, в якій утворюються токсичні радикали [69].

Дві схеми індукування гепатиту печінки у експериментальних групах тварин розроблені, і як наслідок, з цього формувалася схема експерименту (рис. 2.1, рис. 2.2).



Рисунок. 2.1 – Схема експериментальних введень сполук досліджуваним групам тварин, де: І–інтактна група тварин, які отримували фізіологічний розчин в об’ємі введень (мл), який відповідає об’єму введень масляному розчину CCl_4; ІІ–експериментальні тварини, які отримували 1 цикл введень CCl_4 (один раз протягом 2-х днів у дозі 0,8 мл/100 г маси тіла у вигляді 50% олійного розчину); ІІІ–експериментальні тварини, які отримували 1 цикл введень CCl_4 як і група ІІ, потім 14 днів вводили розчин Тіотріазоіну; IV–експериментальні тварини, які отримували 1 цикл введень CCl_4 як і група ІІ та ІІІ, потім 14 днів розчин динатрію 3-(2-((карбоксилатометил)тіо)-4,7-діоксо-3,4,7,8-тетрагідроптеридин-6-іл)пропаноату (DCTP) (0.6 мл/100 г маси тіла).

Для оцінки гепатопротекторної активності щури були розділені на наступні групи по 16 тварин у кожній:

– група I: інтактні тварини, яким підшкірно вводили відповідний об'єм 0,9% розчину натрію хлориду протягом 14 днів;

– для щурів груп II-IV був індукований експериментальний гепатит, введенням тетрахлорметана (CCl_4) у дозі 0,8 мл/100 г ваги у вигляді 50% олійного розчину один раз на день протягом 2 днів [68];

– група II: контрольна (патологія), тваринам вводили лише CCl_4;

– група III: щурам цієї групи на тлі CCl_4 гепатиту з 1 по 14 днів підшкірно вводили–2,5% водний розчин Тіотріазоліну в обчисленні 200 мг/кг (Arterium Україна, Серія:0006604, №: ЛСР-002170/10 від 17.03.10) один раз на день [70];

– група IV: щурам цієї групи на тлі CCl_4 гепатиту з 1 по 14 днів підшкірно вводили один раз на день водний розчин синтезованої сполуки в обчисленні 1/50 $ЛД_{50}$ [67,71].

Розчин введених речовин перераховували на масу тіла (одноразова доза не перевищувала об’єм 1 мл на тварину).

Декапітація тварин відбувалась під ефірною анестезією на 15-й день після завершення експерименту з 09:00 до 11:00.

Для отримання сироватки кров збирали у скляні пробірки без антикоагулянта. Сироватку відокремлювали від кров'яного згустку, центрифугували протягом 15–20 хвилин при 1000× *g* (центрифуга медична ОПн-3).

Надосадову рідину переносили в мікропробірки ПП 1,5 мл тип Eppendorf (виробник: Biosigma, Italy; представник: ТОВ «Старлаб», Україна) для оцінки біохімічних параметрів [72]. Дослідження біохімічних показників проводили за допомогою напівавтоматичного біохімічного аналізатора відкритого типу BioSystems BTS 330 (Барселона, Іспанія) з наборами реагентів виробництва BioSystems (Барселона, Іспанія), а тимоловий тест проводили з реагентами виробництва Lachema (Брно, Чехія).

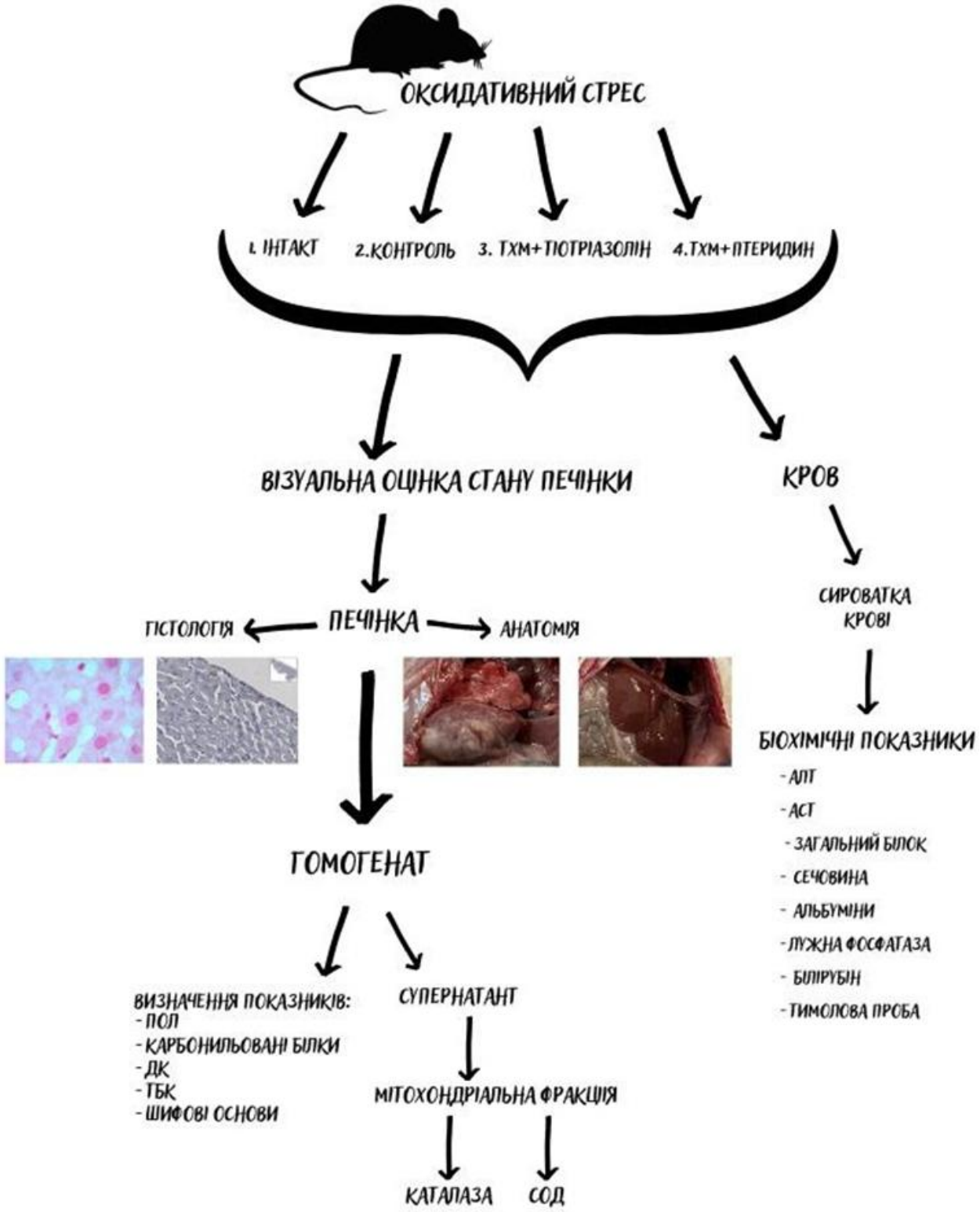


Рисунок 2.2 – Схема розподілення матеріалів та методів дослідження

Печінку негайно вилучали, частину заморожували в рідкому азоті, а частину промивали у фізіологічному розчині (NaCl) від крові та поміщали у

нейтральний формалін для подальних гістологічних та імуногістохімічних досліджень.

A  B 

Рисунок 2.3– А- інтакт, В- контрольна група (CCl_4).

Для оцінки фізико-хімічних та морфологічних характеристик організму щурів, в тому числі сироватки крові та тканин печінки визначали:

1. анатомічні та гістологічні препарати печінки щурів;

2. біохімічні показники сироватки крові, як показники функціональної активності печінки (аланінамінотрансфераза (АЛТ), аспартатаміно-трансфераза (АСТ), лужна фосфатаза (ЛФ), загальний та прямий білірубін, сечовина, тимолова проба, загальний білок, альбумін, супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатіон та карбонільовані білки);

3. продукти окислення ліпідів у гомогенаті печінки (дієнові кон'югати (ДК), малоновий діальдегід (МДА), шифові основи);

4. імуногістохімічні препарати з маркерами апоптозу, фіброзу, оксидативного стресу та ін. (Nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2), Lipocalin 2);

Після розтину черевної порожнини проводили анатомічні дослідження, а саме оцінювали ступінь ураження та фізіологічних змін печінки [73]:

1-3 бали – низький рівень ураження;

4-5 бали – високий рівень ураження.

Після декапітації тварин також відбирали зразки печінки для подальшої морфологічної оцінки тканин печінки, тканин та гомогенату печінки щурів.

2.4.4 Методика визначення масси тіла тварин

Також у роботі перевіряли можливість зміщення рівноваги в печінці в бік регенерації. Визначали динаміку маси тіла, що є інтегральним показником функціонального стану організму. У тварин протягом експеременту було помічено зміну ваги, особливо зростання ваги спостерігалося у групі контроль (II). Зміни маси печінки після введення CCl_4 були підтверджені й іншими літературними данними.

Масу тварин вимірювали на лабораторних вагах (15 кг/0.1 г) WALCOM LB150 кожного ранку перед введенням препаратів. Надалі ця маса враховувалася при розрахунках відносної маси печінки (залежність маси печінки від маси тіла на момент декапітації).

2.4.5 Виділення субклітинних фракцій печінки

Після декапітації та розтину грудної клітки та черевної порожнини, швидко виймали печінку і поміщали її в охолоджений до 4 °С 0,9% розчин хлористого натрію. На торсійних вагах визначали вагу печінки і гомогенізували з охолодженим середовищем виділення (0,25 М розчин сахарози, що містить 0,01М ТРІС і 0,001М трилона-Б (рН 7,4)) протягом 3 хвилин у скляному гомогенізаторі Поттера-Ельвегейма з тефлоновим пестиком. Відношення маси тканини до об'єму середовища виділення складало 1:10. Схема фракціонування гомогенатів печінки представлена на Рис. 2.4.

Процедури, пов'язані з фракціонуванням гомогенатів печінки, проводили в умовах стаціонарної холодильної камери (КХС-1) при 0±4оС. Чистоту отриманих субклітинних фракцій печінки оцінювали за активністю маркерних ферментів [72]. У спеціальних експериментах проводили субклітинне фракціонування гомогенатів печінки з метою отримання мітохондріальної фракції для наступного визначення в ній активностей каталази (КФ 1.11.1.6), супероксиддисмутази (СОД) (КФ 1.15.1.1) та карбонільованих білків [74–76].

Вихід білка мітохондрій при фракціонуванні печінки дорослих інтактних щурів становив (3,1±0,1) мг у розрахунку на г тканини.

Отримані субклітинні фракції печінки зберігали в замороженому стані при -20°С або рідкому азоті.

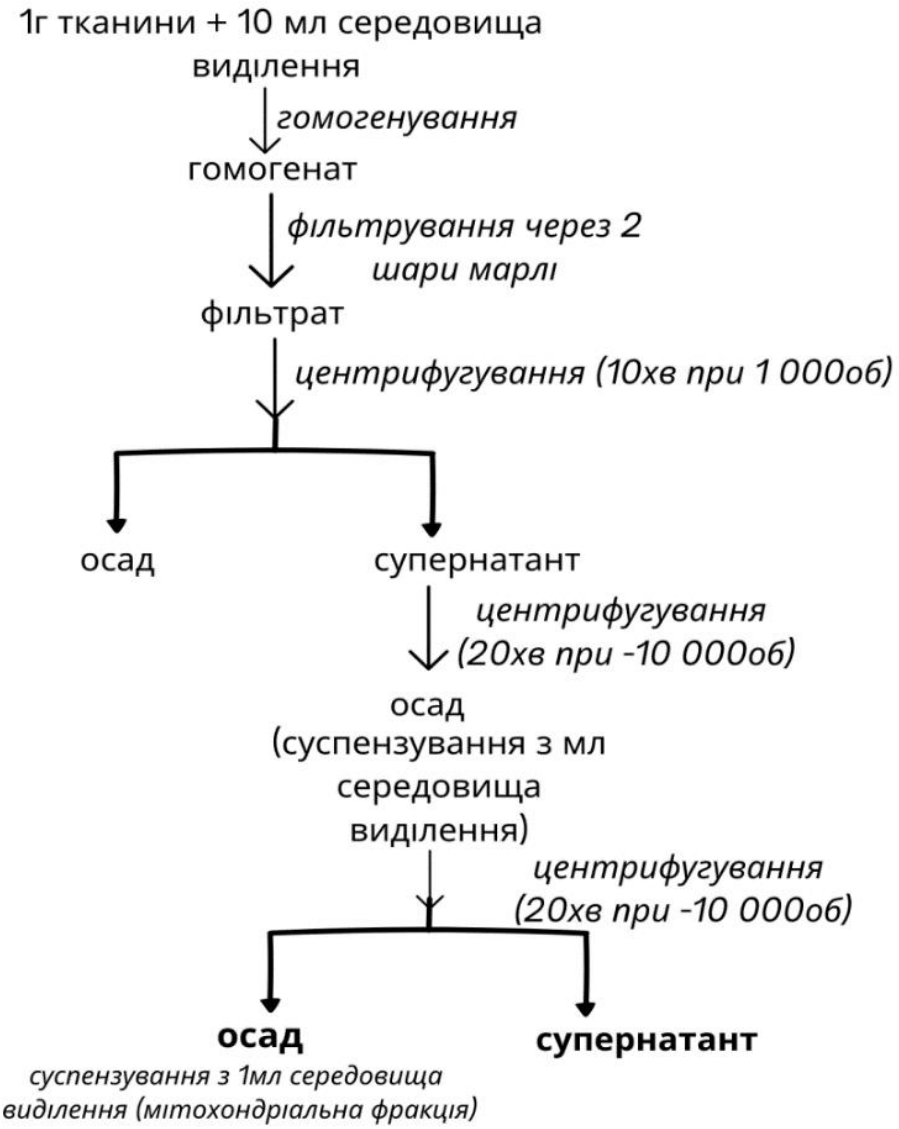


Рисунок 2.4 – Схема фракціонування гомогенату печінки

Отримані гомогенати фільтрували через 2 шари марлі та центрифугували протягом 10 хвилин при 1000 g у центрифуги ЦЛ-310b (Польща). Наднадосадкову рідину центрифугували при 10000 g протягом 20 хвилин на рефрижераторній центрифузі ЦЛР-1 (РС-6). Осад, отриманий після центрифугування проби при 10000 g, суспендували у 5 мл середовища виділення

та піддавали повторному трьохкратному осадженню при аналогічному режимі центрифугування. Очищений таким чином осад суспендували у 1 мл середовища виділення та використовували в дослідженнях як мітохондріальну фракцію печінки.

2.4.6 Вимірювання біохімічних показників у щурів з CCl_4 гепатитом печінки

2.4.6.1 Методика визначення активності аланінамінотрансферази (АЛТ), аспартатамінотрансферази (АСТ), коефіцієнт де Ріттіса, лужної фосфатази (ЛФ), сечовини, альбумінів, загального білка, прямого та загального білірубіну та тимолової проби

Оцінка пошкодження клітин печінки проводиться шляхом визначення сироваткової аспартатамінотрансферази (АСТ) та сироваткової аланінамінотрансферази (АЛТ). АСТ виявляється в печінці, серцевому м’язі, скелетних м’язах, нирках, мозку, підшлунковій залозі, легенях, лейкоцитах та еритроцитах, тоді як АЛТ міститься переважно в печінці. Ці ферменти зазвичай вивільняються в плазму з постійною швидкістю через запрограмовану загибель клітин гепатоцитів, але проникність гепатоцитів підвищується при пошкодженні клітинної мембрани печінки [77].

Таким чином, АЛТ є більш специфічним для печінкового некрозу порівняно з АСТ. АЛТ присутня тільки в цитоплазмі печінки, тоді як АСТ міститься як в цитоплазмі гепатоцитів (цАСТ), так і в мітохондріях (мАСТ), причому приблизно 80% загальної активності АСТ в печінці людини припадає на мАСТ [78].

Дослідження біохімічних показників проводили на напівавтоматичному біохімічному аналізаторі відкритого типу BTS 330 (BioSystems, Іспанія, Барселона) з наборами реагентів виробництва BioSystems (Іспанія, Барселона), тимолової проби – реагентами виробництва Lachema (Чехія).

Активність аланінамінотрансферази (АЛТ) та аспартатамінотрансферази (АСТ) визначали в сироватці крові методом УФ- кінетики (IFCC) без піридоксальфосфату. Розраховували коефіцієнт де Рітіса (відношення АСТ / АЛТ) [79].

Активність лужної фосфатази (ЛФ)–методом УФ–кінетики (IFCC) з 2- аміно-2ол-метил-1-пропаноловим буфером (АМР) [80–82].

Кількість загального та прямого білірубіну визначали методом Єндрасика та Грофа, сечовини – ферментативним методом з уреазою [81,83].

Тимолову пробу визначали за інтенсивністю помутніння внаслідок утворення глобулін-тимол-ліпідного комплексу [84,85].

Визначення концентрації альбумінів визначали методом з бромкрезоловим зеленим. Діапазон концентрацій – від 5 г/л до 60 г/л. Коефіцієнт варіації –3% [86].

Визначення концентрації загального білка визначали біуретовим методом [87].

Контроль якості перевіряли при кожному експерименті, використовуючи контрольну сироватку з набору BioSystems (Іспанія, Барселона), з відомими нормальними (рівень 1) та підвищеними (рівень 2) рівнями АСТ, АЛТ та лужної фосфатази відповідно. Чутливість методів дослідження вмісту вище зазначених біохімічних показників була оцінена за допомогою 10-кратного повторення вимірювань фізіологічного розчину в якості контрольного зразка та контрольних сироваток з відомими концентраціями в якості дослідних зразків.

Метод заснований на роботі Кармена та ін. [88]. Метод ґрунтується на тому, що аспартатамінотрансфераза (АСТ) каталізує перенесення аміногрупи від L-аспартату до α-кетоглутарату з утворенням оксалацетату та L-глутамату.

Оксалацетат піддається відновленню з одночасним окисленням NADH до NAD в індикаторній реакції, що каталізується малатдегідрогеназою (MDH). Результуюча швидкість зменшення поглинання при 340 нм прямо пропорційна активності АСТ. Лактатдегідрогеназа (ЛДГ) додається для запобігання втручанню ендогенного пірувату, який зазвичай присутній в сироватці крові. Вимірювання проводили при співвідношенні зразка сироватки крові до

реагенту 1:11.

Активність аланінамінотрансферази (АЛТ) (ЕС 2.6.1.2) у сироватці крові визначали, як описано в [88] АЛТ каталізує перехід аміногрупи від L- аланіну до α-кетоглутарату, що призводить до утворення пірувату та L- глутамату. Результуюча швидкість зниження абсорбції пропорційна активності АЛТ. Поглинання визначали при довжині хвилі 340 нм при співвідношенні зразка сироватки крові до реагенту 1:11.

Активність лужної фосфатази (ЕС 3.1.3.1) у сироватці крові визначали за методикою [89,90]. У реакції для визначення цього ферменту п- нітрофенілфосфат гідролізується до п- нітрофенолу та неорганічного фосфату. Рівень гідролізу п-НФП прямо пропорційний активності лужної фосфатази. Поглинання визначали при довжині хвилі 405 нм при співвідношенні зразка сироватки крові до реагенту 1:41.

Визначення сечовини ферментативним (уриказним/глутамат дегідрогеназним) методом. В основу методу покладено використання ферменту уреази, що гідролізує сечовину з утворенням іона амонію, який потім визначають індикатором, зміна забарвлення якого пропорційна концентрації іона амонію. Метод відрізняється високою чутливістю та специфічністю [86].

При визначеннні концентрації альбумінів використовувався бромкрезоловий зелений, який у кислому середовищі у присутності детергенту утворює з альбуміном комплекс зеленого кольору, інтенсивність забарвлення якого залежить від концентрації альбуміну в досліджуваному зразку [85].

Визначення загального білку відбувалось за біуретовим методом [87]. Білки реагують у лужному середовищі із сульфатом міді з утворенням комплексних сполук, забарвлених у фіолетовий колір. За інтенсивністю фарбування, яке пропорційне кількості білка, визначають його вміст у сироватці крові.

Визначення білірубіну [83]. Діазореактив дає з прямим білірубіном рожеве забарвлення. Інтенсивність забарвлення розчину (азобілірубін) пропорційна концентрації прямого білірубіну й може бути визначена фотоколориметрично.

Непрямий (вільний) білірубін можна перевести в розчинний стан додаванням до сироватки кофеїнового реактиву, який підвищує розчинність цього пігменту, і визначити за допомогою діазореакції. Вміст загального та прямого білірубіну визначають за графіком, помноживши результати на 2. Різниця між загальним і прямим білірубіном – це непрямий білірубін сироватки крові.

Тимолова проба. β-Глобуліни та ліпопротеїни осаджуються із сироватки крові при pH=7,55 буферним розчином з великим вмістом тимолу. Вимірюють інтенсивність помутніння, яка залежить від вмісту білкових фракцій і їх кількісного співвідношення. Розрахунок проводять за калібрувальною кривою [84].

Активність виражали в умовних одиницях. Контроль якості перевіряли при кожному експерименті, використовуючи контрольну сироватку з набору BioSystems (Іспанія, Барселона).

2.4.6.2 Методика визначення вмісту продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів та білків в гомогенаті печінки

У роботі проводилося визначення концентрації продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів (дієнових кон'югатів, ТБК+- реактивних речовин і шифових основ), а також карбонільованих білків.

Для вивчення вмісту продуктів ПОЛ, 0,5 г замороженої в рідкому азоті проби печінки гомогенізували в скляному гомогенізаторі Поттера-Ельвегейма з 5 мл суміші гептану з ізопропіловим спиртом (1:1). Пробу тримали протягом 15 хвилин при 12°С, періодично перемішуючи. Після цього до неї додавали 0,5 мл дистильованої води і проводили центрифугування при 3000 об/хв протягом 15 хвилин для розділення фаз. Верхню гептанову фазу далі використовували для досліджень.

Для визначення концентрації дієнових кон'югатів вимірювали оптичну щільність гептанової фази на спектрофотометрі ULAB 108UV при 232 нм за

методом Recknagel та Goshal [69]. Вміст дієнових кон'югатів виражали у нмоль/г тканини (сира маса).

В основу кількісного визначення вмісту шифових основ в гептан-ізопропаноловому екстракті, а також в гептановій та ізопропанольній фазі екстрактів міокарда був покладений спектрофлуориметричний метод C.A. Rice-Evans та ін. (1991) [91]. Вимірювання проводили при довжині хвилі збудження – 360 нм і довжині хвилі емісії – 430 нм на спектрофлуориметрі Hitachi MPF-4 (Японія).

Вміст ТБК реактивних речовин визначали на спектрофотометрі ULAB 108UV (Шанхай, Китай) в безбілкових (отриманих з використанням 10% трихлороцтової кислоти) екстрактах проб замороженого в рідкому азоті печінки. Розрахунок їх концентрації проводили на основі величини коефіцієнта молекулярної екстинкції першого діальдегіду при 532нм, що дорівнює 1,53*105см-1М-1. Вміст ТБК-реактивних речовин виражали в мкмоль малонового діальдегіду/г тканини. Деякі зразки печінки гомогенізували з охолодженою трихлороцтовою кислотою. Гомогенати центрифугували при 3000 об/хв протягом 10 хвилин при температурі 4^{o}C. Концентрація продуктів чутливих з 2–тіобарбіторовою кислотою (ТБК-АП) без білкових супернатантів за Мюллером [92].

Концентрацію карбонільованих білків у зразках визначали за методом Р. Л. Левіна [93] у модифікації Е. Дубініної. Цей метод базується на взаємодії карбонільованих груп та іміногруп окислених амінокислотних залишків білків з 2,4-динітрофенолгідразоном (2,4-DNPH) з утворенням 2,4- динітрофенолгідразонів, які мають специфічний спектр поглинання в ультрафіолетовій та видимій областях спектра. Рівень спонтанної окислювальної модифікації білків відображає кількість карбонільних похідних білків, присутніх у зразках (утворених *in vivo*). Для цього 0,1 мл суспензії мітохондріальної фракції змішували з рівним об'ємом 20% трихлороцтової кислоти (ТСАА). Зразки енергійно струшували, після чого до них додавали 1 мл 5% ТСАА та центрифугували при 3000 об/хв протягом 15 хвилин. Утворений супернатант

видаляли, а осад змішували з 1 мл 1 М розчину 2,4-динітрофенілгідразину, розчиненого в 2 М соляній кислоті. Зразки змішували та інкубували протягом години за кімнатної температури (20–22 °С) та центрифугували при 3000 об/хв протягом 15 хвилин. Супернатант видаляли, а осад змішували з 3 мл суміші етанол-етиловий ефір (1:1) та центрифугували при 3000 об/хв протягом 5 хвилин. Процедуру промивання осаду повторювали тричі. Промитий осад сушили за кімнатної температури. Після цього його розчиняли у 3 мл 8 М розчину сечовини. Для визначення вмісту карбонільованих білків оптичну густину отриманого розчину вимірювали спектрофотометром при 363 нм. Розрахунок концентрації виробляли з урахуванням величини коефіцієнта молекулярної екстинкції, що дорівнює 2,1*104М-1см-1 [94]. Результати представлені у нмоль на мг мітохондріального білка.

2.4.7 Визначення активності ферментів першої лінії антиоксидантного захисту

У роботі проводилося визначення активності ферментів першої лінії антиоксидантного захисту: супероксиддисмутази (КФ 1.15.1.1) і каталази (КФ 1.11.1.6) в мітохондріальній фракції гомогенатів печінки.

В основу визначення активності СОД був покладений метод В.А. Костюка (1990) [76], який ґрунтується на визначенні величини ефекту гальмування швидкості вільнорадикального окислення кверцетину молекулярним киснем під впливом супероксиддисмутази, що міститься в складі мітохондріальної фракції печінки.

Досліджена проба субклітинної фракції, що містить 0,1–0,2 мг білка, вносилася в кювету спектрофотометра з реакційною сумішшю, яка містила (кінцеві концентрації): 50 мМ карбонатного буфера (рН 10,0), 0,08 мМ натрієвої солі етілендіамінтетраацетату і 0,8 мМ тетраметилетилендіаміна.

Кінцевий об'єм реакційної суміші становив 3,0 мл. Реакція починалася введенням кверцетину в 0,1 мл диметилсульфоксиду до кінцевої концентрації

0,014 мМ. Після цього реєструвалося змінення оптичної щільності реакційної суміші протягом 5 хвилин при 406 нм на спектрофотометрі ULAB 108UV (Шанхай, Китай) при кімнатній температурі. Паралельно ставилась контрольна проба, в яку замість проби субклітинної фракції вносився еквівалентний об'єм середовища виділення. Активність ферменту виражалася в умовних одиницях (ОД) в розрахунку на мг білка проби за хвилину. За 1 ОД приймалася така активність СОД, яка відповідала 50% гальмуванню швидкості окислення кверцетину.

Гомогенат печінки отримували шляхом подрібнення тканини печінки (гомогенізації) у буфері PBS (pH = 7,4) за допомогою гомогенізатора Поттера-Ельвеєма у 10-кратному об'ємі 0,25 М сахарози. Гомогенати фільтрували через 2 шари марлі та центрифугували CL-310b (Варшава, Польща) при 1000× *g* протягом 10 хвилин. Потім супернатант центрифугували при 10 000× *g* протягом 20 хвилин. Згодом осад суспендували у 5 мл 0,25 М сахарози (pH 7,4) та двічі промивали при 10 000×g протягом 20 хвилин. Усі процедури виконували при 4 °C [75] . Осад очищених мітохондрій суспендували в 1 мл 0,25 М сахарози.

Визначення активності каталази проводилося за методом М.А. Королюк та співавт. (1988), що ґрунтується на визначенні швидкості розпаду перекису водню в середовищі інкубації в присутності дослідженого зразка мітохондріальної фракції печінки [75]. Активність каталази виражалася в мкмоль H_2O_2 / мг білка хв.

2.4.8 Визначення вмісту глутатіону і активності ферментів його метаболізму

Визначення концентрації загального глутатіону (GSH) і дисульфіду глутатіону (GSSG) вимірювали згідно з методом, раніше описаним Rahman et al. Дослідна суміш для визначення загального глутатіону містила: 20 мкл. гомогенату печінки (розведеного) 60 мкл. DFNB (2 мг/3 мл.) (5,5'- дитіобіс(2-

нітробензойна кислота), 99% (Acros Organics, Geel, Бельгія), 60 мкл GR (10 ОД/3 мл) (Glutathione reduc- тази (GR) з пекарських дріжджів (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); зниження абсорбції реєстрували спектрофотометрично концентрацію глутатіону (GSH) розраховували шляхом віднімання значень із загального глутатіону та глутатіон дисульфіду (GSSG) і виражали як nMing білків [96].

Аналіз реакції включав: 100 мкл гомогенату печінки (розведеного), змішаного з 2 мкл. 2-вінілпіридину. Зразок інкубували при перемішуванні протягом 60 хв, а потім додавали 6 мкл триетаноламіну, 60 мкл. DTNB (2 мг/3 мл), 60 мкл. GR (10 ОД/3 мл) і 60 мкл. NADPH (2 мг/3 мл). Зміни поглинання реєстрували при 412 нм. Концентрація окисленого глутатіону, виражена в білку nMing, отримана за стандартною кривою GSSG [95, 96].

Статистичний аналіз. Результати були статистично проаналізовані за допомогою тесту Тьюкі. Дані представлені як середнє значення стандартного відхилення.

2.5 Методика приготування гістологічних, імуногістохімічних препаратів та підрахунок гепатоцитів

Для гістологічного дослідження брали фрагменти печінки та фіксували їх у 10% розчині формаліну. Зразки обробляли, як описано в роботі [97]. Після дводобової фіксації шматочків печінки в 10% формаліні та промивки під проточною водою проводили зневоднення зразків за допомогою етилового спирту. Для цього зразки переносили в етиловий спирт зі зростаючою концентрацією (від 50% до 96%) і витримували по 1- 1,5 години у кожній із концентрацій. Після цього зразки переносили на 40 хв в розчини спирт-ксилол (2:1), спирт-ксилол (1:1), спирт-ксилол (1:2), потім ксилол-парафін (1:1) на 1 годину, потім в рідкий парафін (2 шт), а потім заливали на апараті HistoStar (Epredia). Готували напівтонкі зрізи на автоматичному мікротомі HM 355S (Epredia) і зразки забарвлювали гемотоксиліном - еозином та карміном по Бесту [98,99]. Мікроскопія: microscope Carl Zeiss, камера SIGETA M3CVOS 14000,

збільшення 200 [100].

Мікротомом зрізали з фіксованого матеріалу шматочки, у вигляді тонких пластинок завтовшки 2–4 мкм і площею 1–2 см переносили на предметне скло і поміщали у 3 порції етилового спирту по 15 хвилин, потім в ксилол 3 порції по 15 хв. Після цього зразки забарвлювали гематоксиліном–еозином, карміном по Бесту і мікроскопіювали.



Рисунок 2.5 – Мікротом HM 355S (Epredia), Німеччина, Білефельд

Зразки для імуногістохімічного аналізу підготовлювали схожим методом. Після депарафінізації та регідратації у градуйованих спиртах і ксилолі проводили демаскування антигенів у РТ-модулі згідно з інструкціями виробника. Після демаскування зрізи промивали в дистильованій воді (двічі по 5 хв), а потім інкубували у TRIS-буфері протягом 5 хв. Ендогенну пероксидазну активність блокували 3% розчином пероксиду водню (отриманим шляхом розведення 6% ,H_2O_2) упродовж 20 хв при кімнатній температурі. Після цього зрізи знову промивали дистильованою водою (2 × 5 хв) та інкубували у TRIS-буфері 5 хв [99].

Для зменшення неспецифічного зв’язування застосовували білковий

блокуючий розчин (5 хв), після чого зрізи промивали TRIS-буфером (5 хв). Далі на зрізи наносили первинні антитіла у відповідному розведенні та інкубували в зволоженій камері при кімнатній температурі протягом 30 хв. Після 5 хвилинного промивання у TRIS-буфері зрізи інкубували з біотинільованими вторинними антитілами (у відповідному розведенні) протягом 10 хв при кімнатній температурі.

Після чергового промивання у TRIS-буфері (5 хв) проводили інкубацію з HRP-кон'югованим полімерним детекційним реагентом упродовж 10 хв, після чого зрізи знову промивали TRIS-буфером (5 хв).

Для хромогенного виявлення застосовували DAB, використовуючи реагент DAB 0.73, розчинений у 1 мл фосфатно-буферного розчину (PBS).

Реагент наносили на зрізи та контролювали розвиток забарвлення протягом до 5 хв, зупиняючи реакцію при досягненні оптимальної інтенсивності.

Після промивання у дистильованій воді зрізи контрастували гематоксиліном Майера. Диференціювання виконували в амонійному розчині (розведення 1:25), після чого зрізи остаточно промивали дистильованою водою.

Дегідратацію здійснювали у градуйованих спиртах (95%, 95%, 100%, 100%; по 5 хв кожний), висушували на повітрі, просвітлювали у трьох змінах ксилолу та заключали в гістологічний клей з покривним скельцем [99].

Для імуногістохімічного аналізу використовували наступні маркери: Nrf2, Lipocalin-2. Імуногістохімічні дослідження виконані на базі наукового центру біотехнологій (CeBiTec) у Білефельдському університеті (м. Білефельд, Німеччина) за програмою Erasmus+ (Міжінституційна угода на навчальну мобільність студентів та викладачів в рамках програми Еразмус+ між Білефельдським університетом (Німеччина) та ЗНУ (від 03.04.2022).

Гістологічні особливості були інтерпретовані за схемою, описаною Brunt et al. [100,101].

Підрахунок кількості гепатоцитів проводився одночасно з морфологічною оцінкою препарату. Мікроскопія: microscope Carl Zeiss, камера SIGETA M3CVOS 14000, збільшення 400.

Для мінімізації статистичної похибки рахувалося по 100 клітин в трьох полях зору в кожному з трьох гістологічних препаратів печінки однієї тварини з однієї дослідної групи.

Підрахунок зерен глікогену проводився у програмі ImageJ з накладанням масок, а забарвлені ділянки імуногистохімії у програмі QuPath- 0.5.

2.6. Статистичні методи

Отримані дані були аналізовані статистично за допомогою дисперсійного аналізу ANOVA та непараметричного критерію Манна-Уітні при ненормальному розподілі при невеликій (менше 30) кількості тварин в експериментальній групі.

Використовувалося програмне забезпечення Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США), а також програма GraphPad Prism 6.01 win для обчислення показників.

Визначали середні значення та стандартні помилки вимірюваних величин. Значущі відмінності між контрольною та експериментальною групами були визнані при $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою. Також було проведенно порівняння між групою Тіотріазолін та речовина.

РОЗДІЛ 3

S-ПОХІДНІ 6-R_1-7-R_2-2-ТІОКСО-2,3-ДИГІДРОПТЕРИДИН-4(1Н)-ОНІВ ЯК ПЕРСПЕКТИВНІ ГЕПАТОПРОТЕКТОРИ НА ОСНОВІ *IN SILICO* ТА *IN VITRO* МЕТОДОЛОГІЇ ТА ВІДБОРУ НАЙБІЛЬШ АКТИВНИХ СПОЛУК ДЛЯ ПОДАЛЬШОГО ЇХ ВИВЧЕННЯ НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ МОДЕЛЯХ ПАТОЛОГІЇ ПЕЧІНКИ

Процес скринінгу потенційних фармакологічних засобів з біологічною активностю за останні роки динамічно змінювався у зв'язку з необхідністю підвищення його ефективності та здешевлення його впровадження.

Враховуючи суттєву структурну різноманітність, в тому числі, пов'язану з різною природою наявних в молекулі фармакофорних фрагментів, синтезовані в рамках представленої дисертаційної роботи сполуки *S*-заміщених птеридинів були досліджені на різні види біологічної дії. Так, були проведені наступні дослідження: методами *in silico,* так і методом *in vitro,* скринінг антирадикальної та антиоксидантної дії, прескринінг токсичності у програмі ProTox-II, SwissADME-аналіз. Дослідження різних видів біологічної активності та токсичності *in vivo*.

Вибір птеридинів як об'єктів досліджень, спрямованих на пошук нових гепатопротекторних засобів, є доцільним через їх раніше описані біологічні ефекти [101,102].

3.1 Дослідження токсичності синтезованих сполук у програмі ProTox-II

Фактор, який обмежує можливість застосування сполук з біологічною дією у якості лікарських препаратів є їх різноманітна токсичність.

В той самий час, постійно зростає значення оцінки токсичності як прескринінгового методу оскільки зазначений підхід дає можливість відсіяти потенційно небезпечні речовини.

На першому етапі дослідження ми використовували онлайн-сайт ProTox-II для прогнозування параметрів токсичності (Табл. 3.1) [104]. Індекси токсичності визначали відповідно до глобально гармонізованої системи маркування хімічних речовин (GHS). Високоактивні субстрати (GSH, SAM, F та 5-MTHF) були включені до дослідження для покращення процедури прогнозування. Встановлено, що більшість сполук належать до III- V класу токсичності при пероральному застосуванні. Слід зазначити, що для деяких отриманих сполук були передбачені гепатотоксичні властивості (2.1- 2.4, 3.1, 4.2, 4.5, 4.7- 4.11). Однак вищезазначені структури не були ідентифіковані як імунотоксини, мутагени або цитотоксичні агенти. За результатами прогнозу помічено, що GSH має мутагенну дію. Сполуки (2.1- 2.3, 3.1, 4.6, 4.7, 4.10) були виключені з експериментів на тваринах через прогнозовані канцерогенні властивості.

Важливим етапом створення нових лікарських засобів є встановлення порога токсичності та нешкідливості, обґрунтування безпечних рівнів на організм перспективних сполук. З огляду на те, що такі експериментальні дослідження досить дорогі, нині широко використовуються методи визначення токсичності *in silico* [105]. З огляду на це для попередньої оцінки параметрів безпеки перспективних з'єднань, нами було проведено прогнозування токсичності з використанням програмного забезпечення ProTox-II.

Таблиця 3.1

Прогнозування токсичності речовин у програмі ProTox-II

Сполука *	**Токсичність при пероральному прийомі**		**Прогнозована специфічна токсичність** ##				
	Клас токсичності **	LD_{50}, мг/кг #	HT	CG	IT	MG	CT

Продовження таблиці 3.1

GSH	5	5000	ні	ні	ні	так	ні
SAM	5	3320	ні	ні	ні	ні	ні
F	5	10000	ні	ні	ні	ні	ні
5-MTHF	5	5000	ні	ні	ні	ні	ні
2.1	2	19	так	так	ні	ні	так
2.2	4	1800	так	так	ні	ні	ні
2.3	4	837	так	так	ні	ні	ні
2.4	4	383	так	ні	ні	ні	ні
3.1	2	19	так	так	ні	ні	ні
3.2	3	135	ні	ні	ні	ні	ні
3.3	5	3000	ні	ні	ні	ні	ні
3.4	5	3000	ні	ні	ні	ні	ні
3.5	4	1600	ні	ні	ні	ні	ні
4.1	3	300	ні	ні	ні	ні	ні
4.2	3	1800	так	ні	ні	ні	ні
4.3	3	1000	ні	ні	ні	ні	ні
4.4	3	300	ні	ні	ні	ні	ні
4.5	3	300	так	ні	ні	ні	ні
4.6	4	1171	ні	так	ні	ні	ні
4.7	3	1880	так	так	ні	ні	ні
4.8	3	300	так	ні	ні	ні	ні
4.9	4	1000	так	ні	ні	ні	ні
4.10	4	1000	так	так	ні	ні	ні
4.11	4	1000	так	ні	ні	ні	ні
4.12	4	1000	ні	ні	ні	ні	ні

* – GSH - Глутатіон, SAM - S-аденозилметіонін, F – фолієва кислота, 5-MTHF – метилентетрагідрофолат;

** – Клас I: летальна при проковтуванні (LD50 ≤ 5); Клас II: летальна при проковтуванні (5 < LD50 ≤ 50); Клас III: токсична при проковтуванні (50 < LD50 ≤ 300); Клас IV: шкідлива при проковтуванні (300 < LD50 ≤ 2000); Клас V: може бути шкідливою при проковтуванні (2000 < LD50 ≤ 5000); Клас VI: не токсична (LD50 > 5000);

- Експериментальна токсичність (LD_{50}) Для сполук 4.4 та 4.5 являє 2830 та 1420 mg/kg відповідно;

– Звіт про модельну токсичність описує достовірність прояву токсичності порівняно із середнім показником визначеного класу. Види активності: HT – гепатотоксичність, CG – канцерогенність, IT – імуннотоксичність, MG – мутагенність та CT – цитотоксичність.

Результати розрахунків гострої токсичності з використанням зазначених сервісів показали, що *S*-заміщені птеридини відносяться до малотоксичних,

практично не токсичних та не токсичних речовин (Табл. 3.1). Дані прогнозу дозволили розрахувати безпечну дозу для експериментального визначення гострої токсичності.

3.2 Дослідження токсичності синтезованих сполук *in vivo*

Серед досліджених сполук були відсіяні потенційно небезпечні речовини та обрані сполуки-кандидати, що дозволило проводити експериментальні дослідження токсичності на лабораторних тваринах (мишах) та не суперечило біоетичним міркуванням.

Необхідно зазначити, що такі дослідження проводяться на етапі доклінічних випробувань та передбачають експерименти *in vivo*.

Самі результати експериментального дослідження гострої токсичності речовин 2.1, 3.1–3.3 підтвердили дані прогнозу (Табл. 3.2). Встановлено, що їх LD_{50} при внутрішньочеревному введенні знаходяться в інтервалах 714- 2830 мг/кг.

Таблиця 3.2

Результати прогнозованої та експериментальної гострої токсичності досліджуваних сполук

Сполука	**Молекулярна маса**	**ProTox-II (при пероральному прийомі)**		**Експериментальні дані (внутрішньочеревно)**	
		LD_{50}, мг/кг	Клас токсичності*	LD_{50} для мишей, мг/кг	Клас токсичності**
2.1	268,25	19	(II)	714±56	IV
3.1	326,28	300	(III)	2830±230	V
3.2	340,31	300	(III)	1420±110	V
3.3	368,36	1000	(IV)	1131±89	V
4.1	370,25	300	VI	6240±830	VI

Продовження таблиці 3.2

Тіотриазолін	288,29	2000	(IV)	5890*	VI

* – Клас I: летальна при проковтуванні (LD50 ≤ 5); Клас II: летальна при проковтуванні (5 < LD50 ≤ 50); Клас III: токсична при проковтуванні (50 < LD50 ≤ 300); Клас IV: шкідлива при проковтуванні (300 < LD50 ≤ 2000); Клас V: може бути шкідливою при проковтуванні (2000 < LD50 ≤ 5000); Клас VI: не токсична (LD50 > 5000);

** – Клас I: надзвичайно токсичний (LD_{50} ≤ 0,2); Клас II: висока токсичність (LD_{50} = 0,3 – 10,0); Клас III: помірна токсичність (LD_{50} =11 - 100); Клас IV: низька токсичність (LD_{50} = 101 -1000); Клас V: практично нетоксичний (LD_{50} = 1001-3000); Клас VI: відносно безпечний (LD_{50} > 3000).

Аналіз даних взаємозв'язку «структура-гостра токсичність» показав, що модифікація тіо-групи в положенн 2 птеридину (2.1) фрагментами етанової (3.1), α-пропіонової (3.2) та α-(3-метил)бутанової (3.3) кислот призводить до зниження показників гострої токсичності у 2 - 4 рази. Гостра токсичність у цьому ряду розташована так: 2.1>3.3>3.2>3.1.>4.1 Одержання водорозчинної солі кислоти 4.1 призвело до ще значного зниження LD_{50} (6240 мг/кг).

Отримані дані дозволили віднести їх до малотоксичних, практично не токсичних або нетоксичних сполук (IV–VI клас) [106]. Для подальших досліджень ми відібрали речовину 4.1, яка, як і еталонний препарат «Тіотриазолін», є нетоксичною речовиною.

3.3 SwissADME-аналіз

Критерії «лікоподбіності» важливі в процесі відкриття ліків. Вищезазначені характеристики впливають на фармакокінетику, а отже, на фармакологічну активність та ефективність досліджуваних препаратів. Невідповідні значення «подібного до ліків» спричиняють ризик низької біодоступності можливого активного фармацевтичного інгредієнта (API). Критерії «лікоподібності» двадцятиоднієї досліджуваної сполуки, представлені в таблиці 3.3.

Таблиця 3.3

Критерії «лікоподібності» досліджуваних сполук

Спол.*	MW (Da)	n-ROTB	n-HBA	n-HBD	TPSA	logP	Фільтр лікоподібності		
							Lipinski	Veber	Egan
rule	< 500	< 10	< 10	≤ 5	< 140. Å²	≤ 5	< 2	< 2	< 2
GSH	307.32	11	6	4	202.07	-3.02	0	2	1
SAM	399.45	7	8	4	212.38	-3.21	1	1	1
F	441.40	10	9	6	213.28	-0.50	2	1	1
5-MTHF	459.46	10	7	7	202.77	-0.48	1	1	1
2.1	208.24	0	4	1	110.33	0.88	0	0	0
2.2	332.38	2	4	1	110.33	2.98	0	0	0
2.3	210.21	0	5	2	130.56	0.31	0	0	0
2.4	268.25	3	7	3	167.86	0.01	0	1	1
3.1	325.30	6	8	4	196.96	-0.55	0	1	1
3.2	337.35	6	7	3	176.73	0.34	0	1	1
3.3	367.38	7	8	4	196.96	0.31	0	1	1
3.4	381.41	8	8	4	196.96	0.62	0	1	1
3.5	415.42	8	8	4	196.96	0.86	0	1	1
4.1	266.28	3	6	2	134.13	0.76	0	0	1
4.2	390.42	5	6	2	134.13	2.84	0	0	1
4.3	268.25	3	7	3	154.36	0.00	0	1	1
4.4	326.29	6	9	4	191.66	-0.32	0	1	1
4.5	340.31	6	9	4	191.66	0.00	0	1	1
4.6	375.83	5	5	2	125.93	2.45	0	0	0
4.7	389.43	5	5	2	139.92	2.35	0	0	1
4.8	325.30	6	8	4	197.45	-0.65	0	1	1
4.9	358.37	6	7	3	154.36	1.59	0	1	1
4.10	376.36	6	8	3	154.36	1.86	0	1	1
4.11	410.81	6	8	3	154.36	2.26	0	1	1

Продовження таблиці 3.3

4.12	484.31	9	8	4	183.46	1.96	0	1	1

* – MW: молекулярна маса, n-ROTB: кількість зв'язків, що обертаються, n-HBA: кількість акцепторів водневих зв'язків, n-HBD: кількість донорів водневих зв'язків, TPSA: площа топологічної полярної поверхні, * – GSH – Глутатіон; SAM – S-аденозинометіонін; F – фолієва кислота; 5-MTHF – метилентетрагідрофолат.

Результати віртуального скринінгу показали, що сполуки 2-4 відповідають правилам Ліпінського. SAM, F і 5-MTHF через критерії n-ROTB (>10) і n-HBD (>5) не відповідають правилам Ліпінського [107]. Сполуки 2-4 мають задовільні параметри прогнозованого розподілу н-октанол-вода (LogP ≤ 5). Більшість досліджених сполук не відповідають правилам Вебера та Ігана за значенням TPSA (> 140 Å²). Вищевказані критерії вказують на низьку здатність проникати через гематоенцефалічний бар'єр і гнучко взаємодіяти з макромолекулярною мішенню. Проте сполуки 2-4 мають значний n-HBA, що свідчить про можливість утворення водневих зв'язків із залишками амінокислот в активному центрі білка-мішені.

За результатами прогнозу більшість досліджуваних речовин мають BS на рівні 0,11 од. Виняток становлять сполуки 2.1 - 2.3, 4.1, 4.2, 4.6 і 4.7, для яких ця величина становить 0,55 од. (Табл. 3.4). Дивно, що низький BS також прогнозується для GSH, F і 5-MTHF. Результати показують, що сполуки будуть достатньою мірою засвоюватися при пероральному прийомі або мати помірну проникність Caco-2, щонайменше 10% біодоступність.

Таблиця 3.4

Фармакокінетичні параметри лікоподібності

Сполука*	ШІ-абсорбція	CYP1A2 інгібітор	CYP2C19 інгібітор	CYP2C9 інгібітор	CYP2D6 інгібітор	CYP3A4 інгібітор	BS*	Leadlikeness
GSH	низька	ні	ні	ні	ні	ні	0.11	ні
SAM	низька	ні	ні	ні	ні	ні	0.55	ні
F	низька	ні	ні	ні	ні	ні	0.11	ні

Продовження таблиці 3.4

5-MTHF	низька	ні	ні	ні	ні	ні	0.11	ні
2.1	висока	так	ні	ні	ні	ні	0.55	ні
2.2	висока	так	ні	так	так	так	0.55	так
2.3	висока	ні	ні	ні	ні	ні	0.55	ні
2.4	низька	ні	ні	ні	ні	ні	0.11	так
3.1	низька	ні	ні	ні	ні	ні	0.11	так
3.2	низька	ні	ні	ні	ні	ні	0.11	так
3.3	низька	ні	ні	ні	ні	ні	0.11	ні
3.4	низька	ні	ні	ні	ні	ні	0.11	ні
3.5	низька	ні	ні	ні	ні	ні	0.11	ні
4.1	висока	ні	ні	ні	ні	ні	0.56	так
4.2	низька	ні	так	так	ні	ні	0.56	ні
4.3	низька	ні	так	ні	ні	ні	0.11	так
4.4	низька	ні	ні	ні	ні	ні	0.11	так
4.5	низька	ні	ні	ні	ні	ні	0.11	так
4.6	висока	так	ні	так	ні	так	0.55	ні
4.7	низька	ні	так	так	ні	так	0.55	ні
4.8	низька	ні	ні	ні	ні	ні	0.11	так
4.9	низька	ні	ні	ні	ні	ні	0.11	ні
4.10	низька	ні	ні	ні	ні	ні	0.11	ні
4.11	низька	ні	ні	ні	ні	ні	0.11	ні
4.12	низька	ні	ні	ні	ні	так	0.11	ні

*BS: показник біодоступності (rule, F > 0,1).

3.4 Дослідження молекулярного докінгу по відношенню до активного центру CYP450 2C9

За показником спорідненості більшість досліджуваних сполук поступалися показнику ліганду порівняння (>-8,1 ккал/моль) (табл. 3.5). Кращі показники (від -8,2 до -8,9 ккал/моль) прогнозовано для феніл-, бензил- та арилзаміщених похідних – 2.2, 3.5, 4.2, 4.6, 4.7, 4.10 - 4.12. Було підраховано, що присутність карбоксильної групи у фрагменті R1/R4 (2.4, 4.1, 4.3 - 4.6, 4.8) різко знижує спорідненість.

Таблиця 3.5

Результати докінгових досліджень для лігандів 2, 3, 4 та нативного інгібітора до активного центра CYP450 2C9

Сполука*	Енергія зв'язку, ккал/моль	Взаємодія амінокислотних залишків **
CCCFMS	-8.1	a: Arg108(3), Asn204; b: Phe476, Leu362, Ala297 (2), Val113, Leu366

2.1	-6.5	a: Arg97(2), Ser365;
		b: Ile112, Val113, Cys435, Val436, Leu366(2), Cys435;
		c: Cys435 (Pi-Sulfur)

2.2	-8.6	a: Arg108; b: Leu208, Phe114, Leu208, Ile205
2.3	-6.5	a: Ser365(2), Ser429(2); b: Phe428(2), Ser429(2); Arg433, His368, Leu362, Cys435, Leu366, Cys435
2.4	-6.4	a: Arg97(3); b: Val113, Ala297, Cys435(2), Val436

3.1	-7.4	a: Arg97(2), Thr301, Ser365, Leu366(2), Gly437(2), Thr301, Gly298, Thr302, Arg433, Cys435;
		b: Ala297(2);
		c: Cys435 (Pi-Sulfur)

3.2	-7.0	a: Thr304, Ala1, Glu300; b: Asn474, Ile205, Val479, Ile205, Ala477(2); c: Glu300 (Pi-Anion)

3.3	-7.3	a: Thr304(2), Thr301, Asn474;
		b: Ile205(2), Val479, Leu208, Ala477(2);
		c: Glu300

3.4	-7.0	a: Thr304, Asn474(2), Glu300, Ser209;
		b: Ile205, Val113, Leu366, Phe114, Ala477(2), Val479;
		c: Glu300 (Pi-Anion)

3.5	-8.8	a: Arg97, Arg108(2), Arg433;
		b: Gly296, Val436, Val292, Asp293, Gly296, Ala297, Val113(2), Ala297(2), Ile112;
		c: Cys435 (Pi-Sulfur)

4.1	-7.5	a: Arg97(4), Cys435, Ser365, Val113; b: Ala297(2), Ile112, Val113(3), Leu294, Val436(3), Cys435(2), Leu366, Ala297; c: Cys435

		Продовження таблиці 3.5
4.2	-8.7	a: Arg108, Ala297, Asp293(2); b: Ala297(3), Leu366(3), Val113(3), Leu362, Cys435

4.3	-7.4	a: Arg97(3), Ser365, Leu366, Val113;
		b: Ile112(2), Val113(3), Leu294, Val436(2), Ala297;
		c: Cys435(2)

4.4	-7.6	a: Arg108, Thr301, Asp293(2), Glu300, Thr304; b: Ile205, Ala297, Ile205, Ala477
4.5	-6.9	a: Arg108, Thr301, Asp293(2), Glu300, Thr304; b: Ile205 (2), Ala297, Ala477

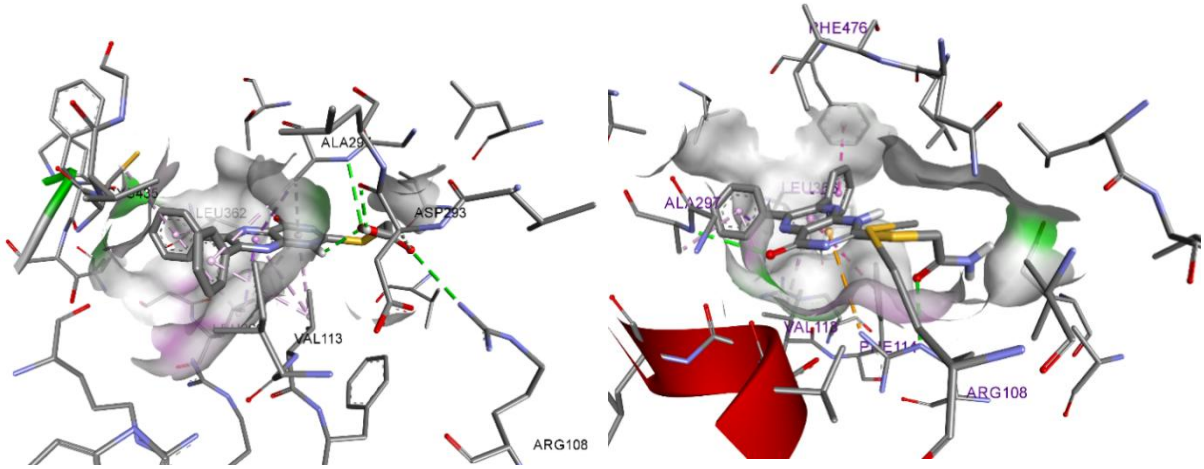
4.6	-8.7	a: Arg97(2), Ser365, Cys435, Pro427, Val113, Ser429, Cys435;
		b: Ala297(4), Ile112, Val113 (3), Leu294(2), Val436(3), Cys435;
		c: Thr301

4.7	-8.9	a: Arg108, Ala297; b: Leu366(2), Phe114, Phe476, Val113(2), Ala297; c: Arg108 (Pi-Cation)
4.8	-6.8	a: Arg108(2), Ala297, Thr304, Glu300; b: Ile205(2), Ala297
4.9	-7.9	a: Arg108(2), Asn204, Gly296; b: Phe476, Leu208
4.10	-8.2	a: Arg108, Asn204, Val292; b: Ile205, Ala477; c: Glu300 (Electrostatic)
4.11	-8.4	a: Asp293, Glu300; b: Ile205, Ala477, Leu361, Ala297, Ile205, Ala477, Val479
4.12	-8.4	a: Arg108, Gly296; b: Ile205(2), Ala477, Leu361, Ile205, Ala477; c: Glu300

***** - CCCFMS - *N*-[4-(3-chloranyl-4-cyanophenoxy)–cyclohexyl]-1,1,1-tris-(fluoranyl)methanesulfonamide;

** - a) водневий зв'язок; b) гідрофобний зв’язок; c) інші типи взаємодій; () – кількість зв'язків із залишками амінокислот.

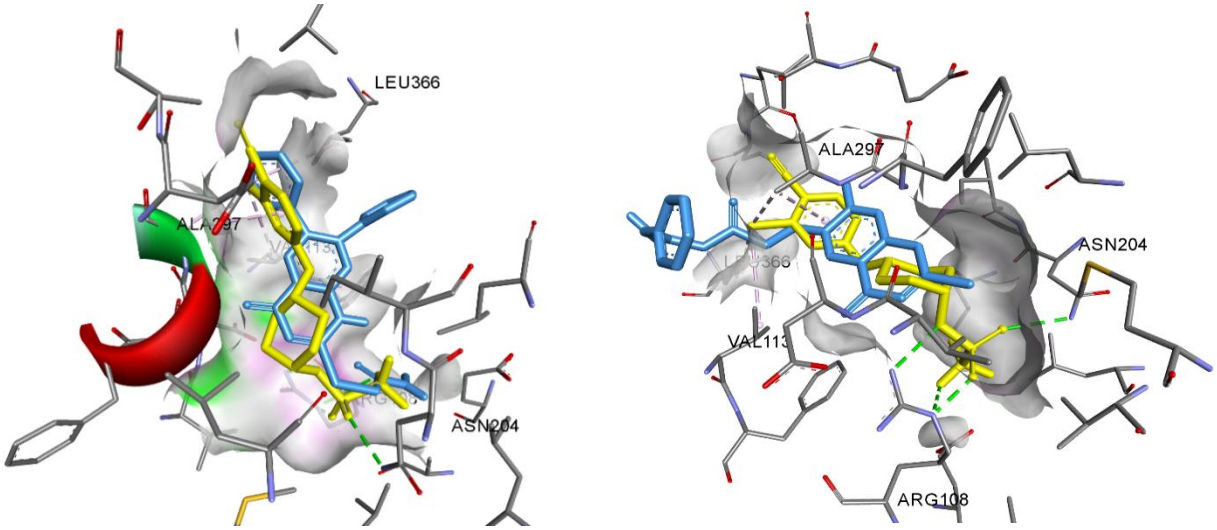
Аналіз природи взаємодії з амінокислотами активного центру показав, що сприятливе розміщення передбачено лише для лігандів 4.2, 4.7, що відповідає прогнозу SwissADME. Ці сполуки містять фенільні замісники в R_1/R_2 і $-CH_2COOH/CH_2C(O)NH_2$ в R_4 (Рис. 3.1 а, б),



a b

Рисунок 3.1 – Візуалізація взаємодії лігандів 4.2 a та 4.7 b із амінокислотними залишками активного центру ферменту CYP 2C9.

Аналіз сумісної конформації досліджуваного та нативного лігандів також підтверджує попередній висновок (Рис. 3.2 a). Ліганд 4.7 демонструє глибоке та просторово ідентичне розміщення в активному центрі відносно препарату порівняння, з фіксацією всіх фрагментів молекули амінокислотними залишками, які є істотними для спорідненості. Натомість для більшості похідних навіть із високим значенням спорідненості була передбачена неможливість глибокого занурення з фрагментарним розміщенням на поверхні ферменту (Рис. 3.2 b, див. приклад ліганду 3.5).



a b

Рисунок 3.2 – Сумісна конформація референтного ліганду (жовта молекула) та досліджуваних лігандів (сині молекули) 4.7 a та 3.5 b в активному центрі CYP 2C9.

Таким чином, згідно з результатами молекулярного докінгу, лише п’ять лігандів із групи 4, а саме сполуки 4.2, 4.7 та 4.10–4.12 (з R_4 = - CH_2ArHal) мають імовірність інгібуючої активності CYP 2C9. Таким чином, ці сполуки є менш перспективними як потенційні гепатотропні агенти і визначає перспективи вивчення всіх інших синтезованих сполук.

Більшість активних фармацевтичних речовин (АФІ), що потрапляють в організм людини, всмоктуються та метаболізуються, що супроводжується зміною їх фармакологічної активності та гідрофільності. Підвищення гідрофільності зазвичай сприяє виведенню API. Метаболізм АФІ в основному відбувається в печінці, де система цитохрому P450 оксигенази (фаза I) перетворює АФІ в гідрофільні метаболіти, які визначають фармакодинаміку препарату та сприяють їх виведенню із сечею [108,109]. Активність ферментів цитохрому P450 може бути інгібована або індукована API. Структурні модифікації API можуть призвести до непередбачуваних побічних реакцій або терапевтичних невдач. Прогнозовані ефекти сполук 2-4 на ізоферменти цитохрому P450 наведені в таблиці 3. Інгібіторна активність цитохрому P450 не була передбачена для досліджуваних сполук, за винятком 2.2, 4.2, 4.6, 4.7.

Дослідження молекулярного докінгу сполук 2-4 до активного центра CYP2C9 було проведено через прогнозовану цитохром-інгібуючу активність досліджуваних сполук.

CYP2C9 – це мембранозв'язаний гемопротеїн, який каталізує окислювальний метаболізм структурно різноманітних молекул і належить до шести клінічно важливих ізоформ, які метаболізують 90% усіх лікарських засобів. Зв'язування з цим ферментом може призвести до значного обмеження їх пероральної біодоступності [110,111]. З іншого боку, інгібування згаданого ферменту збільшує ймовірність серйозних побічних ефектів і раннього припинення розробки препарату-кандидата [107]. Енергію зв'язку лігандів 2, 3, 4 оцінювали за сайтом інгібітора CYP 2C9 – *N*-[4-(3-хлораніл-4-ціанофеноксі)циклогексил]-1,1,1-трис(флуораніл) метансульфонамід (CCCFMS). Слід зазначити, що вищевказаний фрагмент макромолекули служить місцем зв'язування інших експериментально визначених інгібіторів–флурбіпофену, *S*-варфарину, флувастатину, флувоксаміну, зафірлукасту, протигрибкових імідазольних сполук (міконазолу, флуконазолу) та інших [108,109]. За показником спорідненості більшість досліджуваних сполук поступалися показнику ліганду порівняння (>-8,1 ккал/моль) (Табл. 3.4). Кращі показники (від -8,2 до -8,9 ккал/моль) прогнозовано для феніл-, бензил- та арилзаміщених похідних – 2,2, 3,5, 4,2, 4,6, 4,7, 4,10 - 4,12. Було підраховано, що присутність карбоксильної групи у фрагменті R1/R4 (2,4, 4,1, 4,3 - 4,6, 4,8) різко знижує спорідненість. Отримані дані не узгоджуються з опублікованими результатами щодо кращого зв'язування гідрофобних молекул, що містять кислотні групи, із SYP2C9 [111] та впливу ступеня іонізації молекули на можливість зв'язування із ключовими амінокислотними залишками–полярним аргініном та аспарагіном (Arg108, Asn204) [111].

3.5 Антиоксидантна та антирадикальна активність

Антиоксидантну активність отриманих сполук досліджено *in vitro* на режимах перекисного окиснення лінолевої кислоти. Вибір моделі обумовлений важливістю активності поглинання радикалів або інгібування утворення радикалів для розвитку гепатопротекторної активності. Було підраховано, що тіовмісні птеридини інгібують перекисне окислення лінолевої кислоти. Показано, що рівень інгібіторної активності визначається ліпофільністю досліджуваних сполук.

Так, 6,7-диметил-2-меркапто-2,3-птеридин-4(1*H*)-они (2.1) з logP = 0,88 виявляють АОА на рівні 9,5%. Заміна метильної групи на більш ліпофільні фенільні фрагменти (2,2, logP = 2,98) знижує активність до 5,26%. Структурна модифікація молекули шляхом введення гідрокси- (2.3) або етилкарбокси- (2.4) груп до птеридинового циклу підвищує гідрофільність (logP = 0,31 (2,3); 0,01 (2,4)) і, як наслідок, покращує рівень антиоксидантної активності (18,18% і 25,12% відповідно).

Перетворення сполуки 2.4 в аміди з фрагментами аліфатичних амінокислот (3.1-3.5) призводить до значного підвищення АОА (Табл. 3.5). Спостерігається також пряма кореляція гідрофільності та антиоксидантної активності. Висока гідрофільність (logP = -0,55 (3,1); 0,34 (3,2); 0,31 (3,3); 0,62 (3,4); 0,86 (3,5)) забезпечує високу антиоксидантну активність. Так, серед (4-іл)пропаноіл)амінокарбонових кислот (3.1-3.5) АОА спадає в такій послідовності: H (3.1)>Me (3.2)>*i*-Pr (3.3)>*s*-Bu (3.4)>Bn (3.5). Такі ж закономірності спостерігалися для сполук 4.1-4.12 (Табл. 3.6). Зокрема, 6,7- диметил-4-оксо-3,4-дигідроптеридин-2-іл)тіо)оцтова кислота (4,1, logP =0,76) і 6,7-дифеніл-4-оксо-3,4-дигідроптеридин-2-іл)тіо)оцтова кислота (4,2, logP = 2,84) виявляє антиоксидантну активність на рівні 49,04% і 14,5% відповідно). Заміна метильної групи в 7 положенні (4.1) на гідроксильну групу (4.2) призводить до високої гідрофільності (LgP = 0,00) і здатності інгібувати перекисне окислення лінолевої кислоти (АОА = 34,7%). Внаслідок заміни

метильної групи (4.3) у 6-му положенні виходу карбоксиетильної групи (4.4) спостерігалося підвищення гідрофільності (LogP = -0,32) та підвищення АОА (АОА= 52,4%). Подальша структурна модифікація сполуки 4.4 шляхом заміни 2-карбоксиметильного замісника на бензилтіо- (4.9) або заміщені бензилтіогрупи (4.10–4.12) призводить до підвищення прогнозованої ліпофільності (logP = 1,59 (4,9); 1,86 (4,10); 2,26 (4,11); Функціонізація вищезазначеного фрагмента (4.4) до аміду (4.8) або заміна його фрагментом α-пропіонової кислоти (4.5) несуттєво змінює ліпофільність та антиоксидантну активність (табл. 6). Слід зазначити, що наявність однієї або кількох протонообмінних функціональних груп (2,4, 3,1–3,4, 4,1–4,5, 4,7- 4,9) обумовлює високу здатність інгібувати перекисне окислення лінолевої кислоти.

Таблиця 3.6

Антиоксидантна активність *S*-заміщених 6-R_1-7-R_2-2-тіоксо-2,3-дигідроптеридин-4(1H)-онів під час заміни радикалів

Сполука*	R_1	R_2	R_3	R_4	Антиоксидантна активність, %
2.1	Me	Me	–	–	9.47
2.2	Ph	Ph	–	–	5.26
2.3	Me	OH	–	–	18.18
2.4	– $(CH_2)_2COOH$	OH	–	–	25.12
3.1	–	–	H	–	12.20
3.2	–	–	Me	–	36.84
3.3	–	–	*i*-Pr	–	38.68
3.4	–	–	*s*-Bu	–	25.00
3.5	–	–	Bn	–	7.89
4.1	Me	OH	–	$-CH_2COOH$	49.04

Продовження таблиці 3.6

4.2	Ph	Ph	–	-CH_2COOH	14.54
4.3	Me	Me	–	-CH_2COOH	34.69
4.4	– $(CH_2)_2COOH$	OH	–	-CH_2COOH	52.39
4.5	– $(CH_2)_2COOH$	OH	–	-$CH(Me)COOH$	50.00
4.6	Me	Me	–	-$CH_2C(O)NHC_6H_4Cl$-3	1.05
4.7	Ph	Ph	–	-$CH_2C(O)NH_2$	31.82
4.8	– $(CH_2)_2COOH$	OH	–	-$CH_2C(O)NH_2$	41.84
4.9	– $(CH_2)_2COOH$	OH	–	Bn	43.54
4.10	– $(CH_2)_2COOH$	OH	–	-$CH_2C_6H_4F$-2	25.12
4.11	– $(CH_2)_2COOH$	OH	–	-$CH_2C_6H_4Cl$-6-F-2	24.47
4.12	– $(CH_2)_2COOH$	OH	–	-$CH_2C_6H_4Cl_2$-2,6	11.05
Trolox*	–	–	–	–	93.61

*– 6-гідрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбонова кислота

Узагальнення результатів досліджень *in silico* та *in vitro* дозволяє стверджувати, що з 20 досліджених сполук 8 (3.1–3.5, 4.3, 4.4, 4.12) зберігають задовільні токсикометричні характеристики, 9 сполук (2.2, 2,4, 3.1, 3.2, 4.1, 4.3–4.5, 4.8) відповідають критеріям «подібних до ліків», 10 сполук (3.1–3.4, 4.1–4.5, 4.7–4.9) мають високу інгібіторну активність пероксидного окислення лінолевої кислоти. Крім того, всі досліджувані сполуки, крім 4.7, мають низьку

спорідненість до ферменту CYP2C9, що зменшує можливість непередбачуваних або побічних ефектів і зниження біодоступності при пероральному застосуванні. Перераховані вище сполуки є найбільш перспективними для досліджень *in vivo* на моделі експериментального токсичного ураження печінки. Враховуючи наведені вище факти, сполуки 3.1. 3.2, 4.1, 4.3 і 4.5. були відібрані для подальших досліджень.

3.5.1 Антирадикальна активність

Ключова роль птеридинів в окисно-відновних процесах живих організмів спонукала нас до вивчення антирадикальної активності синтезованих тіомістких птеридинів [52]. Добре відомо, що їх активність пов'язана з дигідро- та тетрагідро-рівнями, що підтверджено коферментною активністю тетрагідроптеридину в біохімічному гідроксилюванні та процесах мітохондріального транспорту електронів [112]. Крім того, похідні птеридину в залежності від стану насичення циклу та умов експерименту можуть бути як донорами, так і акцепторами вільних радикалів і виявляти анти- та прооксидантну активність [101,112]. Встановлено, що тіовмісні птеридини виявляють помірну антирадикальну активність (Табл. 3.7). Слід звернути увагу на сполуки 3.9 ($\lg EC_{50} = -4{,}78$), 5.1 ($\lg EC_{50} = -4{,}82$) і 5.3 ($\lg EC_{50} = -4{,}92$).

Таблиця 3.7

Результати антирадикальної активності синтезованих сполук

Сполука	Антирадикальна активність, (%)					
	10^{-3} М	10^{-4} М	5×10^{-5} М	10^{-5} М	10^{-6} М	$\lg EC_{50}$
2.1	76.54	79.13	48.67	26.11	10.05	−4.13
2.2	89.83	74.31	55.34	24.66	14.14	−4.39
2.3	13.24	9.49	7.42	6.12	5.02	>−3.00
2.4	10.12	10.46	4.29	7.72	5.66	>−3.00

Продовження таблиці 3.7

3.1	19.06	0	0	0	0	>−3.00
3.2	26.18	0	0	0	0	>−3.00
3.3	19.09	17.56	13.04	11.03	0	>−3.00
3.4	5.24	0	0	0	0	>−3.00
3.5	49.48	21.89	20.17	12.24	11.03	>−3.00
3.6	32.24	10.86	10.17	9.14	8.79	>−3.00
3.7	28.79	11.03	9.31	7.76	7.24	>−3.00
3.8	11.49	7.38	6.69	7.03	4.63	>−3.00
3.9	72.04	54.55	52.66	31.90	6.86	−4.78
3.10	16.13	10.00	9.52	4.84	4.03	>−3.00
4.1	24.08	0	0	0	0	>−3.00
4.2	13.21	8.75	6.17	9.09	4.80	>−3.00
4.3	21.23	9.44	7.13	6.22	3.00	>−3.00
4.4	46.15	24.05	19.08	18.02	11.04	>−3.00
4.5	49.66	15.86	12.59	9.66	7.76	>−3.00
5.1	99.31	95.71	67.24	9.09	2.92	−4.53
5.2	95.81	93.98	91.79	23.73	0	−4.82
5.3	98.28	94.17	93.31	38.25	5.32	−4.92
5.4	42.75	20.00	16.13	15.65	15.02	>−3.00
5.5	26.13	18.23	16.61	15.97	15.81	>−3.00
Аскорбінова кислота	95.88	87.65	81.82	30.87	2.06	−4.81

Встановлено, що продукти конденсації 5,6-діаміно-2-тіоксо-2,3-дигідропіримідин-4(1*H*)-ону з дикарбонільними сполуками є ефективним підходом для синтезу тіовмісних птеридинів як вихідних сполук для подальшої модифікації, спрямованої на пошук перспективних біологічно активних сполук. Прогнозована спорідненість деяких синтезованих сполук порівнянна зі спорідненістю контрольної сполуки метотрексату. Незважаючи на це, відмінності в ліганді мають характер взаємодії ферментів. Отримані сполуки виявили низьку або помірну DHFR-інгібуючу активність. Сполуки 2.2, 3.7, 3.9, 4.2 були найбільш активними в концентрації

100 мкМ. Ферментінгібуюча активність отриманих сполук залежить як від структури замісників у 6-му та 7-му положеннях, так і від природи замісників у атома сірки. Сполуки 3.9, 5.1 і 5.3 виявили високу антирадикальну активність, яка, очевидно, пов'язана з наявністю обмінних протонів і можливістю таутомерних перетворень. Отримані птеридини не представляють інтересу для створення нових хіміопрепаратів, але можуть бути досліджені на предмет активності, пов'язаної з впливом на окисно-відновні процеси в організмах.

Дослідження антирадикальної активності *in vitro* ґрунтувалося на взаємодії синтезованих сполук з 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразилом (DPPH) [113]. DPPH є стабільним вільним радикалом і його спиртові розчини забарвлені в інтенсивний фіолетовий колір (λmax = 517 нм). DPPH взаємодіяв із сполуками, які здатні зв’язуватися з вільнимирадикалами, утворюючи продукти жовтого кольору та не поглинають світло на вказаних вище довжинах хвиль.

Птеридини та споріднені гетероциклічні системи інтенсивно вивчаються в рамках розробки нових лікарських засобів [113,114]. Найбільше птеридинів, які використовуються в медичній практиці, це інгібітори дигідрофолатредуктази, тимідилатсинтази, блокатори α-фолатних рецепторів з протипухлинною, протимікробною та іншими властивостями. Незважаючи на доведену клінічну ефективність і механізм дії птеридинів, а також наявність вичерпної інформації про структуру біологічних мішеней класичних антифолатів (метотрексату), активно ведеться пошук нових біологічно активних речовин серед зазначених похідних. Розробка та пошук біологічно активних птеридинів ведеться за такими напрямками: модифікація п-амінобензоїл-1-глутаматного фрагмента в 6-му положенні фолієвої кислоти шляхом алкілування аміногрупи або її заміни на метиленовий фрагмент, функціоналізація птеридинового циклу, біоізостерична заміна птеридинового кільця на інший гетероцикл, структурна модифікація птеридинової системи, модифікація антифолатів шляхом введення додаткових фармакофорних фрагментів (гібридно-фармакофорний підхід), пошук біологічно активних птеридинів з альтернативними біологічними мішенями та типом біологічної активності.

Водночас тіовмісні птеридини та їх конденсовані похідні як перспективні біоактивні сполуки вивчені недостатньо. 2-Заміщені меркаптоптеридин-4-оли в поєднанні з різними гетероциклами (піролідин, оксазол, бензімідазол, піримідин, хінолін) через алкільний «лінкер» з активністю інгібування росту проти ракових клітинних ліній MCF7, NCI- H460 і SF-268 до 47% [115] та заміщені 8-R_1-4-R_2-2-(пропілтіо)-5,8-дигідроптеридин-6,7-діони з інгібіторною активністю проти MGC-803, SGC- 7901, A549 та ракової клітини PC-3 лінії (IC_{50} 4,32–>100 M) [115–117] слід відзначити серед відомих біоактивних тіовмісних птеридинів. Подібним чином ряд заміщених тіазоло[4,5-*d*]птеридинів і тіазоло[4,5-*d*]піримідинів були синтезовані *Walters et al.* шляхом конденсації 2-((2,3-дифторбензил)тіо)-6-R-піримідин-4,5-діамінів з моно- та динуклеофілами [118]. Показано, що отримані сполуки є високоактивними антагоністами CXCR2.

Guiney D. та співавтори описали підходи до синтезу поліфункціональних 6-заміщених 2-метил-(бензил-)тіоптеридинів модифікованою реакцією Віттіга з використанням 2-(метил-(бензил-)тіо)-4-оксо-3,4-дигідроптеридин-6-карбальдегіди як вихідні сполуки [119]. Ряд багатообіцяючих протизапальних засобів був описаний *Ghoneim ma ін.* [120]. Автори описали синтез тіоксобензо[*g*]птеридинів і вивчили його взаємодію з активним центром циклооксигенази типу-2 (COX-2).

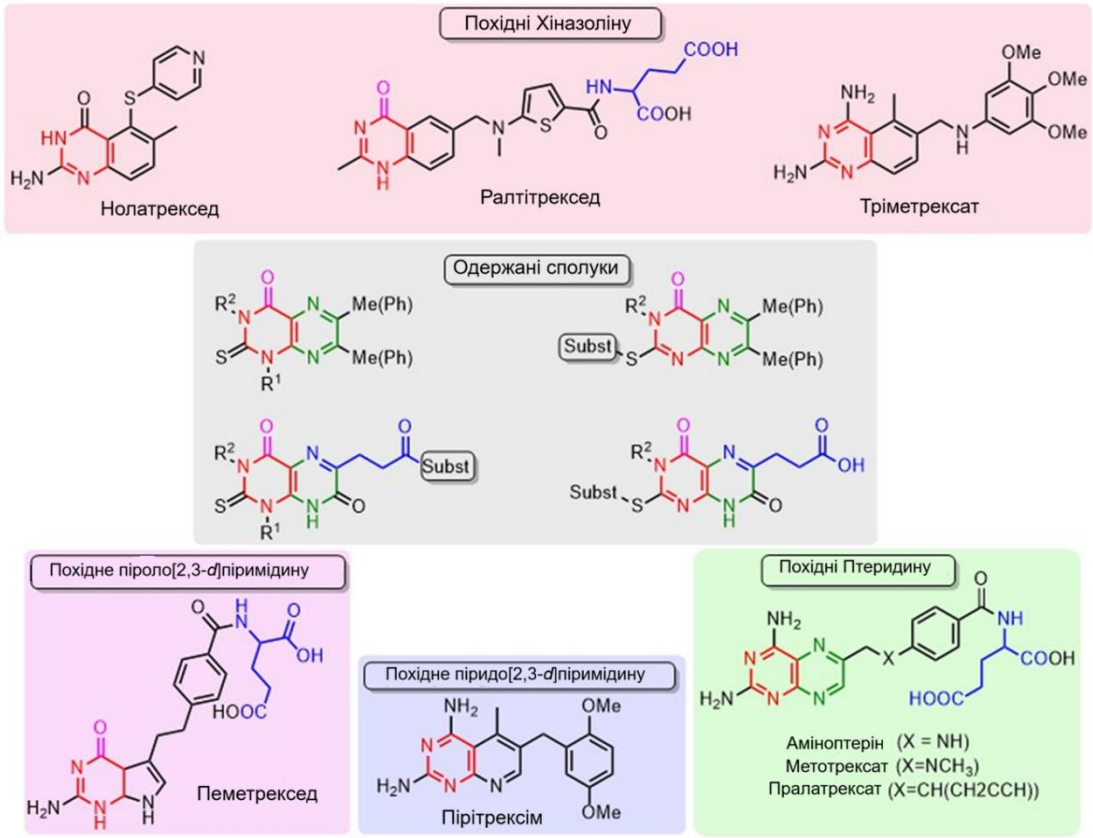


Рисунок 3.3 – Раніше описані інгібітори дигідрофолатредуктази та розроблені на основі нових тіовмісні птеридини

Дизайн потенційних біоактивних птеридинів включає модифікацію вихідної сполуки 2 шляхом введення замісників у 7-е та 8-е положення (зміна ліпофільності), модифікацію тіоксогрупи шляхом введення різних фармакофорів, модифікацію карбоксиалкільного фрагмента шляхом його перетворення на амід фрагмент для посилення DHFR-інгібуючої активності.

Заміщені 5,6-діаміно-2-тіоксо-2,3-дигідропіримідин-4(1*H*)-они (1) використовували як вихідні сполуки для синтезу розроблених потенційних біоактивних агентів. Вищезазначені вихідні сполуки були отримані за відомими методами [120,121]. Синтез заміщених 2-тіоксо-2,3-дигідроптеридин-4(1*H*)-онів (2) проводили шляхом конденсації заміщених 5,6-діаміно-2-тіоксо-2,3-дигідропіримідин-4(1*H*)-онів (1) з карбонільними сполуками або кетокарбоновими кислотами (Рис 3.3) [122–124].

Утворення тіо-вмісних птеридинів доведено наявністю сигналів протонів при азоті в положеннях N1 і N3, які спостерігалися при 13,31–12,24 м.ч. і 12,7–

10,87 м.ч. відповідно. Крім того, спектри ЯМР ^{1}H сполук 2.3–2.5 характеризуються сигналами протонів гідроксигруп у 7-му положенні при 13,72–13,33 м.ч., а сполук 2.4, 2.5–сигналами протонів карбоксильних груп при 11,94–11,79 м.ч. У високому полі спектрів ЯМР ^{1}H сполук 2.4, 2.5 зареєстрована АВ-система, яка складається з двох триплетів при 3,17–3,05 м.ч. і 2,78–2,73 м.ч. [125].

Наступний етап хімічної модифікації полягає в алкілуванні сполуки 2алкілгалогенідами або тіоксогрупою карбонової кислоти, що містить галоген, у 2-му положенні. Вищезазначену реакцію проводили згідно зі стандартною процедурою [126] і проходив згідно з теорією HSAB за тіоксогрупою у 2-му положенні. Спектри ЯМР ^{1}H сполуки 3 характеризуються наявністю сигналів замісників при атомі сірки, а саме трипротонний синглет при 2,56 м.ч. метильної групи (сполука 3.1), двопротонний синглет при 4,01–4,87 м.ч. метиленового фрагмента та набір сигналів, які відповідають бензольному або заміщеному бензольному фрагменту (сполуки 3.2–3.10). У спектрах ЯМР ^{1}H сполук 4.1–4.4 спостерігався комплекс сигналів, зумовлених наявністю карбоксиалкільного фрагмента, що підтверджує їх структуру. Будова синтезованих сполук додатково підтверджена даними ^{13}C ЯМ Р[127].

Висновок до розділу 3

Комплексне застосування методів *in silico, in vitro* та експериментального визначення гострої токсичності дозволило провести послідовний скринінг *S*-заміщених 6-R^{1}-7-R^{2}-2-тіоксо-2,3-дигідроптеридин-4(1H)-онів та визначити найбільш перспективні сполуки для подальшого дослідження на експериментальних моделях патології печінки.

1. За результатами прогнозування у програмі ProTox-II та експериментального визначення гострої токсичності встановлено, що модифікація тіогрупи птеридинового фрагмента залишками алканкарбонових кислот сприяє зниженню токсичності досліджуваних сполук у 2–4 рази. Одержання водорозчинної солі сполуки 4.1 спричинило подальше зниження

гострої токсичності; показник LD_{50} при внутрішньочеревному введенні становив 6240±830 мг/кг, що дозволило віднести її до VI класу токсичності. Досліджені сполуки за експериментальними показниками гострої токсичності були віднесені до IV–VI класів – малотоксичних, практично нетоксичних або нетоксичних речовин.

2. За результатами SwissADME-аналізу встановлено, що досліджені S-заміщені птеридини характеризуються переважно задовільними параметрами «лікоподібності», а сполука 4.1 відповідає правилам Ліпінського, характеризується прогнозованою високою абсорбцією та відсутністю прогнозованого інгібуючого впливу на основні ізоформи цитохрому Р450, включаючи CYP2C9.

3. Дослідження *in vitro* підтвердили антиоксидантний потенціал S- заміщених птеридинів. За сукупністю токсикологічних, фармакокінетичних, докінгових та антиоксидантних характеристик для подальших експериментальних досліджень відібрано сполуки 3.1, 3.2, 4.1, 4.3 та 4.5. Серед них сполука 4.1 – Тіоптерин (DCTP) – характеризувалася найбільш сприятливим поєднанням низької токсичності, відповідності критеріям «drug-like», відсутності прогнозованого інгібуючого впливу на CYP2C9 та високої антиоксидантної активності, що обґрунтовує її вибір як сполуки-лідера для подальшого дослідження *in vivo*.

Результати дослідження, що обговорені у розділі 3, були опубліковані в наступних наукових працях та конференціях:

1. Maxim Kazunin; Natalia Groma; Inna Nosulenko; Anna Kinichenko; Oleksii Antypenko; Volodymyr Shvets; Oleksii Voskoboinik; Serhii Kovalenko. Thio-containing pteridines: synthesis, modification and biological activity. Archiv der Pharmazie. 202. Vol.355, Issue12. https://doi.org/10.1002/ardp.202200252

2. Lohvinenko N., Shvets V., Berest G., Nosulenko I., Voskoboinik O., Severina H., Okovytyy S., Kovalenko S. Prospects for the use of sulfur-containing

pteridines in toxic liver damage. Regulatory Mechanisms in Biosystems. 2024. 15(2)., P.374-381. https://doi.org/10.15421/022453

3. Groma N. V., Nosulenko I. S., Berest G. G., Shvets V. M., Kovalenko S. I. Use of *in vitro* methodology and search of antioxidants among *S*-pteridin derivatives. IX науково-практична конференція з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів»; 22 вересня 2022 року; Тернопіль; 2022. С 22–23.

4. N.V. Lohvinenko, V.M. Shvets, I.V. Dobrodub. Virtual screening of biologically active substances among *S*-containing derivatives of pteridine. Конференція з міжнародною участю “Youth Science–2024. 17 травня 2024. Вінниця; 2024. С. 7–8

5. Lohvinenko N., Kovalenko S., Shvets V. ДОСЛІДЖЕННЯ *S*-ЗАМІЩЕНИХ 6-R_1-7-R_2-2-ТІОКСО-2,3-ДИГІДРО-ПТЕРИДИН-4(1Н)-ОНІВ МЕТОДАМИ *in silico, in vitro* ТА ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ ДЛЯ ОЦІНКИ ПОДАЛЬШОГО ЗАСТОСУВАННЯ ПРИ експериментальних моделях патології печінки. The 7th International Scientific Conference “Current problems of biochemistry, cell biology and physiology”. 3–4 жовтня 2025; Дніпро; 2025. С. 58–60.

6. Логвіненко Н. В., Швець В. М., Берест Г. Г., Носуленко І. С., Воскобойнік О. Ю., Коваленко С.І «Drug-design» птеридинів на основі «Фолатного циклу» як стратегія пошуку нових гепатопротекторів. І Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю “Міждисциплінарні підходи до створення ліків” . 14–15 квітня 2026. Одеса; 2026. С. 114–117

РОЗДІЛ 4
ЗАСТОСУВАННЯ *S*-ЗАМІЩЕНОГО ПТЕРИДИНУ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ГОСТРОГО ГЕПАТИТУ, ВИКЛИКАНОГО CCl_4, У ЩУРІВ

4.1 Динаміка росту тварин з гострим гепатитом печінки індукованим CCl_4

Як відомо, розвиток токсичного гепатиту печінки, що проявляється «заміною» гепатоцитів сполучною тканиною після дії на них гепатотоксичними факторами, пояснюється активацією передусім зірчастих клітин печінки, а в процесі фіброгенезу беруть участь портальні фібробласти та міофібробласти кісткового мозку.

Важливо відзначити, що після введення токсичної сполуки CCl_4, експериментальні тварини порізному переносили такий вплив. Частина тварин гинула, а більша частина виживала. Введення токсчної сполуки CCl_4, а ткож корекція станів токсичного гепатину впливала також і на масу тварин (Табл 4.1).

Таблиця 4.1

Результати вимірювання маси тварин під впливом CCl_4 гепатиту протягом 14 днів експерименту

День експерименту	Група 1 (інтакт)	Група 2 (CCl_4)	Група 3 (ТТЗ + CCl_4)	Група 4 (DCTP + CCl_4)
1	200,0 ± 8,82	205,0 ± 3,43	205,0 ± 3,45	202,0 ± 3,42
2	201,0 ± 7,86	206,0 ± 3,39	206,0 ± 3,42	205,0 ± 3,42
3	201,0 ± 3,11	198,0 ± 3,29	202,0 ± 3,42	205,0 ± 3,37
4	202,0 ± 2,90	205,0 ± 2,71	203,0 ± 3,46	206,0 ± 3,42
5	203,0 ± 2,50	210,0 ± 3,20	208,0 ± 3,42	205,0 ± 3,42
6	204,0 ± 2,93	211,0 ± 3,20	208,4 ± 3,47	206,0 ± 3,42
7	204,0 ± 3,34	212,0 ± 3,20	210,1 ± 3,63	207,0 ± 3,42
8	205,0 ± 2,50	219,0 ± 3,20	210,0 ± 3,33	207,0 ± 3,42

Продовження таблиці 4.1

9	206,0 ± 2,50	215,0 ± 3,30	211,0 ± 3,33	208,0 ± 3,42
10	206,0 ± 2,50	220,0 ± 3,23	212,0 ± 3,33	207,0 ± 3,42
11	207,0 ± 2,50	226,7 ± 6,15	213,0 ± 3,33	209,1 ± 3,42
12	208,0 ± 2,49	227,4 ± 3,95	215,0 ± 3,34	210,0 ± 3,42
13	208,0 ± 2,49	230,0 ± 4,33	218,0 ± 3,25	211,0 ± 3,42
14	209,0 ± 2,49	232,0 ± 4,33	222,0 ± 3,38	211,0 ± 3,42

Як відомо, характеристика зміни маси тіла тварин (динаміка росту) є інтегральним показником функціонального стану організму, яка відображає спрямованість та інтенсивність метаболізму. Очікується, що формування хронічних патологій, зокрема й фіброзу печінки, може супроводжуватися зміною динаміки росту маси тіла у молодих тварин, що інтенсивно зростають.

Маса тіла в інтактній групі тварин за час експерименту (14 днів) збільшилася на 3–5 % від вихідної (Рис. 4.1, крива 1), що відповідає прийнятому стандарту для щурів.

Втрата ваги може супроводжуватися вираженою анорексією [128], анорексія є лише частиною процесу виснаження, оскільки як у щурів, так і у людини втрата як м’язової, так і жирової тканини часто передує зменшенню споживання їжі. Втрата маси тіла може бути реакцією на відсутність стимулу ліполіза в ізольованих адипоцитах щурів [129] та у відсутності регуляції короткочасного метаболізму в гепатоцитах.

Нормальне збільшення маси тіла щурів, які отримували речовину Тіоптерин при гострому гепатиті та щури з інтактної групи, свідчить про переважну безпеку цієї речовини [130].

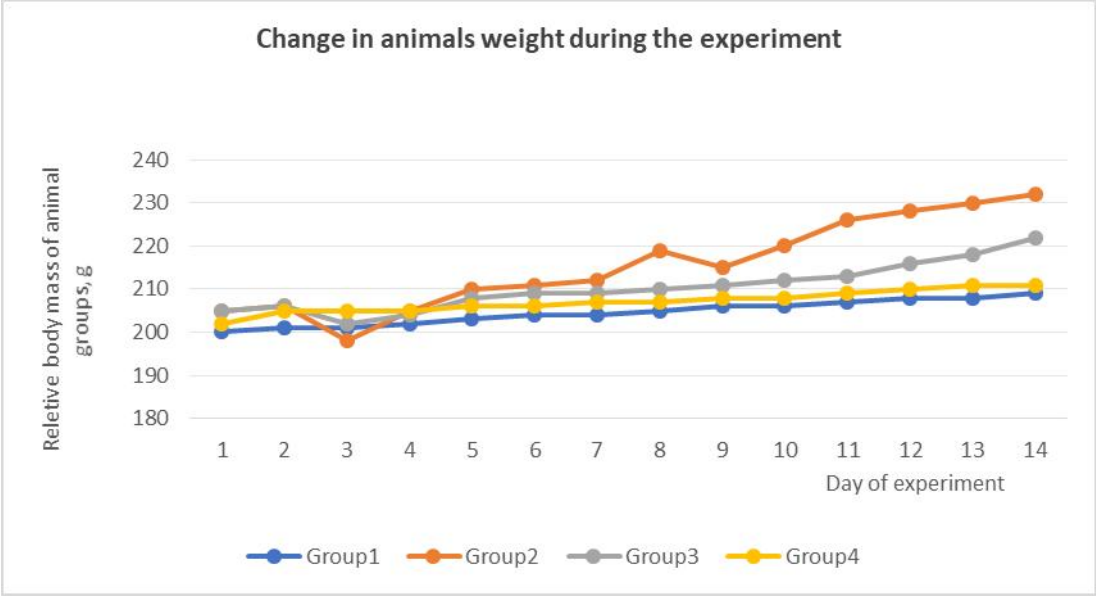


Рисунок 4.1 – Зміна маси тварин протягом експерименту

Група 1– (інтакт); група 2 – (CCl_4); група 3 – (CCl_4+ТТЗ); група 4- (CCl_4+DCTP)

Найбільше зростання ваги спостерігалося у групі контроль (Рис. 4.1, крива 2). Змінена вага спостерігалася у всіх групах у перші дні після введення ТХМ, а через 5–6 днів маса почала відновлюватися. Зростання ваги у групі контроль (II) спостерігалося через утворення спайок між частинками печінки, утворення капсули навколо печінки, а також загального збільшення маси печінки на 30%.

Важливу роль у регуляції процесів росту та ремоделювання сполучної тканини відіграє фактор росту сполучної тканини (CTGF) – секреторний білок із широким спектром біологічної активності. Він здатний впливати на різні типи клітин, беручи участь у регуляції їх проліферації, апоптозу та диференціації, а також процесів ангіогенезу, міграції, адгезії й синтезу компонентів позаклітинного матриксу (ECM). Транскрипційна активація експресії CTGF може відбуватися під впливом трансформуючого фактора росту β1 (TGF-β1) через специфічний елемент відповіді, локалізований у промоторній ділянці гена CTGF [131].

CTGF розглядають як один із ключових ефекторів сигнального шляху TGF-β1, залучених до розвитку фіброзних змін. Його дія сприяє активації та

проліферації фібробластів, посиленню їх міграційної активності та збільшенню продукції компонентів позаклітинного матриксу [132]. У тканині інтактної печінки експресія CTGF є відносно низькою та виявляється переважно у венозних ендотеліальних клітинах і міоцитах артеріальних судин [133].

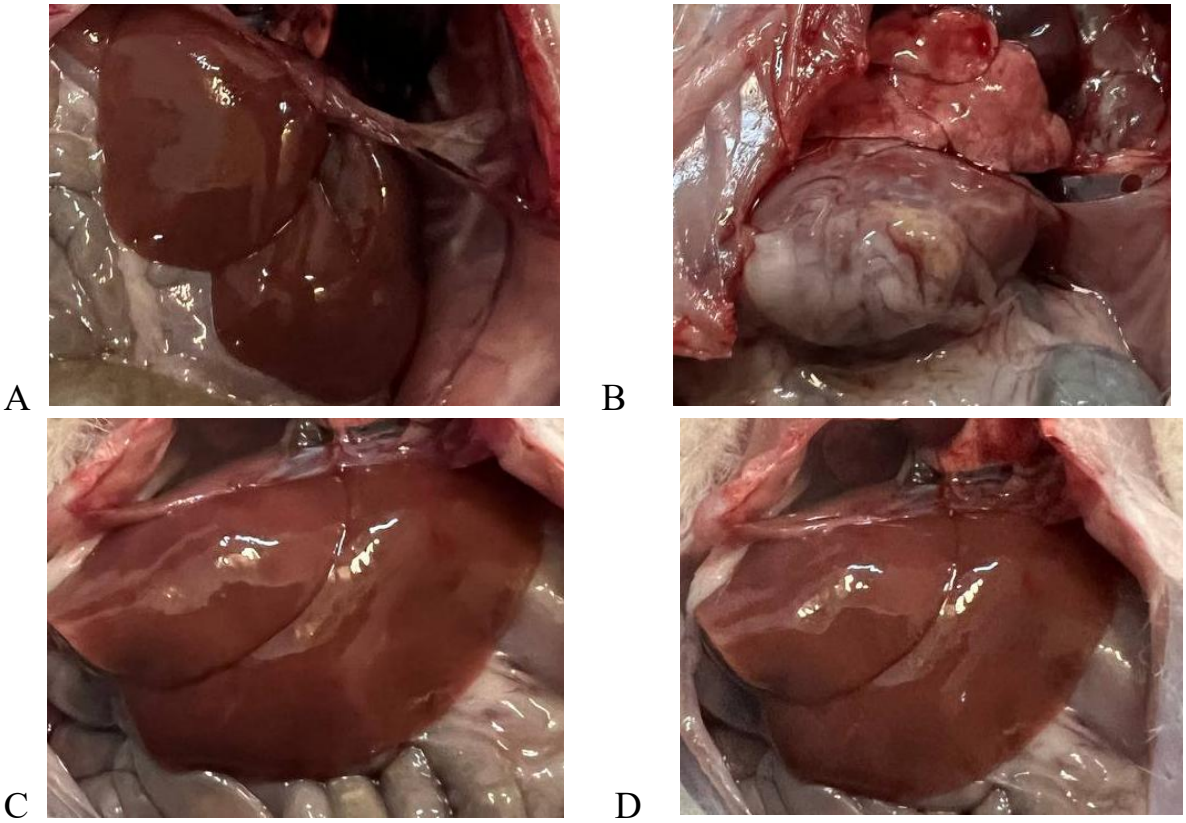


Рисунок 4.2 – A-Група 1(інтакт); B-група 2(CCl_4); C-група 3 (CCl_4+ТТЗ); D-група 4 (CCl_4+DCTP)

Водночас за умов патологічного ураження печінки рівень експресії CTGF істотно зростає. Значне посилення транскрипції цього фактора встановлено при фіброзі, хронічних захворюваннях печінки та токсичних гепатитах [134, 135]. Підвищення експресії CTGF також спостерігали в експериментальних моделях ушкодження печінкової тканини [136]. За результатами імуногістохімічних досліджень встановлено, що CTGF експресується різними типами клітин печінки, зокрема зірчастими клітинами та проліферуючими епітеліальними клітинами [132].

Отримані результати дають змогу припустити, що індукція фіброгенезу сприяє виживанню тварин після пошкодження частини клітин печінки. Тіоптерин та Тіотріазолін активує зірчасті клітини і таким чином забезпечує виживання більшої частини тварин, якщо його вводили на початкових стадіях розвитку цього процесу (Рис. 4.2 C,D).

В той час як введення Тіотріазоліну та Тіоптеріну в процесі розвитку гострого гепатиту та печінки нормалізувало інтенсивність росту таких тварин, і вони не відрізнялися за швидкістю росту від тварин групи інтакт. Отримані результати дають змогу припустити, що введення Тіотріазоліну та Тіоптеріну тваринам з індукованим гострим гепатитом на початкових етапах його розвитку забезпечувало нормалізацію, щонайменше частково, функцій печінки, що зрештою і забезпечувало відновлення росту маси тіла щурів.

4.2 Вплив DCTP на структуру печінкової тканини щурів при CCl_4- індукованому гепатиті

Виражена гепатопротекторна дія *S*-заміщеного птеридину (4.1) підтверджується результатами морфологічних досліджень тканини печінки у щурів досліджених груп. У щурів II групи після введення тетрахлорметану розвивається жирова дистрофія печінки (Рис. 4.3 B), яскраво виражені порушення цитоархітектоніки печінкової часточки, усунення ядра, зміна форми гепатоцитів. Вміст глікогену у складі внутрішньоцитоплазматичних включень знижено проти інтактними тваринами. У печінці щурів, які отримували речовину 4.1 (DCTP), відносна щільність розподілу гранул глікогену в групі IV (Рис. 4.3 D), досягає значень інтактної групи (Рис. 4.3 A), спостерігається відновлення цитоархітектоніки тканин печінки.

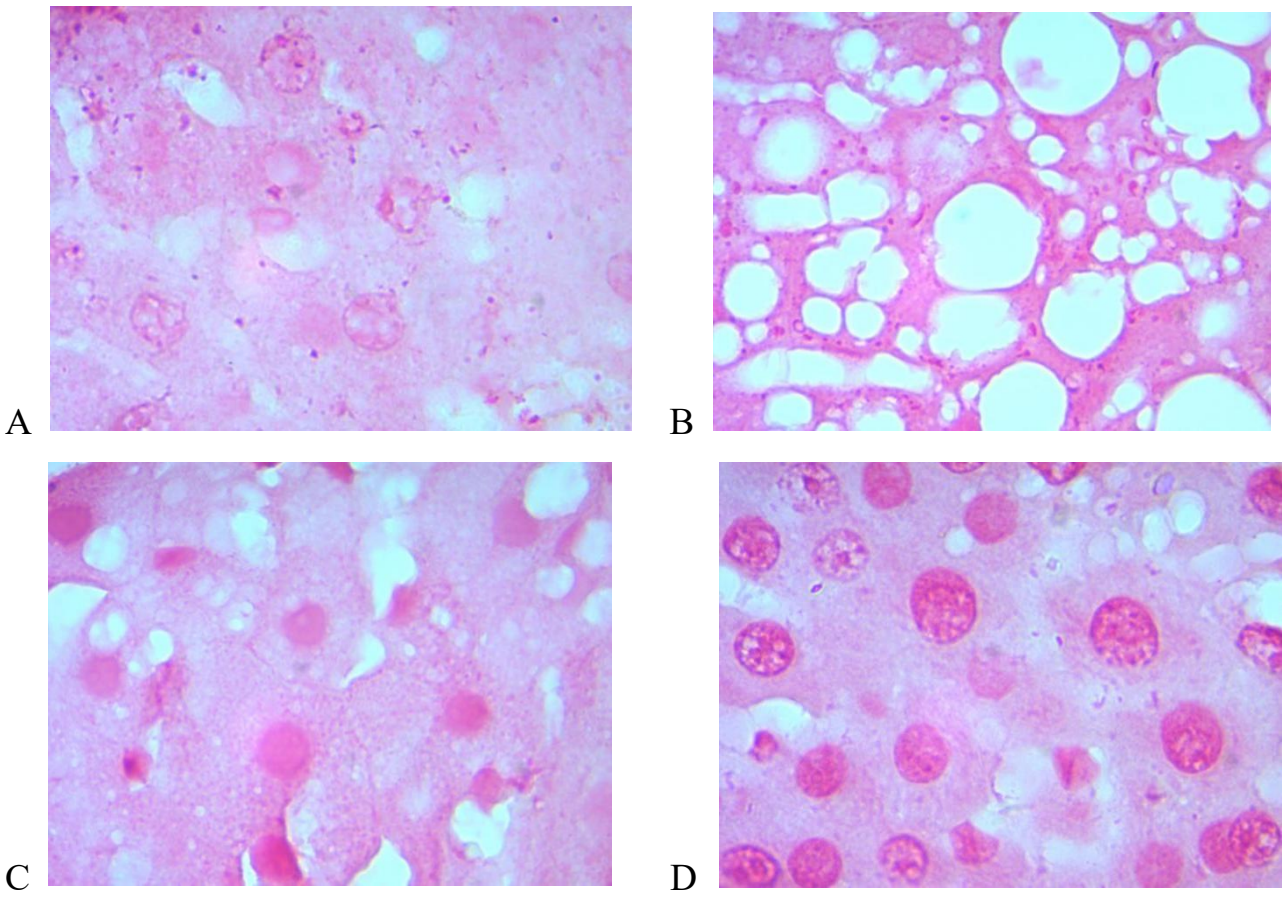


Рисунок 4.3 – A – інтактні (I група), B – щури з тетрахлорметановим гепатитом (II група), C – тварини з тетрахлорметановим гепатитом та введенням 2,5% розчину тіотриазоліну (III група), D – щури з тетрахлорметановим гепатитом корекцією водним розчином сполуки 4.1 (IV група). Забарвлення по Бесту. Х400.

Для виявлення глікогену в 4 групах дослідження використовували метод забарвлення гістологічних зрізів печінки Бесту [99]. Глікоген забарвлювався карміном Беста у червоний колір у вигляді дрібних гранул в ядрі та по периферії цитоплазми гепатоцитів. З використанням програми ImageJ з накладанням масок оцінювали глікогенсинтетичну функцію гепатоцитів відносної щільності розподілу гранул глікогену в гістологічних зрізах. Значення у відсотках отримували як відношення кількості пікселів, відповідних специфічно забарвленим досліджуваним структурам, до кількості пікселів у цифровому зображенні препарату з перерахуванням отриманих даних на площу 9000 мкм^2.

Відносна щільність розподілу гранул глікогену в групі 4 (D) достовірно вища, ніж у контролі (B) та у групі порівняння (C), проте не досягає значень інтактної групи (A). Зменшується вміст гепатоцитів з вакуолізованою цитоплазмою як у порівнянні з контролем, так і в порівнянні з групою щурів, які отримували розчин тіотриазоліну. Залишкові зміни локалізуються у периферичних відділах печінкових часточок.

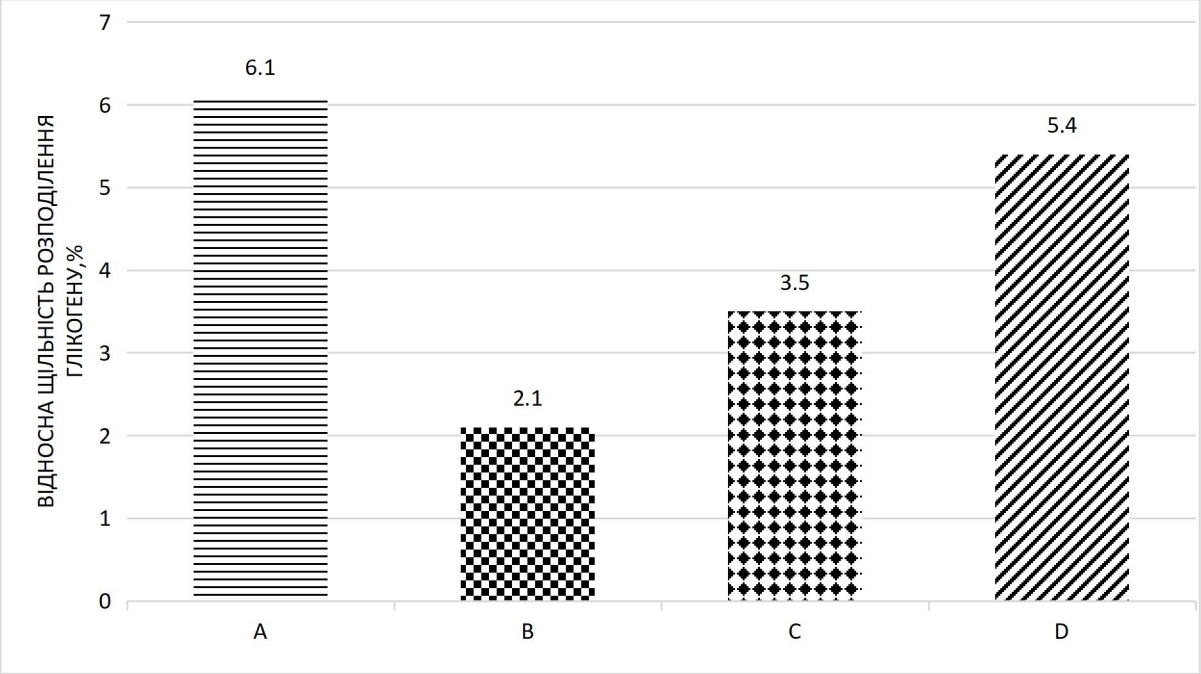


Рисунок 4.4 – Відносна щільність розподілу гранул глікогену у печінці щурів: A–Група 1(інтакт); B–група 2(CCl_4); C–група 3 (CCl_4+ТТЗ); D- група 4 (CCl_4+DCTP). Площа аналізу – 9000 мкм².

Відносна щільність розподілу гранул глікогену в групі 4 (D) достовірно вища, ніж у контролі (B) та у групі порівняння (C), проте не досягає значень інтактної групи (A). Зменшується вміст гепатоцитів з вакуолізованою цитоплазмою як у порівнянні з контролем, так і в порівнянні з групою щурів, які отримували розчин тіотриазоліну. Залишкові зміни локалізуються у периферичних відділах печінкових часточок.

Наслідком патологічного впливу тетрахлорметану на печінку є структурні зміни в гепатоцитах, найважчим проявом яких є некроз. Для якісної оцінки цих змін застосували морфологічне та морфометричне дослідження тканини печінки.

Для проведення даних досліджень забирали шматочки печінки, які фіксували в 10 % нейтральному розчині формаліну і заливали в парафін. Препарати фарбували гематоксиліном та еозином, за якими вивчали структуру печінки у нормі, а також характер і глибину морфологічних змін після інтоксикації тетрахлометаном та йогокомплексної корекції досліджуваними препаратами.

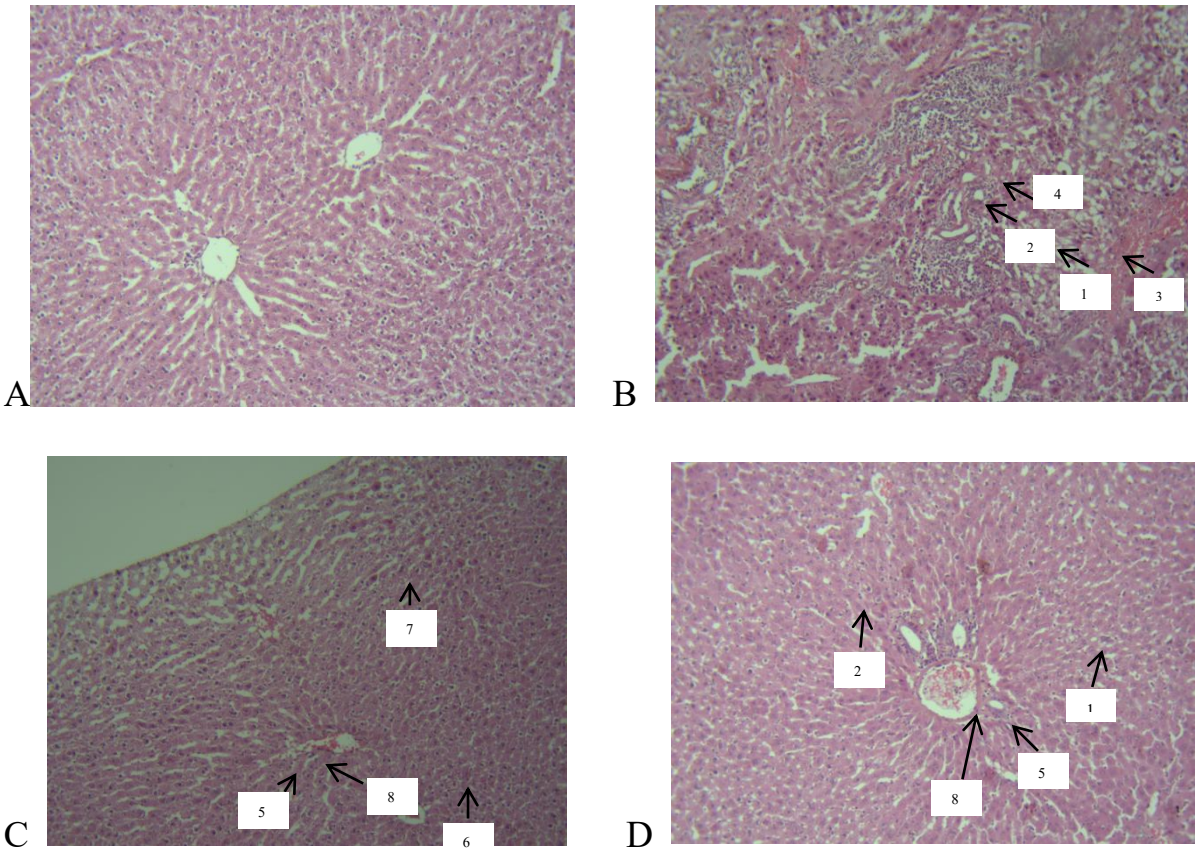


Рисунок 4.5 – Печінка щурів: А – інтактні (I група), В – щури з тетрахлорметановим гепатитом (II група), С – тварини з тетрахлорметановим гепатитом та введенням 2,5% розчину тіотриазоліну (III група), D – щури з тетрахлорметановим гепатитом корекцією водним розчином сполуки 4.1 (IV група). Забарвлення Гематоксиліном-Еозином. Х200.

Було виявлено, що в інтактній печінці має місце частковий, слабко виражений аутоліз гепатоцитів при збереженні структурної організації печінкових часточок, кровонаповнення в нормі (Рис. 4.5 А). Такі варіації структурних змін у печінці відображають її реакції на умови утримання тварин і досить велику кількість неврахованих чинників, які завжди мають місце.

Виявили, що на початкових стадіях розвитку токсичного гепатиту, індукованого тетрахлорметаном, мало місце збільшення товщини капсули Глісона, в яку були інкорпоровані імуннокомпетентні клітини (Рис. 4.5 В).

За літературними даними відомо, що зміни при фіброзі включається більша кількості клітин (фібробласти, судинні клітини, інфільтруючі імунні клітини та біліарні епітеліальні клітини) [136]. Капсула Глісона є сполучнотканинною структурою, що вкриває поверхню печінки та за своїми морфофункціональними характеристиками може бути віднесена до вісцеральних фасцій [137–139]. Її тканинні компоненти мають безпосередній зв’язок з інтерстиціальними просторами печінки та позаклітинним матриксом, розташованим навколо портальних тріад. Така анатомічна організація дає підстави припускати участь капсули у процесах переміщення тканинної рідини та міграції клітин у межах гепатобіліарної системи [140, 141].

Особливістю капсули печінки є її здатність адаптуватися до фізіологічних змін об’єму органа. Протягом доби розміри печінки можуть змінюватися внаслідок коливань об’єму гепатоцитів, пов’язаних із прийомом їжі та циркадними механізмами регуляції. За наявними даними, амплітуда таких змін може досягати приблизно 34 % у щурів та 10–15 % у людини [142]. Адаптація до періодичних змін об’єму органа забезпечується структурними властивостями капсули: у нормі вона є тонкою, має розвинену іннервацію та характеризується значним вмістом еластичних волокон, що загалом відповідає морфологічним особливостям вісцеральної фасції [143].

Специфічна будова капсули формує окреме тканинне мікрооточення, у межах якого за фізіологічних умов представлені різні популяції макрофагів і фібробластів [144]. Водночас розвиток фіброзного процесу супроводжується

вираженою перебудовою її позаклітинного матриксу. Зокрема, при дослідженні поверхні печінки щурів із гострим гепатитом виявлено ущільнення колагенової сітки та порушення типової хвилястої організації колагенових волокон [145]. Ступінь вираженості зазначених структурних змін при цьому тісно пов'язаний із тяжкістю патологічного процесу.

Отже, для прогнозування ступеня фіброзу печінки при токсичному гепатиті можна аналізувати за наявністю змінення, а саме потовщення капсули Глісона як маркеру фіброзу, що свідчить про зміни у капсульному матриксі.

Інші дослідження [146,147] на гризунах показали, що, окрім змін у матриксі, змінилася і популяція капсулярних клітин: мезотеліальні клітини та фібробласти мігрували в паренхіму печінки і сприяли утворенню популяції міофібробластів [146,148].

Капсула є активною ділянкою патології при фіброзі печінки гризунів, з мезотеліальними клітинами, фібробластами та макрофагами, вкрапленими в тонкий шар матриксу.

Після інтоксикації щурів тетрахлорметаном (Рис. 4.5 В) у тканині печінки виявляли ознаки часткового аутолізу гепатоцитів (1) та порушення впорядкованості печінкових балок з їх частковою дискомплексацією (2). Архітектоніка печінкових часточок була порушена. Спостерігали зміни мікроциркуляторного русла: простори Діссе були звужені (4), у них виявляли клітини Ito. Фібробласти траплялися у невеликій кількості, тоді як ендотеліоцити визначалися помірно, переважно поблизу кровоносних судин.

У судинному руслі також відзначали структурні порушення. У венах та артеріях переважно не спостерігали вираженого кровонаповнення (3), водночас в окремих ділянках центральних вен виявляли крововиливи. Цілісність ендотеліальної вистилки судин була частково порушена. Виявлені морфологічні зміни печінкової тканини порівняно з інтактною групою супроводжувалися відповідними змінами активності специфічних ферментів печінки.

У групі щурів, яким на тлі токсичного ураження печінки вводили розчин Тіотріазоліну (Рис.4.5 С), відзначали виражене кровонаповнення судин (8).

Простір Діссе був розширений (3), при цьому досить часто виявляли клітини Ito (4). У периваскулярних ділянках спостерігали ендотеліоцити (5), а також незначну кількість лімфоцитів (6) і фібробластів (7).

У тварин із токсичним гепатитом, які отримували Тіоптерин (Рис. 4.5 D), морфологічні зміни печінкової тканини характеризувалися вираженим порушенням балкової організації паренхіми (1) та ознаками аутолітичних змін гепатоцитів (2). Ядра гепатоцитів переважно мали округлу форму та були відносно однорідними за розмірами. Центральні вени й артеріальні судини характеризувалися вираженим кровонаповненням (8), у тканині також виявляли помірну кількість лімфоцитів (6).

Простір Діссе був звужений (3), а клітини Ito (4) візуалізувалися переважно в межах печінкових часточок. На гістологічних препаратах визначали значну кількість фібробластів та ендотеліоцитів (5), які локалізувалися здебільшого поблизу кровоносних судин. Крім того, у різних ділянках препарату спостерігали множинні порушення цілісності тканини.

Таким чином, на початкових етапах формування фіброзних змін загальна морфологічна перебудова печінкової тканини може залишатися помірно вираженою, тоді як однією з найбільш помітних гістологічних ознак є потовщення капсули Глісcона.

Окислювальний стрес лежить в основі більшості захворювань печінки, включаючи фармакологічне пошкодження печінки, вірусний гепатит та алкогольний гепатит, спричинений наркотиками, вірусами та етанолом. Система Керча, ECH-асоційований білок 1-NFE2-асоційований фактор 2 (Keap1-C), є важливим захисним механізмом клітин та організмів від окисного стресу. Його регуляція знижує лікарсько-індуковане пошкодження печінки у щурів. Крім того, багато природних активаторів Nrf2 регулюють ліпідний обмін і окислювальний стрес в гепатоцитах, тим самим зменшуючи жирову хворобу печінки у мишей [149,150]. Підвищення Nrf2 спостерігається при гострому гепатиті, жировій хворобі печінки, а також вірусних гепатитах та апоптозах [151,152].

Імунгістохімічне дослідження печінки маркером Nrf2 також показало різницю між досліджуваними групами тварин.

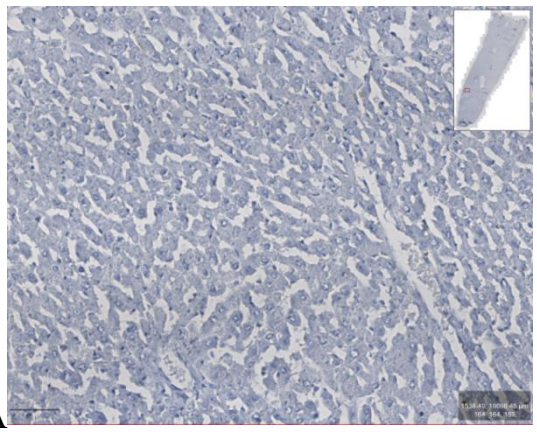
Nrf2 відіграє у активації антиоксидантних ферментів, регулюючи їх транскрипцию [152,153]. Як показано на Рис. 4.6.B, нуклеїновий білок Nrf2 при гострому гепатиті щурів показав дещо вищу експресію порівняно з інтактною групою, що свідчить про наявне пошкодження тканин печінки та зміни її структри.

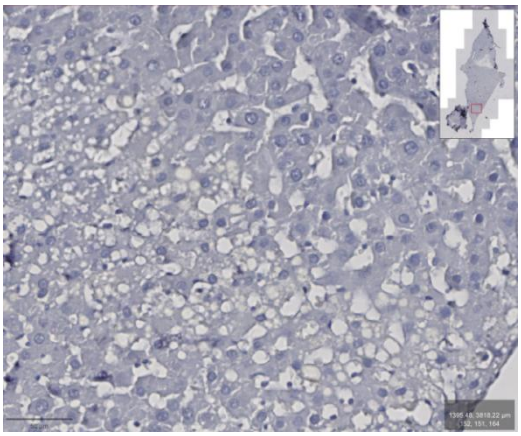
Рівень білка Nrf2 був значно збільшений у групі 3 (ТТЗ) порівняно з 1 групою, яка одержувала фізіологічний розчин (Рис 4.6.C).

Рівень еспресії нуклеїнового білка Nrf2 у групі 4 був на рівні групи інтакт 1.

Рівень білка Nrf2 у групі 4 був значно нижчим, ніж у групі 3, що вказує на антиоксидантну дію Тіоптерину, при впливі тетрахлорметанового оксидативного стресу.

У щурів, які отримували для корекції токсичних змін, викликаних введенням тетрахлорметану водний розчин Тіоптерину, структура печінкової часточки повністю не відновлена, проте в порівнянні з контролем і групою щурів, які отримували розчин тіотриазоліну для корекції токсичних змін, визначається відновлення структур гепатоцитів і тканин в цілому (Рис. 4.6 D).

A 

B 

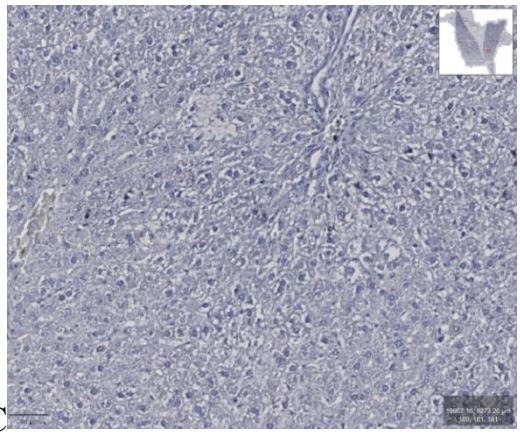
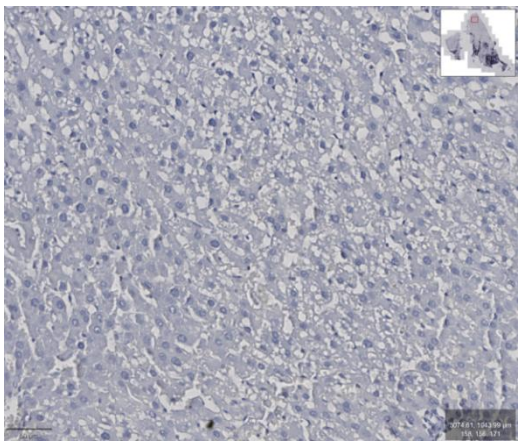
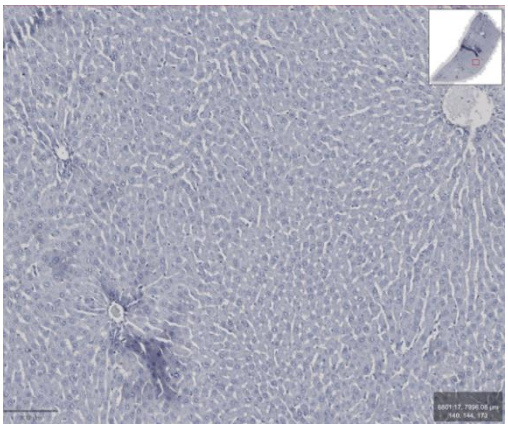
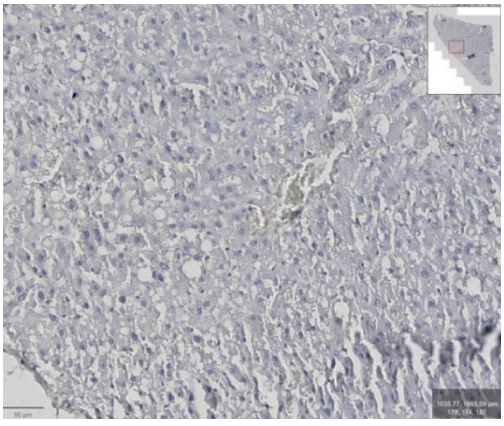
C  D 

Рисунок 4.6 – Печінка щурів: А – інтактна група, В – після введення тетрахлорметану, С – після введення тетрахлорметану та корекції 2,5% розчином Тіотриазоліну, D – після введення тетрахлорметану та корекції водним розчином Тіоптерину. Готові препарати сканували сканером ZEISS Axioscan 7, зображення збільшували у 400–600Х

Ліпокалін-2 експресується при винекненні різних патологічних станів, таких як інтоксикація, інфекція, запалення та інші форми клітинного стресу [154]. Експериментальне пошкодження печінки викликає швидке та стійке виробництво LCN2 пошкодженими гепатоцитами. Проте точна біологічна функція LCN2 у печінці досі невідома. У цьому дослідженні щури зазнавали короткострокового застосування CCl_4, ТХМ і Тіоптерин. Результати оцінювалися за допомогою гістології печінки.

A  B 

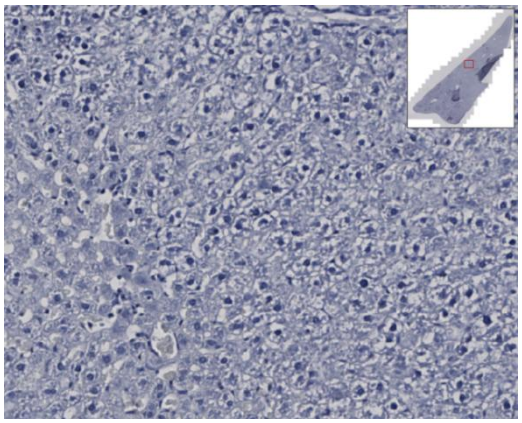
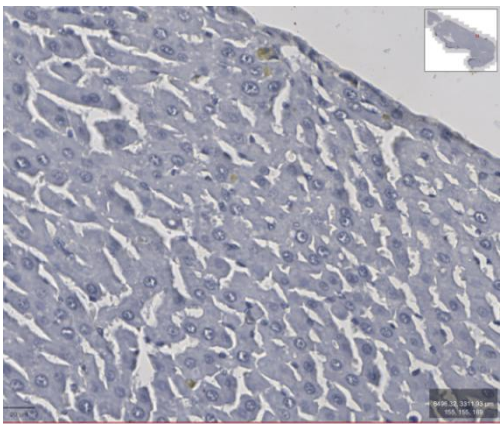
C  D 

Рисунок 4.7 – Печінка щурів: A – інтактна група, B – після введення тетрахлорметану, C – після введення тетрахлорметану та корекції 2,5% розчином Тіотриазоліну, D – після введення тетрахлорметану та корекції водним розчином Тіоптерину. Готові препарати сканували сканером ZEISS Axioscan 7, зображення збільшували у 400–600X

Відповідно, експресія LCN_2 у щурів підвищується після ін'єкції CCl_4 і корелює з пошкодженням печінки, вказаним на підвищені рівні АСТ та АЛТLT (Рис. 4.7 B).

Гостро введення CCl_4 у дозі (0,8мл/100г) викликало появу тяжких дегенеративних змін (макровезикулярні гепатоцити) та/або некрозу, а також жирову дистрофію (Рис. 4.7 B), що супроводжується незначними оборотними змінами (вакуолярні гепатоцити) або тяжкими дегенераціями. та макровезикулярні).

Підвищення регуляції LCN_2 є надійним показником ушкодження печінки, що відповідало групі контроль (Рис. 4.7 B).

Нормальна гістологія тканин печінки щурів була очевидна у I, III та IV групах. Токсичні ефекти CCl_4 (група II) викликали масивні центральні, перивенулярні та проміжні геморагічні коагуляційні некрози печінкових часточок порівняно з групою інтакт. А так само визначалося безліч жирових крапель, що так само свідчить про розвиток гострого токсичного ураження печінки.

Гуппа 3 і група 4 має значну гепатопротекторну дію при гострому пошкодженні печінки, що так само видно при біохімічних та гістологічних дослідженнях.

Тіоптерин показав гарну аниоксидантну, гепатопротекторну та протизапальну дію, це підтвержено у гістологічних та біохімічних дослідженннх.

4.3 Вимірювання біохімічних показників у тварин з CCl_4- індукованим гепатитом печінки

Гостре ураження печінки є основою виникнення і розвитку численних захворювань печінки, які можуть призвести до її термінальної недостатності. Часте ураження печінки провокує розвиток фіброзу, цирозу, гепатоцелюлярної карциноми. Останніми роками все частіше зустрічаються гострі ураження печінки, спричинені фармакотерапевтичними протоколами, передозуванням ліків, самолікуванням, зловживанням алкоголем, вірусним гепатитом [154]. Початковою відповіддю на гостре пошкодження є збільшення прозапальних медіаторів, які сприяють гепатопротекції та регенерації печінки. Однак неналежним чином контрольоване збільшення прозапальних медіаторів (TNF-α, IL-6, Nrf2, Lipocalin-2) і активація клітин Купфера, а також посилення катаболізму поліаміну з вивільненням цитотоксичної H_2O_2 можуть значно посилити існуюче ураження печінки [154,155].

Однією з найбільш відомих і широко використовуваних експериментальних моделей гострого ураження печінки є CCl_4 [156]. Ця модель хімічного ураження печінки використовується для вивчення механізмів ураження печінки та можливої антигепатотоксичної (гепатопротекторної), антиоксидантної дії різних синтетичних речовин або природних продуктів [157].

Гепатопротекторну активність *S*-похідних новосинтезованих птеридинів оцінювали за ураженням печінки тетрахлорметаном в експериментах на щурах. При цьому аналізувалися зміни біохімічних маркерів у сироватці крові, гомогенатах печінки та стан інфільтративно-деструктивних процесів у печінці.

Частіше всього про зміни функціональної активності печінки судять за активністю аланінової амінотрансферази (АЛТ), аспартатамінотрансферази (АСТ), загального білка, альбумінів, сечовини, загального та прямого білірубіну, тимолової проби та лужної фосфатази [158,159]. Проводилась оцінка прооксидантних маркерів: дієнових кон'югатів, малонового діальдегіду та шифових основ, карбонільованих білків. А також вивчали зміни активності печінкових антиоксидантних ферментів: СОД, каталаза, GSH та GSSG в гомогенаті печінки [160].

Тож, на експерементальній моделі гострого гепатиту щурів проводилась оцінка дії новосинтезованої *S*-похідної сполуки птеридину на біохімічні показники та її порівняльна характеристика з іншими експерементальними групами.

Проведені дослідження показали, що при введенні класичного гепатотоксичного агента–CCl_4 кількість тварин зменшувалась залежно від хімічного пошкодження клітин печінки [161].

Антитоксичний ефект оцінювали за виживанням тварин: інтакт (I) – 16 щурів, контроль (II) – 11 щурів, ТТ3 (III) – 14, досліджувана сполука *S*- Тіоптерін (IV) – 16 тварин. Виживання експериментальних тварин (100%) відзначалося після введення досліджуваної речовини *S*-Тіоптеріну у групі (IV).

Зміна активності АЛТ, АСТ, а також загального білка, альбумінів, загального та прямого білірубіну, сечовини у крові свідчить про виникнення токсичного ураження печінки при введенні тваринам тетрахлорметану (група II) (табл. 4.1).

Як видно з таблиці (Табл. 4.2), токсичне ураження печінки у щурів II групи супроводжувалося достовірним підвищенням активності АЛТ – у 3,47 раза, АСТ – у 2,08, ЛФ – у 2,55, загального білірубіну – у 2,06, прямого – 1,69, тимолової проби 5,13. Зниження коефіцієнта де Рітіса щодо групи інтактних тварин свідчить про суттєві ушкодження гепатоцитів, обструкцій [162] жовчних шляхів. Подібні зрушення вказують на розвиток цитолізу гепатоцитів.

Таблиця 4.2

Вплив сполуки Тіоптерин на біохімічні показники сироватки крові щурів з експериментальним гепатитом (M±m)

Показники	Експериментальні групи			
	група I **(інтакт)**	група II **(CCl_4)**	група III **(ТТЗ+CCl_4)**	група IV **(DCTP+CCl_4)**
К-сть тварин	**16**	**11**	**14**	**16**
АЛТ	42.60±2.80	147,90±9,49*	63,03±10,50*/**	60.50±6.80*/**
АСТ	78.10±5.30	162,70±12,80*	129,50±11,49*/**	92.70±9.80*/**/***
Коефіцієнт Де Рітіса	1,80±0,10*	1,10±0,03*	2,12±0,49**	1,56±0,29*/**/***
Загальний білок, г\л	54,85±5,33	47,86±1,58*	48,70±0,98	50,78±2,01
Альбуміни, г\л	28,38±1,80	24,80±0,82*	26,52±1,28	27,83±0,94**
Сечовина, ммоль\л	5,41±0,83	3,87±0,42*	4,66±0,53	6,05±0,41**/***
Лужна фосфатаза	90.50±15.80	228,30±44,70*	101,50±5,45**	89.40±21,00**
Загальний білірубін	9.60±1.80	19,18±1,80*	10,35±1,05**	12.90±2.10**
Прямий білірубін	3.30±0.10	5,58±0,78*	3,56±0,19**	3.30±0.40**
Тимолова проба	0.90±0.05	4,62±0,56*	1,93±0,46**	1.90±0.20**

* – Достовірна відмінність (P<0.05) від група I (інтактних)
** – Достовірна відмінність (P<0.05) від група II (CCl_4)
*** - Достовірна відмінність (P<0.05) від групи III (введення референс препарату Тіотриазоліну на фоні введення тетрахлорметану)

Значення АСТ у щурів при лікуванні експериментального гепатиту 3-ї та 4-ї групи була достовірно меншою на 25% та 46% відповідно, ніж у тварин групи контролю (група II), що вказує на відновлення мітохондрій при ушкодженні печінки, що моделюється.

Введення сполуки (IV) призвело до позитивних змін АСТ порівняно з групою тіотриазоліну (III), різницю між показниками становило 28,4% (Рис.4.8).

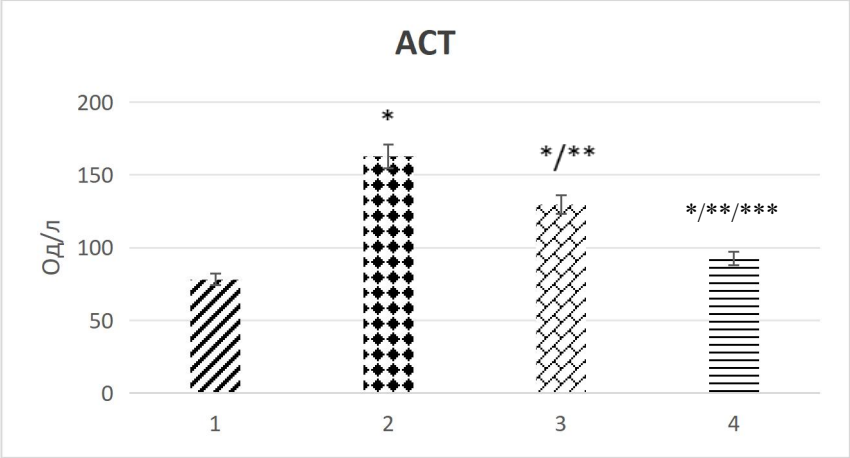


Рисунок 4.8 – Показники рівня АСТ
I- інтакт;II- CCl4;III- ТТЗ +CCl4 ;IV- CCl_4+DCTP
* – Достовірна відмінність (P<0.05) від група I (інтактних)
** – Достовірна відмінність (P<0.05) від група II (CCl_4)
*** - Достовірна відмінність (P<0.05) від групи III (введення референс препарату Тіотриазоліну на фоні введення тетрахлорметану)

При цьому ефект зниження активності АСТ при введенні сполуки DCTP був на 20,9% більшим, ніж при введенні референсу тіотриазоліну (група III).

При введенні сполуки Тіоптерин (група IV) активність АЛТ у крові достовірно знижувалася на 56% порівняно з її величиною у щурів контрольної групи (група II) і при цьому відповідала такій у тварин 3-ї групи.

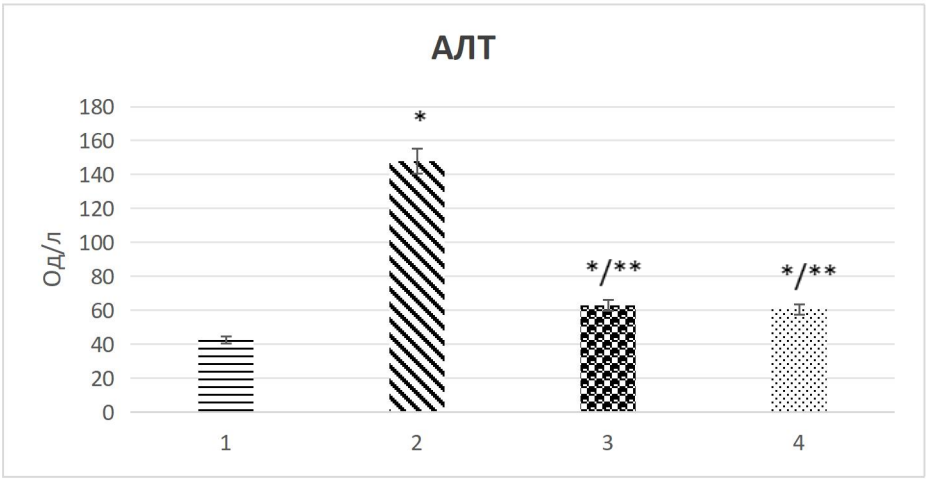


Рисунок 4.9 – Показники рівня АЛТ
I- інтакт; II- CCl4; III- ТТЗ +CCl4 ; IV- CCl_4+DCTP
* – Достовірна відмінність (P<0.05) від група I (інтактних)
** – Достовірна відмінність (P<0.05) від група II (CCl_4)

*** - Достовірна відмінність (P<0.05) від групи III (введення референс препарату Тіотриазоліну на фоні введення тетрахлорметану)

Отже, результати дослідження вказують на те, що при введенні синтезованої речовини *S*-птеридину відбувається зниження вираженості гіперферментемії амінотрансфераз. Це свідчить про його захисну дію на печінку в процесі розвитку токсичного гепатиту. Величина гепатопротекторного ефекту синтезованої сполуки, судячи з результатів дослідження активності АЛТ, можна порівняти з проявом аналогічної дії у референсного препарату – тіотриазоліну, а щодо АСТ навіть перевершує його.

Рівень АЛТ при введенні досліджуваної сполуки (IV) порівняно з контролем (II) достовірно знижувався на 59,1% і дорівнював показнику групи порівняння (III). Щодо групи інтакт (I) відмічено зростання активності ферменту при введенні сполуки (IV) – на 42,0%, ТТЗ – на 47,9%, що може бути наслідком пошкодження внутрішньоклітинних та цитоплазматичних мембран гепатоцитів.

При гострому гепатиті в печінці значно підвищується рівень АЛТ та АСТ і з метою оцінки співвідношення активності амінотрансфераз ми використовували коефіцієнт де Рітіса [162] щоб оцінити ступінь ушкодження печінки. Значення коефіцієнта де Рітіса при введенні CCl4 щодо контролю (II): достовірно збільшувалося у групі III – на 91,8%, у IV групі – на 40,9%, але між групами зазначено відмінність, збільшено показник у III групи порівняно з IV на 26,5% ($P \leq 0,05$).

Токсичне ураження CCL_4 печінки у щурів II групи супроводжувалося достовірним зниженням у крові рівня сечовини, альбумінів та загального білка у 1,4, 1,1 та 1,1 разу відповідно в порівнянні з величиною цих показників у інтактних тварин (група I). Причиною виникнення змін при експериментальному гепатиті є пригнічення білок-синтезуючої функції гепатоцитів та порушення в них процесу сечоутворення як прояву антитоксичної функції печінки.

Загальний вміст білка в сироватці крові відображає стан білкового обміну. Білки переважають в складі щільного залишку сироватки крові (рідкої частини,

яка не містить клітинних елементів). Вони служать основним будівельним матеріалом для всіх клітин і тканин тіла.

Від кількості білків в сироватці залежить осмотичний тиск крові, завдяки якому підтримується баланс між вмістом води в тканинах тіла і всередині судинного русла. Воно визначає здатність води утримуватися в складі циркулюючої крові і підтримувати пружність тканин. Білки також відповідальні за забезпечення правильної кислотно-лужної рівноваги (pH).

У групі контроль 2 (Рис. 4.10) значно зменшується рівень загального білку, що вказує, на дестабілізацію ендоплазматичного ретикулуму і руйнування синтезу білка.

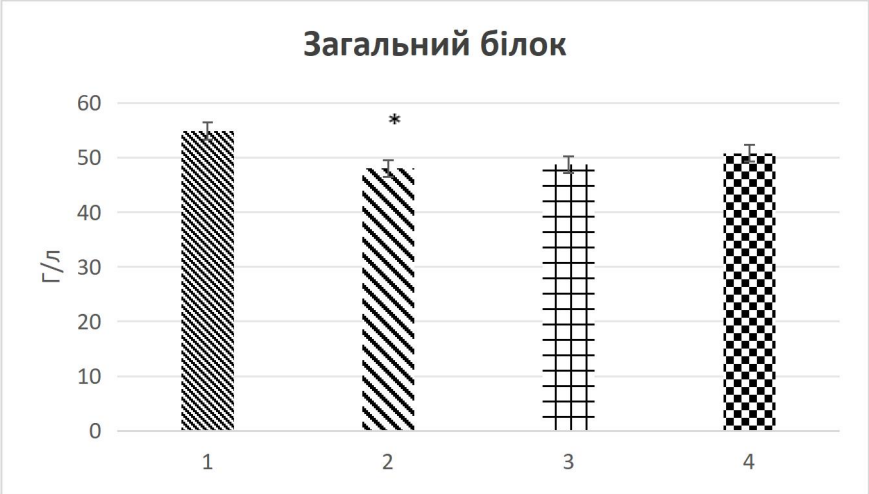


Рисунок 4.10 – Показники рівня загальнго білка
I- інтакт; II- CCl4; III- ТТЗ +CCl4 ; IV- CCl_4+DCTP
* – Достовірна відмінність (P<0.05) від група I (інтактних)

Вміст загального білка у крові щурів 4 групи залишався на рівні інтактних тварин, а також щурів, яким після тетрахлорметана вводився референтний препарат – тіотриазолин. Усе це відображає дію гепатотропних властивостей нової синтезованої речовини, проявом чого служить відновлення білоксинтезуючої функції клітин печінки.

Альбумін є основним білком, який утворюється в печінці. Хоча існує безліч факторів, які можуть впливати на рівень альбуміну, що циркулює у крові. Гостре захворювання печінки, індуковане CCl_4, призводить до зменшення кількості альбуміну, що видно по показникам групи контроль.

Гіпоальбумінемія є характерною ознакою руйнування стуктур печінки. Рівень альбуміну може знижуватися до 60–80% за рахунок гемодилюції, затримки води та натрію, а також секвестрації альбуміну в позаклітинному просторі та асцитичній рідині.

Оскільки білки плазми синтезуються гепатоцитами, то гіпоальбумінемія може свідчити про зниження інтенсивності білоксинтетичних процесів у гепатоцитах, що, як відомо, характерно для цитолітичного синдрому при гострому ураженні печінки тетрахлорметаном [163,164].

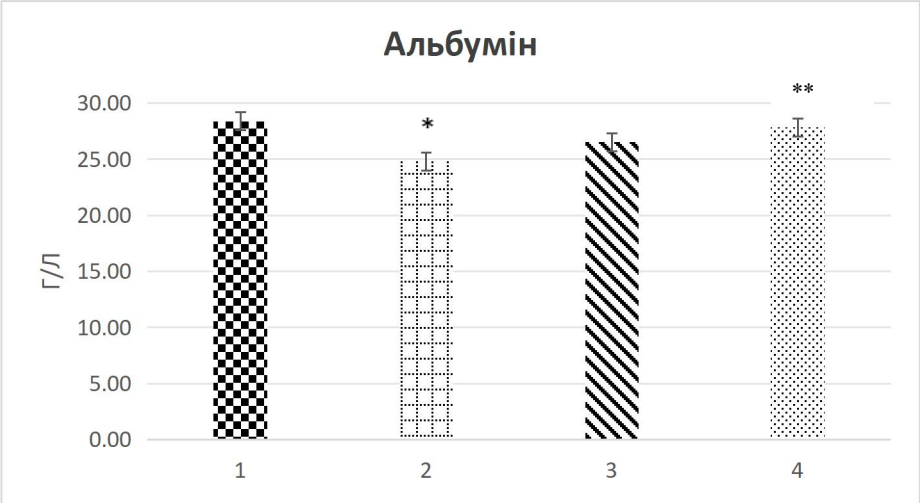


Рисунок 4.11 – Показники рівня альбуміну
I- інтакт; II- CCl4; III- ТТЗ +CCl4 ; IV- CCl_4+DCTP
* – Достовірна відмінність (P<0.05) від група I (інтактних)
** – Достовірна відмінність (P<0.05) від група II (CCl_4)

Гіперпротеїнемія на початкових стадіях розвитку експериментального токсичного гепатиту з одночасним зниженням в сироватці крові рівня альбуміну, можливо, відбувається за рахунок підвищення рівня фракції глобулінів, що може характеризувати запальні процеси [165].

Рівень альбуміну у щурів IV групи під час введення ним препарату 4.1. достовірно зростав на 10,8% порівняно з показником у щурів контрольної групи II. Це може вказувати на відновлення структури печінки та її функцій.

Концентрація сечовини як кінцевого продукту обміну білків та основної складової частини залишкового азоту у ссавців залежить від інтенсивності її синтезу та виведення. Тому її визначення є важливим діагностичним тестом як для печінки, де вона синтезується, так і для нирок, через які вона виводиться.

Дані, наведені в графіку (Рис.4.12), свідчать про те, що після введення тетрахлорметану (CCl_4) сечовиносинтезуюча функція печінки пошкоджується, про що свідчить зниження вмісту сечовини в крові тварин 2 групи (контроль) порівняно з показниками у тварин групи інтакт (1). Одночасно такий показник слугує доказом можливого зниження активності видільної функції нирок за цих умов [165,166].

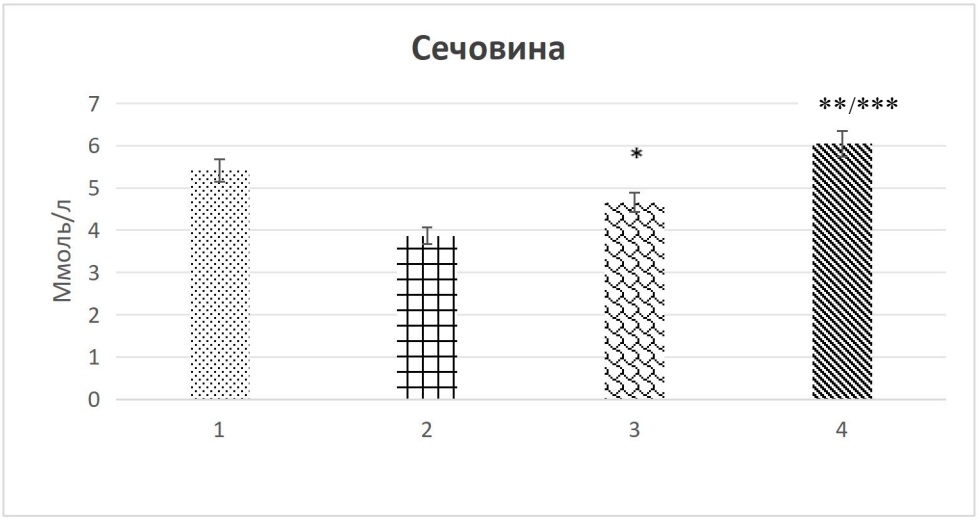


Рисунок 4.12 – Показники рівня сечовини
I- інтакт; II- CCl_4; III- ТТЗ +CCl_4 ; IV- CCl_4+DCTP
* – Достовірна відмінність (P<0.05) від група I (інтактних)
** – Достовірна відмінність (P<0.05) від група II (CCl_4)
*** - Достовірна відмінність (P<0.05) від групи III (введення референс препарату Тіотриазоліну на фоні введення тетрахлорметану)

Введення речовини DCTP щурам групи IV супроводжувалося підвищенням рівня сечовини у крові на 35,5 %, порівняно з її величиною у тварин II групи. При цьому величина даного показника у них була на 23% вищою, ніж у щурів групи III (введення референтного препарату тіотриазоліну).

Підвищення показників вказує на відновлення сечоутворювальної функції та відновленню стану печінки.

Біомаркери холестазу, а саме лужна фосфатаза (ЛФ) сироватки крові, широко використовуються як інструменти прогнозування при холестатичних захворюваннях печінки [165].

Збільшення активності лужної фосфатази з паралельним підвищенням білірубіну, аланінамінотрансферази (АЛТ), аспартатамінотрансферази (АСТ) вказує на пошкодження печінки тетрахлорметаном, за показниками групи контроль II.

Деякі дослідження [166] пояснюють підвищення рівня ферменту лужної фосфатази у сироватці крові збільшенням плинності мембран печінкових клітин, що призводить до вивільнення ферментів у кровообіг.

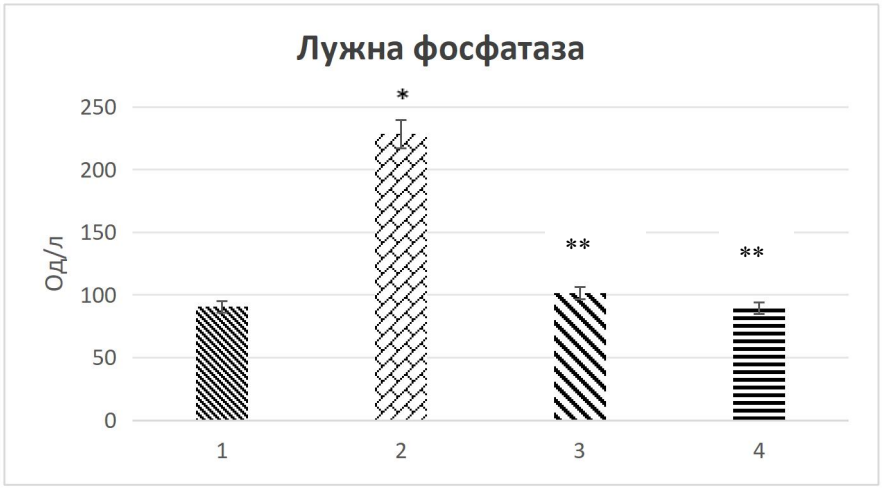


Рисунок 4.13 – Показники рівня лужної фосфатази
I- інтакт; II- CCl_4; III- ТТЗ +CCl_4 ; IV- CCl_4+DCTP
* – Достовірна відмінність (P<0.05) від група I (інтактних)
** – Достовірна відмінність (P<0.05) від група II (CCl_4)

У порівнянні з контрольними тваринами показник знижувався у щурів III групи на 55,5%, IV групи (досліджувана речовина) – на 60,8%. У нашому дослідженні рівень ЛФ відновлювався в обох групах (III та IV) до рівня інтактних щурів. Це може вказувати на відновлення роботи печінки та повернення її до нормального фізіологічного стану.

Білірубін – це метаболічний продукт, який утворюється зруйнування застарілих або аномальних еритроцитів. Значний підвищений рівень білірубіну в контрольній групі CCl_4–можливо, через його вихід з гепатоцитів у плазму, зазвичай через печінкову обструкцію відтоку жовчі та холестаз [167,168] .

Рівень загального білірубіну у групах дослідження (III та IV) достовірно знижувався щодо контролю на 46,0% та 32,7% відповідно, при токсичних ураженнях паренхіми печінки, особливо у поєднанні з холестазом, у крові зростає рівень прямого білірубіну [83, 169].

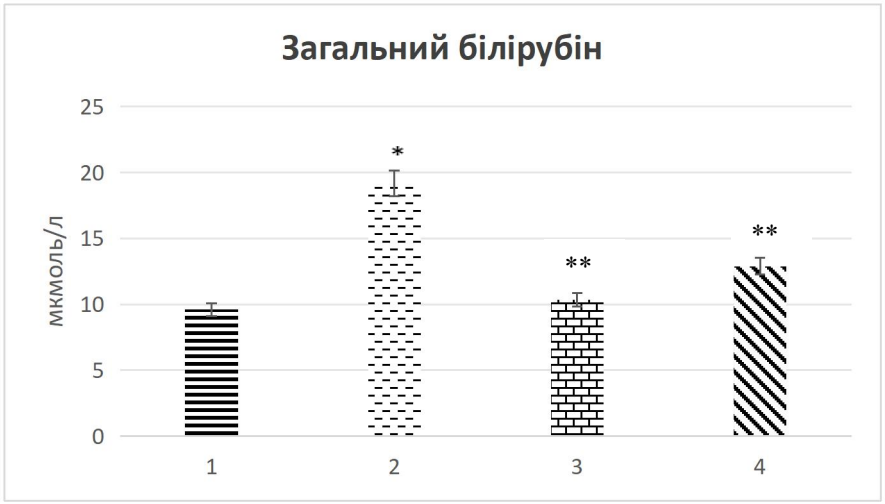


Рисунок 4.14 – Показники рівня загальнго білірубіну
I- інтакт; II- CCl_4; III- ТТЗ +CCl_4 ; IV- CCl_4+DCTP
* – Достовірна відмінність (P<0.05) від група I (інтактних)
** – Достовірна відмінність (P<0.05) від група II (CCl_4)

Застосування сполуки та ТТЗ призвело до зниження цього показника на 40,9% – групою IV, на 36,4% – група III до рівня інтактних тварин (I).

Нами була проведена оцінка здатністі печінки синтезувати білки за допомогою тимолової проби. Також тимолова проба була маркером для оцінки мезенхімального запалення печінки.

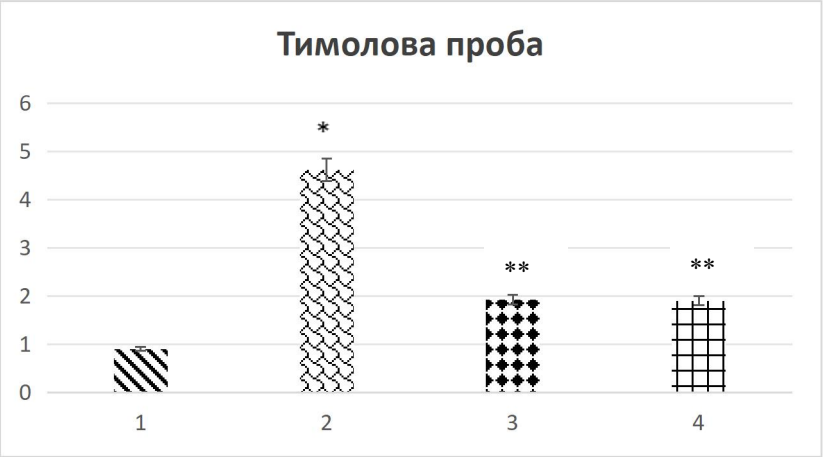


Рисунок 4.15 – Показники Тимолової проби
I- інтакт; II- CCl_4; III- ТТЗ +CCl_4 ; IV- CCl_4+DCTP
* – Достовірна відмінність (P<0.05) від група I (інтактних)
** – Достовірна відмінність (P<0.05) від група II (CCl_4)

Доведено достовірне підвищення ТП у щурів 2 групи – на 79,7 % (p<0,001), що вказує на ушкодження гепатоцитів та дисфункцію печінки.

При корекції порушень відзначено тенденцію до зниження тимолової проби на 58,3% (III) та 58,8% (IV) щодо контролю (II). Але зміни білок-синтезуючої функції, за даними цього тесту, порівняно з інтактними тваринами на 14 добу залишалися статистично рівними.

При експериментальному ураженні печінки ТХМ у тварин відбувалося пошкодження клітинних мембран, підвищення значень АСТ, АЛТ, ЛФ, зазального білку, альбумінів, сечовини, загального та прямого білірубіну, тимолової проби.

В той час, як застосування Тіоптерину та Тіотріазоліну при гострому гепатиті, індукованому ТХМ повертають показники до рівня інтакту.

Вище зазначене вказує на те, що застосування досліджуваної S- синтезованої сполуки Тіоптерину у щурів з експериментальним гепатитом (викликаним CCl_4) – призвело до зменшення цитолітичного процесу, стабілізації функціональної активності печінки, відновлення білок-синтезуючої функції в умовах виникнення оксидативного стресу.

4.4 Особливості зміни вмісту продуктів вільнорадикального окислення ліпідів у печінці щурів при оксидативному стресі індукованому CCl_4

Виникнення та розвиток токсичних ефектів у печінці обумовлено активацією процесів перекисного окислення ліпідів, окисної модифікації білків, нуклеїнових кислот, окисного пошкодження клітинних мембран, що призводить до дисфункції печінки [168] та є основним фактором формування оксидативного стресу [169].

Молекулярний CCl_4 не токсичний, але його гепатотоксичність розвивається після метаболічної активації в печінці високореакційноздатних трихлорметилу (CCl_3•) і трихлорметил-пероксидних радикалів (CCl_3O_2•) [170]. Токсичні метаболіти CCl_4 пов'язані з ліпідами, і вони видаляють атом водню з ненасичених жирових кислот мембран, що індукує процес ланцюгового перекисного окислення ліпідів у клітинах печінки [171].

Тетрахлорид вуглецю (CCl_4) – гепатотоксин, який є причиною виникнення експериментального гепатиту шляхом індукування вільних радикалів, які взаємодіють з поліненасиченими жирними кислотами (ПНЖК) у тканинах печінки та викликають ПОЛ. [172].

Вільнорадикальне окислення - важливий і багатогранний біохімічний процес перетворень кисню, ліпідів, нуклеїнових кислот, білків та інших сполук під дією вільних радикалів, а перекисне окислення ліпідів (ПОЛ) – один з його наслідків [173].

В ході експерименту оцінено стан перекисного окислення ліпідів і вільнорадикального окислення білків [87] у гомогенаті, мітохондріях печінки досліджуваних груп тварин при експериментальному гепатиті, індукованому тетрахлорметаном.

Для оцінки швидкості вільнорадикального окислення ліпідів у гомогенаті печінки щурів досліджуваних груп проводилося визначення концентрації первинних (дієнові кон'югати), вторинних (ТБК+-реактивні речовини) і кінцевих

(шиффові основи) продуктів ПОЛ. Результати проведених досліджень представлені у таблиці 4.3.

Таблиця 4.3

Зміни вмісту продуктів ПОЛ у печінці щурів при введенні ТХМ та вплив на нього попереднього введення речовини IV (M±m)

Група тварин	Дієнові кон'югати	Малоновий діальдегід	Шифові основи
Група I (Інтакт)	25,19±2,38 (10)	5,39±0,47 (10)	38,80±17,69 (10)
Група II (CCl_4)	48,34±1,06* (7)	15,10±0,27* (7)	116,00±28,33* (7)
Група III (ТТЗ +CCl4)	34,22±2,63** (8)	7,63±0,65** (8)	83,11±14,94** (8)
Група IV (CCl_4+DCTP)	27,48±1,34**/*** (10)	6,29±0,95** (10)	47,56±10,67** /*** (10)

* – Достовірна відмінність (P<0.05) від група I (інтакт)
** – Достовірна відмінність (P<0.05) від група II (CCl_4)
*** - Достовірна відмінність (P<0.05) від групи III (введення референс препарату Тіотриазоліну на фоні введення тетрахлорметану)

Отримані дані в результаті дослідження стану вільнорадикальних процесів на моделі експериментального гепатиту свідчать про те, що введення гепатотоксину виявлялося у щурів II групи статистично значущим підвищенням концентрації ДК у гептановій фазі ліпідного екстракту у 1,91 раза, вмісту МДА у 2,80 раза, Шиффових основ у 2,99 рази щодо групи інтактих тварин (I), що свідчить про активацію процесів ПОЛ в гепатоцитах щурів після введення їм гепатотропної отрути тетрахлорметану (CCl_4).

Аналіз отриманих даних про концентрацію окремих проміжних продуктів перекисного окислення в печінці щурів, дозволяє дійти однозначного висновку про більшу величину стимуляції ПОЛ у групі контроль (II). Про те, зокрема,

свідчить більш виражений рівень стресорного накопичення дієнових кон'югатів, ТБК–реактивних речовин і шиффових основ.

Важливим аргументом на користь більшої стимуляції ПОЛ у печінці щурів при оксидативному стресі є факт вищого рівня накопичення у них шиффових основ порівняно з таким у інтактних тварин. Це пов'язано з тим, що шифові основи є кінцевим продуктом вільнорадикального окислення ліпідів.

Під час фази перекисного окислення ліпідів не знешкоджені токсичні радикали CCl_4 створюють ковалентний зв'язок з білками та ліпідами мембран гепатоцитів, мітохондріальної та ендоплазматичної сітки, після чого реакційноздатний радикал (CCl_3O_2•) відриває атом, який створений таким чином ліпідний радикал індукує процес перекисного окислення ліпідів, що призводить до морфологічного та функціонального пошкодження гепатоцитів [175].

За рахунок стимуляції вільнорадикальних процесів виникають метаболічні передпосилки для зміни швидкості окислювально-відновлювальних перетворень в гепатоцитах печінки, а також порушення енергозалежних функцій мітохондрій і, в тому числі, окислювального фосфорилювання [176].

Концентрація ДК в групах досліджень (III і IV) достовірно знизилася відносно контрольної групи (II) на 29,2% і 43,1%. При порівнянні з групою інтактних тварин відмічено підвищення показника у щурів III групи на 35,8%, при введенні синтезованої сполуки Тіоптерину (IV) вміст ДК у щурів істотно не змінилося.

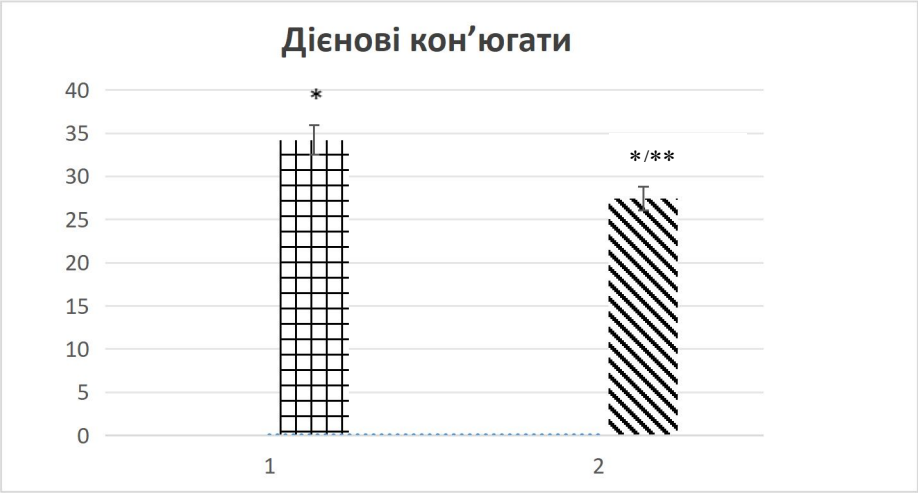


Рисунок 4.16 – Зміни концентрації Дієнових кон'югатів у печінці щурів при впливі Тіотриазоліну (III) та сполуки Тіоптерину(IV).
I- ТТЗ +CCl_4 ;
II- CCl_4+DCTP
* P <0,05- порівняно з групою II (CCl_4)
** P <0,05- порівняно з групою III (CCl_4+ТТЗ)

Застосування новосинтезованої сполуки (IV) привело до зниження ПОЛ на рівні утворення первинних продуктів (ДК) у порівнянні з групою Тіотриазоліну (III), різниця між показниками склала 19,7% (P <0,05) (Рис. 4.16). Це вказує на гепатопротекторну дію Тіоптерину, що привело до відновлення показників антиоксидантного захисту.

Аналіз ситуації зі зміною вмісту продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів у печінці дозволяє думати про те, що вона виникає внаслідок зміни шляхів метаболізму ТБК+ реагуючих речовин. Особливе значення серед них має малоновий діальдегід та гомологічні йому сполуки, що утворюються у процесі обміну перекисів ліпідів [177,178]. Характер зрушень у зміщенні проміжних продуктів ПОЛ дозволяє припустити, що утилізація малонового діальдегіду та його гомологів у печінці при ураженні CCl_4 йде, переважно, шляхом утворення кінцевих продуктів метаболізму типу шиффових основ.

Враховуючи ключове значення малонату у синтезі вищих жирних кислот, можна припустити певний взаємозв'язок між посиленням використання малонового діальдегіду для утворення малонової кислоти та збільшенням

швидкості репаративних процесів у гідрофобному шарі клітинних мембран, що ушкоджуються в умовах формування оксидативного стресу [179].

Для оцінки стану процесів вільнорадикального окислення ліпідів у печінці у безбілкових екстрактах її гомогенатів у тварин усіх досліджених груп проводили визначення вмісту малонового діальдегіду (Рис. 4.17).

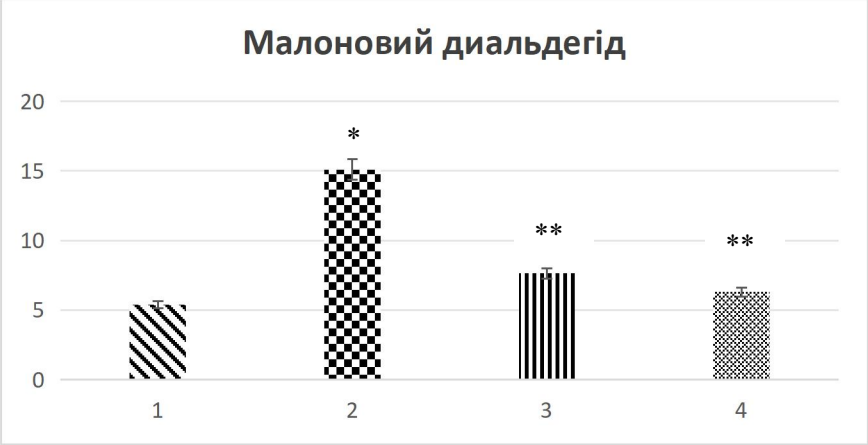


Рисунок 4.17 – Зміни концентрації Малонового діальдегіду в печінці щурів у різних експериментальних групах.
I– інтакт; II– CCl_4; III– ТТЗ +CCl_4 ; IV–CCl_4+DCTP
* – Достовірна відмінність (P<0.05) від група I (інтактних)
** – Достовірна відмінність (P<0.05) від група II (CCl_4)

Проведені дослідження показали, що концентрація цього метаболіту в гомогенаті печінки тварин групи II була в 2,5 рази вищою, ніж у інтактних тварин (група 1), що вказує на посилення процесів вільно-радикального окиснення ліпідів та виникнення окисного стресу в печінці щурів з експериментальним гепатитом.

При введенні сполуки Тіоптеріну у тварин IV групи відбувалося достовірне зменшення вмісту малонового діальдегіду у гомогенаті печінки на 54,5% порівняно з групою контролю (група II). Подібний за силою ефект виявлявся і у тварин, яким вводили референтний препарат Тіотриазолін (група III).

Результати проведених досліджень побічно вказують на те, що структура шиффових основ у печінці різних експериментальних груп щурів відрізняється. На підставі результатів можна висловити припущення про те, що при

оксидативному стресі викликаному CCl_4 в печінці щурів утворюються кінцеві продукти ПОЛ (шифові основи), які певною мірою розрізняються за будовою.

Виникаючі структурні відмінності визначають зміну властивостей шиффових основ і, зокрема, їх здатність до внутрішньоклітинної утилізації.

Зміні структури утворюються в процесі стресорної стимуляції вільнорадикального окислення ліпідів шиффових основ, крім іншого, сприяє поява характерних зрушень у метаболізмі проміжних продуктів ПОЛ. На це, зокрема, вказує той факт, що при початковій концентрації початкових продуктів перекисного окислення ліпідів (дієнових кон'югатів) і ТБК+- реагуючих речовин у групі контроль (II) при оксидативному стресі втричі збільшується вміст його кінцевих продуктів (шиффових основ) у порівнянні з інтактними тваринами.

Результати, отримані в цьому дослідженні, безперечно підтверджують той факт, що Тіоптерин явно зменшує гострі гепатотоксичні ефекти, викликані CCl_4, на це прямо вказують дані про їхню здатність гальмувати накопичення продуктів ПОЛ у печінці в умовах формування експериментального гепатиту.

Встановлений факт стимуляції ПОЛ у печінці щурів, під впливом оксидативного стресу, викликаного тетрахлорметаном перебуває у повній відповідності до спостережень інших авторів [180–182].

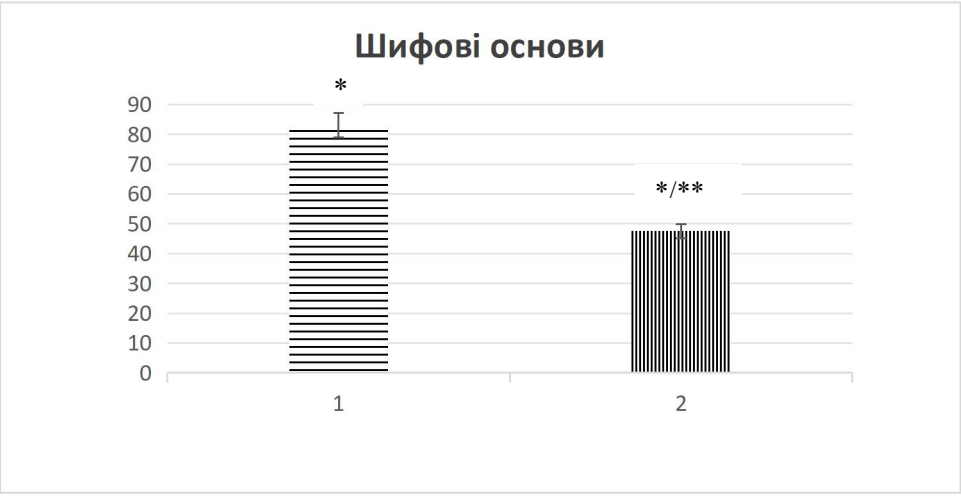


Рисунок 4.18 – Зміни концентрації Шифових основ у печінці щурів при впливі Тіотриазоліну (III) та сполуки *S*-Тіоптерину (IV).
I- ТТЗ +CCl_4
II- CCl_4+DCTP

* P <0,05- порівняно з контрольною групою (II)
** P <0,05- порівняно з групою ТТЗ (III)

Збільшення рівня первинних продуктів ПОЛ у щурів з експериментальним гепатитом супроводжувалося активним утворенням кінцевих продуктів ПОЛ – Шиффових основ: при введенні ТТЗ – на 62,5%, сполуки IV – 22,6% порівняно з групою інтактних тварин.

При порівнянні між групами тварин, які отримували лікування (III та IV), відмічено позитивний вплив при введенні синтезованої сполуки Тіоптервин (IV), яка перевершувала дію Тіотріазоліна на 24,6% (P<0,05).

Проте, крім ліпідів у процесі вільно радикального окиснення інтенсивно залучаються інші класи органічних речовин. Особливе значення у тому числі мають білки [182].

4.5 Особливості зміни вмісту карбонільованих білків у печінці щурів при оксидативному стресі індукованому CCl_4

Карбонільовані похідні білків є відносно стабільними продуктами, які утворюються під час металокаталізованого окислення залишків проліну, аргініну, лізину або трианіну з утворенням продуктів Міхаеля [183]. Поряд з цим існують інші шляхи утворення карбонільованих білків у клітині, зокрема, вони можуть утворюватися за участю продуктів перекисного окиснення ліпідів, а також у процесі глікування/глікоокислення аміногруп лізину [184].

Крім того, кількість карбонільованих білків у клітині визначається не тільки швидкістю їх утворення, але й швидкістю їх деградації, яка реалізується як мінімум двома шляхами. За участю 20S убіквітин-незалежних протеасом і шляхом убіквінування білків з утворенням 26S протеасом, а також їх руйнування протеазами [185,186]. Було показано, що пригнічення активності протеасоми супроводжувалося накопиченням карбонільованих білків у клітині [187].

Окислювальна модифікація білкових молекул вносить важливий внесок у механізм вільнорадикального пошкодження клітин. Більш того, у літературі

зустрічаються вказівки по більшій чутливості білків до вільнорадикального окислення, ніж ПОЛ [188].

Збільшення 2,4-динітрофенілгідразонів (2,4–ДНФГ) у мітохондріях тварин контрольної групи після введеня тетрахлорметану може бути пов'язане зі зміною кількох метаболічних процесів порівняно з групами інших тварин.

Підвищений вміст карбонільованих білків (КБ) у щурів контрольної групи (II) свідчить про карбонільний стрес [189], який є потужним патогенетичним фактором, оскільки карбонілювання супроводжується пригніченням ферментативної активності, зміною структурної організації мембранних білків, а у випадку карбонілювання шаперонів Hsp90 це призводить до порушення згортання ряду білків [190].

На підставі патології (експериментальний гепатит) у щурів 2-ї групи відзначено тенденцію до збільшення карбонілованих білків у 2,27 рази порівняно з групою інтактних тварин, що вказує на підвищення швидкості вільнорадикального окиснення білків та порушення функціонування антиоксидантної системи (Рис. 4.19).

Окислювальна модифікація білків (ОМБ) робить істотний внесок у механізм вільнорадикального пошкодження клітин [191,192].

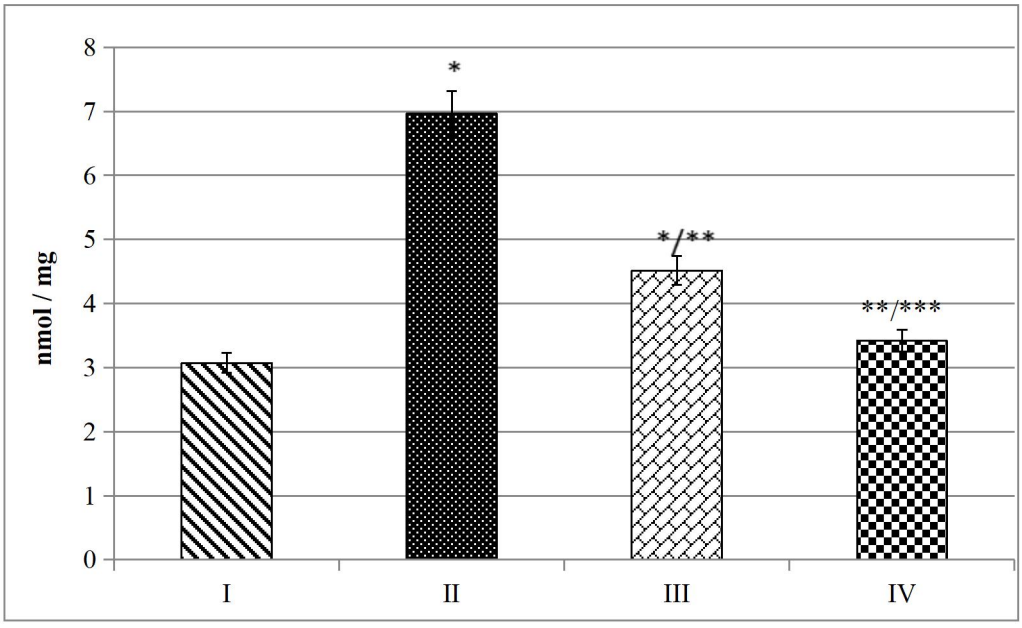


Рисунок 4.19 – Вміст карбонильних білків у гомогенаті печінки щурів на моделі експериментального гепатиту.
I- інтакт; II- CCl4; III- ТТЗ +CCl4 ; IV- CCl_4+DCTP

* – Достовірна відмінність (P<0.05) від група I (інтактних)
** – Достовірна відмінність (P<0.05) від група II (CCl_4)
*** - Достовірна відмінність (P<0.05) від групи III (введення референс препарату Тіотриазоліну на фоні введення тетрахлорметану)

У 3–й та 4–й групах щурів з експериментальним гепатитом, навпаки, відзначалося достовірне зниження карбонілованих білків ($p \leq 0,05$), що становило 35% та 50,8% порівняно з контролем. При введенні синтезованої речовини Тіоптерину (IV) у мітохондріях печінки відмічалось зменшення концентрації 2,4-динітрофенілгідразонів. Під впливом Тіоптерину (IV) показник достовірно знижувався у порівнянні з групою тварин які отримували Тіотриазолін (III), відмінність між групами склала 24.3% .

Наведені у даному підрозділі результати дозволяють стверджувати, що ураження печінки тетрахлорметаном призводить до інтенсифікації процесів вільнорадикального окиснення, що підтверджується активацією процесів ліпопероксидації та окиснювальної модифікації білків.

На це вказує підвищення вмісту дієнових кон'югатів, ТБК-активних продуктів, шиффових основ у порівнянні з інтактними тваринами та 2,4- динітрофенілгідразонів у гомогенаті печінки, мітохондріях уражених тварин.

Таким чином, результати данного підрозділу, підтверджують негативний вплив токсичного ураження печінки при тетрахлорметановому гепатиті на процеси, що супроводжується посиленням вільнорадикального окислення в організмі щурів і підтверджується активацією процесів ПОЛ та окиснювальної модифікації білків та накопиченням окисних продуктів–дієнових кон’югатів, шифових основ, малонового діальдегіду та карбонільованих білків у досліджуваних тканинах.

Застосування Тіоптерину проявляє коригуючий вплив на показники ліпопероксидації та окисної модифікації білків, наближаючи їх до рівня тварин групи інтакт (I).

4.6 Визначення стану антиоксидантної системи у печінці при ТХМ гепатиті

Активація вільнорадикальних процесів при потенціюючій дії тетрахлорметану на організм експериментальних щурів супроводжується порушенням функціонування ферментативних і неферментативних антиоксидантів, що пов’язане як із виснаженням їх резервів, у зв’язку з інтенсивним споживанням у реакціях детоксикації, так і з порушенням синтезу. Також ці зміни відображаються на структурних та біохімічних показниках печінки у різних експериментальних груп тварин (3).

Особливої ролі серед антиоксидантів набувають антиоксидантні ензими. До них належать ферменти першої лінії антиоксидантного захисту (супероксиддисмутаза і каталаза) [193]. Дані літератури свідчать про те, що їхня антиоксидантна дія реалізується тільки в умовах їхньої тісної функціональної взаємодії [194].

Ферменти першої лінії антиоксидантного захисту перебувають під контролем прооксидантів. Як їх регулятори та модулятори синтезу можуть виступати АФК [195].

Іншою поширеною активною формою кисню, що бере участь в ініціації ланцюгових вільнорадикальних процесів у клітинах, є супероксидний аніон-радикал. Утилізація супероксидного аніону-радикалу пов'язана з його ферментативною дисмутацією в супероксиддисмутазній реакції [196], продуктом якої є перекис водню.

Як показали результати наших досліджень, ураження печінки тетрахлорметаном супроводжується глибокими порушеннями з боку ферментативної антиоксидантної системи.

При введенні ТХМ тваринам ми виявили, що рівень СОД у 2-й групі був значно нижчим порівняно з 1-ю групою 53,3% ($p \leq 0,05$) (Рис. 4.20). Це може бути однією з причин зниження антиоксидантної активності.

Попереднє введення Тіотріазоліну та Тіоптерину щурам III та IV груп, попереджало у них виникнення зрушень з боку активності СОД та сприяло нормалізації кінетики супероксид дисмутазної реакції у дослідженій фракції при оксидативному стресі.

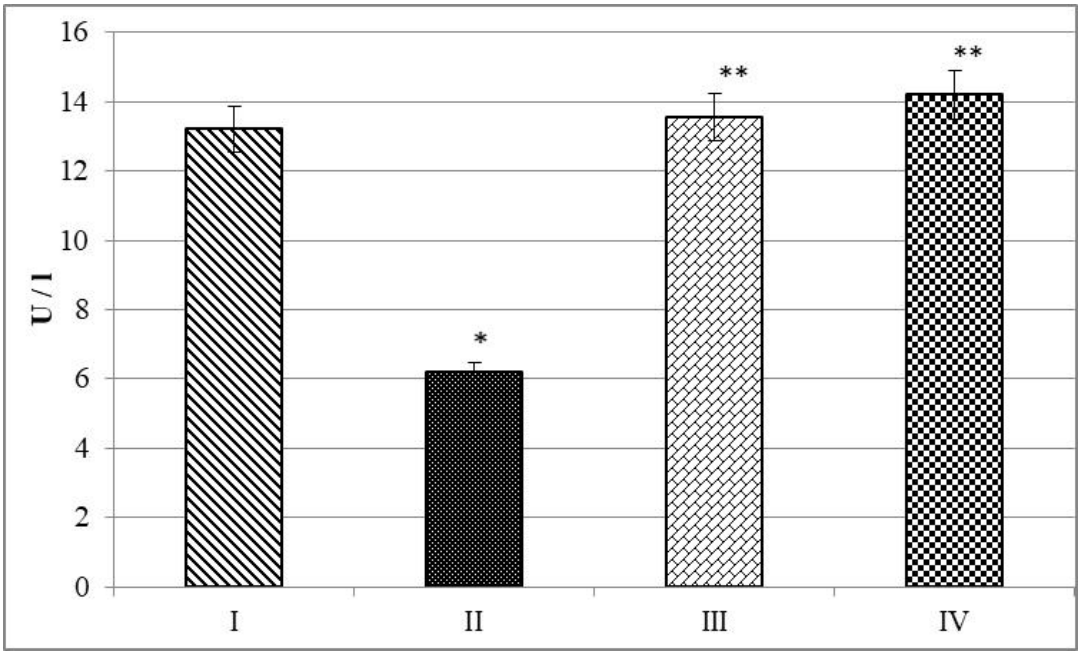


Рисунок 4.20 – Вміст СОД (КФ 1.15.1.1) у гомогенаті печінки щурів на моделі експериментального гепатиту.
I- інтакт; II- CCl_4; III- ТТЗ +CCl_4 ; IV- CCl_4+DCTP
* – Достовірна відмінність (P<0.05) від група I (інтактних)
** – Достовірна відмінність (P<0.05) від група II (CCl_4)

У 3-й та 4-й групах щурів з експериментальним гепатитом відзначалося підвищення рівня СОД, що свідчить про посилення компенсаторних механізмів антиоксидантних систем у 2,2 та 2,3 рази порівняно з контролем [52 40]. При введенні ТТЗ (III) та Тіоптерину (IV) відновлювався показник СОД до 13,56±1,01 та 14,19±0,96 відповідно, що дорівнює значенню інтактних щурів (група I).

Оцінюючи результати проведених досліджень можна дійти висновку про те, що новосинтезована речовина Тіоптерин дійсно має виражену антиоксидантну, гепатопротекторну дію в умовах *in vivo.*

Важлива роль утилізації перекису водню належить каталазі [197]. Каталаза (КТ) – фермент, який розкладає перекис водню каталізуючи реакції

двох типів: каталазну і пероксидазну [198]. Цей металофермент складається з 4 субодиниць, в кожній з яких є по одній групі гему з трьохвалентним залізом. КТ знайдена в клітинах абсолютної більшості представників тваринного світу.

Активність КТ в клітині змінюється при різних патологічних станах, зокрема, при токсичному гепатиті, викликаному підшкірним введенням щурам тетрахлорметану [199].

Якщо розглядати тканинну локалізацію каталази, то слід відзначити, що у печінці зосереджено до 60 % її загальної активності [200].

Таблиця 4.4

Вплив сполуки Тіоптерин на активність каталази у мітохондріальній фракції печінки щурів з експериментальним гепатитом (M±m)

Показники	**Експериментальні групи**			
	група I **(інтакт)**	група II **(CCl_4)**	група III **(ТТЗ+CCl_4)**	група IV **(CCl_4+ДСТР)**
К-сть тварин	**6**	**4**	**6**	**6**
Каталаза (КФ1.11.1.6), мкмоль/мг білка хв	12,0 ± 1,1	6,0 ± 1,0*	8,2 ± 1,8	11,0 ± 0,8 **/***

* – Достовірна відмінність (P<0.05) від інтактних (група 1)
** – Достовірна відмінність (P<0.05) від контролю (група 2)
*** - Достовірна відмінність (P<0.05) від групи 3 (введення референс препарату Тіотриазоліну на фоні введення тетрахлорметану)

Вивчення активності каталази у мітохондріальній фракції печінки показало (Табл. 4.4), що введення тетрахлорметану призводило до дворазового зниження активності ферменту у щурів 2 групи, порівняно з його величиною у інтактних тварин (група I). Виникнення цього зсуву сприяло посиленню оксидативного стресу печінки, як наслідок порушення функціонування в гепатоцитах ферментативної системи першої лінії антиоксидантного захисту [201].

Введення Тіоптерину перешкоджало пригніченню каталази в мітохондріальній фракції печінки у щурів IV групи. На це вказує той факт, що активність ферменту у них на рівні інтактних тварин. Причому введення референтного препарату – Тіотриазоліну не супроводжувалося виникненням такого зсуву.

Отримані дані вказують на існування певних відмінностей у прояві захисної дії препарату Тіоптерин та Тіотриазоліну на гепатоцити в умовах оксидативного стресу, що виникає у печінці після введення ТХМ.

Зниження значення каталази в контрольній групі призвело до зниження антиоксидантної здатності печінки. Дані групи (IV) свідчать про відновлення метаболізму та структур печінки порівняно з контрольною групою.

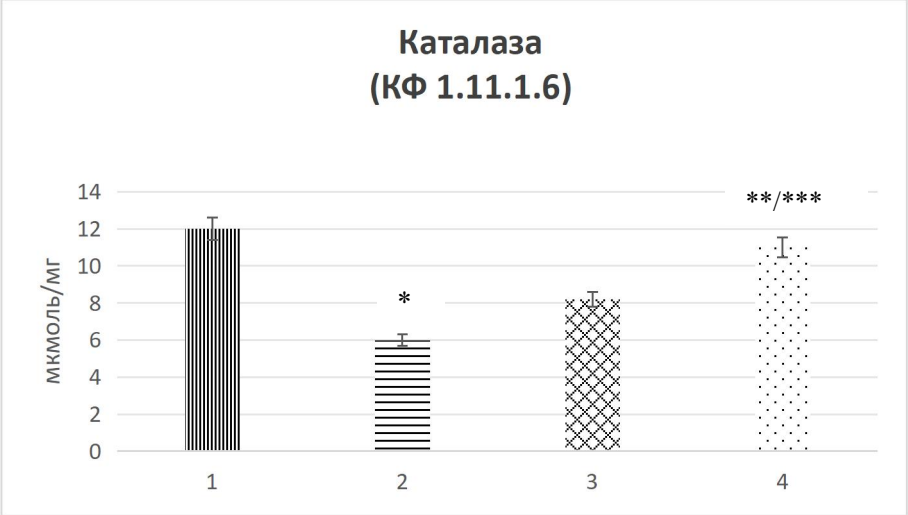


Рисунок 4.21 – Гепатопротекторна активність Тіоптеріна и Тіотріазоліна
I- інтакт; II- CCl_4; III- ТТЗ +CCl_4 ; IV- CCl_4+DCTP
* – Достовірна відмінність (P<0.05) від інтактних (група 1)
** – Достовірна відмінність (P<0.05) від контролю (група 2)
*** - Достовірна відмінність (P<0.05) від групи 3 (введення референс препарату Тіотриазоліну на фоні введення тетрахлорметану)

Аналізуючи результати проведених досліджень можна дійти висновку про те, що нове похідне Тіоптерин має виражений гепатопротекторний, антиоксидантний ефект. Його введення гальмує пошкодження гепатоцитів при тетрахлорметановому ураженні печінки, перешкоджає порушенню

антитоксичної функції. Однією з причин виникнення виявленого ефекту даного препарату є його виражена антиоксидантна дія, що зумовлює гальмування процесу оксидативного стресу у печінці при введенні ТХМ.

Антиоксидантна дія, застосованого з метою корекції, новосинтезованої сполуки Тіоптерину, підтверджується зростанням активності каталази в досліджуваних тканинах.

Важливою ланкою захисту клітини від переокиснення є глутатіонпероксидазна система. За рахунок SH-груп відновленого глутатіону відбувається теж реакція нейтралізації як активних форм кисню, так і спричинених ними вільних радикалів. Система відновленого глутатіону також зумовлює реакції взаємодії із ендо- та екзотоксинами із утворенням парних нетоксичних водорозчинних сполук. які полегшено виводяться органами виділення [202].

Як показали наші дослідження в умовах інтоксикації тетрахлорметаном, вміст вільних SH-груп різко зменшувався, що узгоджується із даними інших авторів і додатково свідчить про нагромадження вільних радикалів, ендотоксинів та порушення білоксинтезувальної функції печінки [203].

У таблиці 4.5 показано, що токсичне ураження печінки щурів II групи (контроль) супроводжується зниженням рівня GSH у 2,3 рази. При цьому рівень GSSG – був підвищений у 2,4 рази порівняно з інтактною групою. Введення досліджуваних сполук надійно запобігає виснаженню вмісту GSH і зниженню рівня GSSG порівняно з контрольною групою (Табл. 4.5).

Сполука 4.1 (Тіоптерин) була ідентифікована як найбільш активний гепатопротекторний агент. Таким чином, зазначена сполука підвищує вміст GSH на 81,9 % і знижує рівень GSSG на 38,9 % порівняно з нелікованою експериментальною патологією.

Таким чином, збереження тіосульфідного балансу в клітині і, ймовірно, сприяє зменшенню реакційноздатних радикалів і синтезу факторів, які покращують стійкість гепатоцитів. З цієї точки зору антиоксидантна дія метаботропних сполук пов'язана з їх енергозабезпечувальними властивостями.

Далі оцінювали вміст глутатіону (GSH) та дисульфіду глутатіону (GSSG) у гомогенаті печінки щура, оскільки співвідношення вищезгаданих сполук є маркером пошкодження гепатоцитів [204]. Крім того, GSH є одним з найважливіших клітинних окислювально-відновних буферів і протектором окисного стресу.

Таблиця 4.5

Вплив CCl_4 і досліджуваних сполук на відновлений глутатіон (GSH) і окислений глутатіон (GSSG) у гомогенаті печінки (x ± SD, n = 6)

Показник	Експериментальні групи тварин					
	Група 1 (інтакт)	Група II (контроль)	Група IV (сполука 3.1)	Група VI (сполука 4.1)	Група III (сполука 4.3)	Група V сполука 4.5)
GSH, nM/mg Protein	58.2 ± 2,2[a]	24.8 ± 1.0[b]	30.5 ± 1.3[c]	45.1 ± 1.7[d]	27.9 ± 1.2[e]	33.8 ± 1.5[f]
GSSG, nM/mg Protein	2.68 ± 0.12[a]	6.38 ± 0.22[b]	4.90 ± 0.24[c]	3.90 ± 0.16[d]	5.54 ± 0.24[e]	4.57 ± 0.19[cf]

Примітки: значення з різними верхніми індексами в кожному рядку значно відрізняються за процедурою множинного порівняння Тьюкі (P <0,05)

Далі оцінювали вміст глутатіону (GSH) та дисульфіду глутатіону (GSSG) у гомогенаті печінки щура, оскільки співвідношення вищезгаданих сполук є маркером пошкодження гепатоцитів [204]. Крім того, GSH є одним з найважливіших клітинних окислювально-відновних буферів і протектором окисного стресу.

Механізми антиоксидантного захисту включають поглинання активних форм кисню (АФК), оксиду азоту та його похідних, забезпечення ланцюгів перенесення електронів, нейтралізацію токсичних сполук і захист ДНК, ліпідів і білків.

Дослідження показують, що в контрольній групі (група II) щурів токсичне ураження печінки призводить до значного зниження рівня GSH, зокрема в 2,3 рази нижче, ніж у інтактній групі. При цьому рівень GSSG зріс у 2,4 раза. Введення досліджуваних сполук ефективно запобігає такому виснаженню GSH і знижує рівні GSSG порівняно з контрольною групою, як показано в Рис. 4.22.

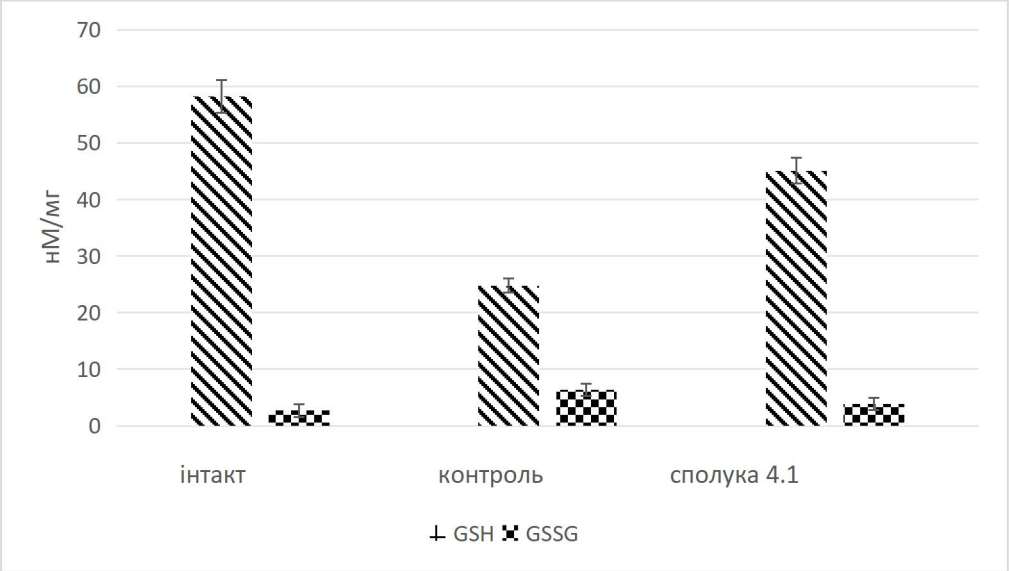


Рисунок 4.22 – Порівняння показників сполуки 4.1 (ТІОПТЕРИН) відносно групи інтакт та крупи контроль

Серед протестованих сполук сполука 4.1 (DCTP) виявилася найпотужнішим гепатопротекторним агентом. Отже, він допомагає підтримувати тіол-дисульфідний баланс у клітинах, ймовірно, сприяючи зменшенню реактивних радикалів і сприяючи синтезу факторів, які підвищують стійкість гепатоцитів. З цієї точки зору, антиоксидантна дія метаботропних сполук пов’язана з їх енергозабезпечувальними властивостями.

Висновки до розділу 4

1. Досліджено, що при експериментальному ураженні печінки ТХМ у тварин відбувалося пошкодження клітинних мембран, посилення ПОЛ, підвищення значень АСТ, АЛТ, ЛФ, загального та прямого білірубіну,

тимолової проби. Зрушення, що виникають з боку обміну речовин у печінці, нормалізувалися за допомогою референс препарату ТТЗ. Тіоптерин, похідне птеридину перевершувало дію еталонного розчину Тіотриазоліну за впливом на рівень АСТ, дієнових кон'югатів, основ Шиффа та карбонільованих білків. Гепатопротекторна дія досліджуваної речовини ймовірно обумовлена структурною схожістю з тетрагідрофолієвою кислотою, невід'ємним компонентом окисно-відновних процесів та учасником біосинтезу азотистих основ нуклеотидів, амінокислот.

2. Встановлено, що нормальна гістологія тканин печінки щурів була очевидна у I, III та IV групах. Токсичні ефекти CCl_4 (група II) викликали масивні центральні, перивенулярні та проміжні геморагічні коагуляційні некрози печінкових часточок порівняно з групою інтакт. А так само визначалося безліч жирових крапель, що так само свідчить про розвиток гострого токсичного ураження печінки. В той час як у групи 4 відстежувалось відновлення структур та функцій печінки. Рівень білка Nrf2 та Lipocalin-2 у групі 4 був значно нижчим, ніж у групі 3, що вказує на антиоксидантну дію Тіоптерину, при впливі тетрахлорметанового оксидативного стресу.

3. Виявлено, що у щурів, які отримували для корекції токсичних змін, викликаних введенням тетрахлорметану водний розчин Тіоптерину, структура печінкової часточки повністю не відновлена, проте в порівнянні з контролем і групою щурів, які отримували розчин тіотриазоліну для корекції токсичних змін, визначається відновлення структур гепатоцитів і тканин в цілому

4. Встановлено позитивний вплив сполуки Тіоптерину на показники вільнорадикального окиснення (знижується вміст продуктів ПОЛ: ДК, МД, ШО у гомогенаті та карбонільованих білків у мітохондріях печінки уражених щурів), а також підвищується активність захисно-компенсаторних сил організму, на що вказує підвищення активності ферментативної (каталази, СОД) та неферментативної ланок (відновлений глутатіон) антиоксидантної системи у всіх досліджуваних тканинах. Отриманні результати вказують на

антиоксидантні та гепатопротекторні властивості Тіоптерину, що захищає клітини печінки в умовах вираженого оксидативного стресу.

Результати дослідження, що обговорені у розділі 4, були опубліковані в наступних наукових працях та конференціях:

1. Lohvinenko N., Shvets V., Berest G., Nosulenko I., Voskoboinik O., Severina H., Okovytyy S., Kovalenko S. Prospects for the use of sulfur-containing pteridines in toxic liver damage. Regulatory Mechanisms in Biosystems. 2024; 15(2)., P.374-381. doi:10.15421/022453. (Scopus Q4)

2. Lohvinenko, N.; Shvets, V.; Antypenko, O.; Voskoboinik, O.; Bozhkov, A.; Maslak, H.; Oksenych, V.; Kamyshnyi, O.; Okovytyy, S.; Kovalenko, S. The Application of S-Substituted Pteridine for CCl_4-Induced Acute Hepatitis Treatment in Rats. Biomedicines. 2025; 13, 1276. doi:10.3390/ biomedicines13061276. (Scopus Q1)

3. N. Groma, O. Voskoboinik, V. Shvets. Hepatoprotective activity and toxicity of novel pteridine derivatives. VI Науково-практична internet-конференція з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція». 16 листопада 2023; Харків; 2023. С.43

4. N.V. Lohvinenko, V.M. Shvets, I.V. Dobrodub. Virtual screening of biologically active substances among *S*-containing derivatives of pteridine. Конференція з міжнародною участю “Youth Science - 2024. 17 травня 2024. Вінниця; 2024. С. 7–8

5. Логвіненко Н.В., Швець В.М., Коваленко С.І. Оцінка метаболітотропної дії *S*-птеридинів при експериментальному гепатиті у щурів. ІІ Всеукраїнська науково-практична конференція «Актуальні проблеми та перспективи розвитку природничих, медичних та фармацевтичних наук». 25 квітня 2026; Запоріжжя; 2026.

ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі теоретично обґрунтовано та експериментально досліджено можливість корекції біохімічних і структурно-функціональних порушень печінки за умов гострої тетрахлорметанової інтоксикації новосинтезованими S-заміщеними похідними птеридину. Комплексне застосування методів *in silico, in vitro* та *in vivo* дозволило визначити токсикологічні та біологічні характеристики досліджуваних сполук, виділити сполуку-лідер Тіоптерин (DCTP) та встановити особливості її гепатопротекторної й антиоксидантної дії за умов CCl_4–індукованого гострого гепатиту.

1. Встановлено доцільність комплексного застосування методів *in silico* та *in vitro* для первинного скринінгу *S*-заміщених 6-R^1-7-R^2-2-тіоксо-2,3-дигідроптеридин-4(1H)-онів як потенційних гепатопротекторних сполук. Дослідження гострої токсичності показало, що модифікація тіогрупи птеридинового фрагмента залишками алканкарбонових кислот сприяє зниженню токсичності у 2–4 рази, а одержання водорозчинної солі приводить до її подальшого зменшення. Досліджені речовини за показниками гострої токсичності віднесено до IV–VI класів – малотоксичних, практично нетоксичних або нетоксичних сполук.

2. За результатами *in silico* та *in vitro* досліджень встановлено перспективні біологічні характеристики Тіоптерину (DCTP). Сполука відповідає критеріям «drug-like», не виявляє інгібуючого впливу на CYP2C9, характеризується низькою токсичністю та високою антиоксидантною й антирадикальною активністю, що стало підставою для її подальшого дослідження *in vivo* на моделі токсичного ураження печінки.

3. Досліджено, що моделювання гострого CCl_4–індукованого гепатиту супроводжується розвитком виражених біохімічних і структурно-функціональних порушень печінки. У тварин встановлено пошкодження мембран гепатоцитів, розвиток цитолітичного синдрому, активацію процесів

перекисного окиснення ліпідів та порушення функціонального стану печінки, що проявлялося змінами активності АЛТ, АСТ і лужної фосфатази, вмісту загального та прямого білірубіну, загального білка, альбуміну, сечовини та показників тимолової проби.

4. Виявлена найактивніша сполука Тіоперин (DCTP) з високою гепатопротекторною та антиоксидантною дією, яка є нетоксичною у порівнянні з референс-препратом Тіотріазоліном та перевищує його за ефективністю та терапевтичним індексом.

5. Встановлено виражену гепатопротекторну дію Тіоптерину (DCTP) за умов гострого CCl_4-індукованого гепатиту. Застосування досліджуваної сполуки сприяло обмеженню цитолітичних процесів, нормалізації біохімічних показників та підтриманню білоксинтезувальної і детоксикаційної функцій печінки. Морфологічно дія Тіоптерину супроводжувалася зменшенням вираженості патологічних змін і тенденцією до структурно-функціонального відновлення печінкової тканини.

6. Встановлено, що важливою складовою гепатопротекторної дії Тіоптерину є його вплив на прооксидантно-антиоксидантну рівновагу. Застосування сполуки знижувало вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів - дієнових кон'югатів, малонового діальдегіду та основ Шиффа, а також рівень карбонільованих білків, що свідчить про обмеження інтенсивності вільнорадикального окиснення. За окремими дослідженими показниками, зокрема активністю АСТ, вмістом дієнових кон'югатів, основ Шиффа та карбонільованих білків, дія Тіоптерину була вираженішою порівняно з референтним препаратом Тіотриазоліном.

7. Вперше встановлено, що застосування Тіоптерину посилює захисно-компенсаторні механізми антиоксидантної системи печінки. Під впливом досліджуваної сполуки підвищувалася активність ферментативної ланки антиоксидантного захисту – супероксиддисмутази та каталази та нормалізувався стан неферментативної ланки за участю відновленого глутатіону. Морфологічні та імуногістохімічні результати, зокрема зміни експресії Nrf2 та

Lipocalin-2, узгоджувалися з біохімічними показниками та підтверджували антиоксидантний і гепатопротекторний потенціал Тіоптерину (DCTP).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Dongiovanni P. Meroni, M. New Challenges in the Study of Liver Diseases: From Molecular Pathogenesis to Therapeutic Approaches; Biomedicines. 2025;13:2879. doi:10.3390/biomedicines13122879.

2. Coffin, C.S. Investir dans l'avenir: Formation pour les soins cliniques et la recherche sur les maladies du foie. Can Liver. 2025;8:3–4.

3. Xie P, Ommati MM, Chen D, Chen W, Han L, Zhao X. Sun, P. Hepatotoxic effects of environmentally relevant concentrations of polystyrene microplastics on senescent Zebrafish (Danio rerio): Patterns of stress response and metabolomic alterations. Aquat. Toxicol. 2025;279:107252.

4. Gonfa YH, Bachheti A, Semwal P, Rai N, Singab AN. Bachheti, R.K. Hepatoprotective activity of medicinal plants, their phytochemistry, and safety concerns: A systematic review. Naturforschung. 2025;80:61–73.

5. Tang S, Yan G, Kong L, Sun H, Liu C, Han Y. Wang, X. Research progress on the hepatoprotective effect, pharmacokinetic properties, and hepatotoxicity of geniposide. Acupunct. Herb. Med. 2025;5:136 –146.

6. Alburyhi MM. El-Shaibany, A. Formulation, Development and Evaluation of Plicosepalus Acacia Extract Capsules Delivery System as an Advanced Phytotherapy Approach for Hepatoprotective. World J. Pharm. Res. 2025;14:1309–1334.

7. Lozanova V, Teofanova D, Chakarova B, Rusanov K, Pachedjieva K, Tosheva A. Zagorchev, L. The Antioxidant Properties of Extracts of Cuscuta spp. Depend on the Parasite and the Host Species. Antioxidants. 2025;14:761.

8. Nickrent, D.L. Parasitic Angiosperms: How Often and How Many Taxon. 2020;69:5–27.

9. Bouwmeester H, Sinha N. Scholes, J. Parasitic Plants: Physiology, Development, Signaling, and Ecosystem Interactions. Plant Physiol. 2025;185:1267–1269.

10. De Vega C, Ortiz PL. Arista, M. Host-Driven Phenotypic and Phenological Differentiation in Sympatric Races of a Parasitic Plant. Flora. 2024;320:152617.

11. Ramezan D, Farrokhzad Y, Zargar M, Stybayev G, Kipshakbayeva G. Baitelenova, A. An Insight into Cuscuta campestris as a Medicinal Plant: Phytochemical Variation of Cuscuta Campestris with Various Host Plants. Agriculture. 2023;13:770.

12. Těšitel J, Li A-R, Knotková K, McLellan R, Bandaranayake PCG. Watson, D.M. The Bright Side of Parasitic Plants: What Are They Good For. Plant Physiol. 2021;185:1309–1324.

13. Kurt-Celep I, Yagi S, Dall'Acqua S, Sut S, Celep E, Kaya S, et al. et al. From Parasitic Life to Health-Promoting Applications -A Versatile Goldmine Discovered in Nature's Secret Treasure Chest: Orobanche Nana. Food Biosci. 2024;62:105296.

14. Devarbhavi H, Asrani SK, Arab JP, Nartey YA, Pose E. Kamath, P.S. Global burden of liver disease: 2023 update. J Hepatol. 2023;79(2):516-537. doi:10.1016/j.jhep.2023.03.017.

15. Ugwu CE. Suru, S.M. Medicinal plants with hepatoprotective potentials against carbon tetrachloride-induced toxicity: a review. Egypt Liver Journal. 2021;11:88. doi:10.1186/s43066-021-00161-0.

16. Arman M, Chowdhury KAA, Bari MS, Khan MF, Huq MMA, Haque MA. Capasso, R. Hepatoprotective potential of selected medicinally important herbs: evidence from ethnomedicinal, toxicological and pharmacological evaluations. Phytochem Rev. 2022;21(6):1863-1886. doi:10.1007/s11101-022-09812-5.

17. Daoudi NE. Bnouham, M. Hepatoprotective Essential Oils: A Review. J Pharmacopuncture. 2020;23(3):124-141. doi:10.3831/KPI.2020.23.3.124.

18. Shakya, A.K. Drug-induced Hepatotoxicity and Hepatoprotective Medicinal Plants: A Review. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research. 2020;54(2):234-250. doi:10.5530/ijper.54.2.28.

19. Jain D, Chaudhary P, Kotnala A, Hossain R, Bisht K. Hossain, M.N. Hepatoprotective activity of medicinal plants: A mini review. J Med Plants Stud. 2020;8(5):183-188. doi:10.22271/plants.2020.v8.i5c.1212.

20. Thilagavathi R, Begum SS, Varatharaj SD, Balasubramaniam AK, George JS. Selvam, C. Recent insights into the hepatoprotective potential of medicinal plants and plant-derived compounds. Phytotherapy Research. 2023;37(5):2102-2118. doi:10.1002/ptr.7821.

21. Gonfa YH, Bachheti A, Semwal P, Rai N, Singab AN. Bachheti, R.K. Hepatoprotective activity of medicinal plants, their phytochemistry, and safety concerns: a systematic review. Zeitschrift für Naturforschung C. 2025;80(3-4):61-73. doi:10.1515/znc-2024-0116.

22. Fernández-Martínez E, Bobadilla RA, Morales-Ríos MS, Muriel P. Pérez-Alvarez, V.M. Trans-3-phenyl-2-propenoic acid (cinnamic acid) derivatives: structure-activity relationship as hepatoprotective agents. Medicinal Chemistry. 2007;3(5):475-479. doi:10.2174/157340607781745410.

23. Luo Y, Ma L, Zheng H, Chen L, Li R, He C, et al. Wei, Y. Discovery of (Z)-5-(4- Methoxybenzylidene)thiazolidine-2,4-dione, a Readily Available and Orally Active Glitazone for the Treatment of Concanavalin A-Induced Acute Liver Injury of BALB/c Mice. J Med Chem. 2010;53(1):273-281. doi:10.1021/jm901183d.

24. Chen P, Luo Y, Hai L, Qian S. Wu, Y. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of the aqueous prodrugs of desmethyl anethole trithione with hepatoprotective activity. European Journal of Medicinal Chemistry. 2010;45(7):3005-3010. doi:10.1016/j.ejmech.2010.03.029.

25. Rajasekaran A. Periyasamy, M. Synthesis and evaluation of hepatoprotective activity of some new Mannich bases bearing benztriazole moiety. J. Chil. Chem. Soc. 2010;55(3):366-370. doi:10.4067/S0717-97072010000300021.

26. Sk UH, Sharma AK, Ghosh S. Bhattacharya, S. Synthesis and biological evaluation of novel spiro 6-methoxytetralin-1,3'-pyrrolidine based organoselenocyanates against cadmium-induced oxidative and hepatic damage in mice.

European Journal of Medicinal Chemistry. 2010;45(8):3265-3273. doi:10.1016/j.ejmech.2010.04.001.

27. Wang G, Deng C, Xie C, Ma L, Yang J, Qiu N, et al. Chen, L. Synthesis and biological evaluation of novel dimethyl[1,1'-biphenyl]-2,2'-dicarboxylate derivatives containing thiazolidine-2,4-dione for the treatment of concanavalin A-induced acute liver injury of BALB/c mice. European Journal of Medicinal Chemistry. 2011;46(12):5941-5948. doi:10.1016/j.ejmech.2011.10.005.

28. Ma L, Chen J, Liang X, Xie C, Deng C, Huang L, et al. Chen, L. Synthesis and Evaluation of 5-Benzylidenethiazolidine-2,4-dione Derivatives for the Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Arch. Pharm. Chem. Life Sci. 2012;345(7):517-524. doi:10.1002/ardp.201100413.

29. Goel A, Parihar A, Mishra P, Varshney S, Nag P, Beg M, et al. Rath, S.K. Design and synthesis of novel pyranone-based insulin sensitizers exhibiting in vivo hepatoprotective activity. Med. Chem. Commun. 2013;4:1532-1536. doi:10.1039/C3MD00178D.

30. Liu L, Fan H, Qi P, Mei Y, Zhou L, Cai L, et al. Lin, J. Synthesis and hepatoprotective properties of Acanthus ilicifolius alkaloid A and its derivatives. Experimental and Therapeutic Medicine. 2013;6(3):796-802. doi:10.3892/etm.2013.1189.

31. He T, Wang QY, Shi JZ, Fan TY, Yan C, Huang LJ, et al. Mu, S.Z. Synthesis and the hepatoprotective activity of dibenzocyclooctadiene lignan derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2014;24(7):1808-1811. doi:10.1016/j.bmcl.2014.02.020.

32. Tang C, Gu G, Wang B, Deng X, Zhu X, Qian H. Huang, W. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Andrographolide Derivatives as Potent Hepatoprotective Agents. Chem Biol Drug Des. 2014;83(3):324-333. doi:10.1111/cbdd.12246.

33. Ibrahim MM, Ramadan AMM, El-Sheshtawy HS, Mohamed MA, Soliman M. Zayed, S.I.M. Synthesis, characterization and medical efficacy (hepatoprotective and antioxidative) of albendazole-based copper(II) complexes – an experimental and

theoretical approach. Journal of Coordination Chemistry. 2015;68(24):4296-4313. doi:10.1080/00958972.2015.1093124.

34. Bhakuni GS, Bedi O, Bariwal J. Kumar, P. Hepatoprotective Activity of Morin and its Semi-Synthetic Derivatives Against Alcohol Induced Hepatotoxicity in Rats. Indian J Physiol Pharmacol. 2017;61(2):175-190.

35. Burle S. Samanta, S. Insilico Design, Synthesis of Hybrid Taurine Amino Acid and Peptide Analogues for Studies on Antioxidant and Hepatoprotective Activity. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research. 2017;51(2s):S98-S109. doi:10.5530/ijper.51.2s.55.

36. Keshari AK, Singh AK, Kumar U, Raj V, Rai A, Kumar P, et al. Saha, S. 5H-benzo[h]thiazolo[2,3-b]quinazolines ameliorate NDEA-induced hepatocellular carcinogenesis in rats through IL-6 downregulation along with oxidative and metabolic stress reduction. Drug Design, Development and Therapy. 2017;11:2981-2995. doi:10.2147/DDDT.S143075.

37. Chu F, Zhang W, Guo W, Wang Z, Yang Y, Zhang X, et al. Lei, H. Oleanolic Acid-amino Acids Derivatives: Design, Synthesis, and Hepatoprotective Evaluation In Vitro and In Vivo. Molecules. 2018;23(2):322. doi:10.3390/molecules23020322.

38. Han H, Li Z, Gao Z, Yin X, Dong P, Yang B. Kuang, H. Synthesis and biological evaluation of picroside derivatives as hepatoprotective agents. Natural Product Research. 2019;33(19):2845-2850. doi:10.1080/14786419.2018.1508143.

39. Abu-Melha S, Edrees MM, Salem HH, Kheder NA, Gomha SM. Abdelaziz, M.R. Synthesis and Biological Evaluation of Some Novel Thiazole-Based Heterocycles as Potential Anticancer and Antimicrobial Agents. Molecules. 2019;24(3):539. doi:10.3390/molecules24030539.

40. Bhat MA, Al-Omar MA, Khan AA, Alanazi AM. Naglah, A.M. Synthesis and antihepatotoxic activity of dihydropyrimidinone derivatives linked with 1,4-benzodioxane. Drug Design, Development and Therapy. 2019;13:2393-2404. doi:10.2147/DDDT.S198865.

41. Kapelle IBD, Manalu W. Souhoka, F.A. Effect of curcumin analogue synthetic product from cullilawan oil for the liver damage treatment in male mice (Mus musculus L.). J Basic Clin Physiol Pharmacol. 2020;30(6):20190241. doi:10.1515/jbcpp-2019-0241.

42. Liu C, Yuan C, Ramaswamy HS, Ren Y. Ren, X. Antioxidant capacity and hepatoprotective activity of myristic acid acylated derivative of phloridzin. Heliyon. 2019;5(5):e01761. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e01761.

43. Shao L, Bai Y, Wang Q, Chen Z, Xie Y. Bian, X. Design, synthesis and evaluation of 5-(4-hydroxyphenyl)-3H-1,2-dithiole-3-thione-based fibrates as potential hypolipidemic and hepatoprotective agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2019;29(23):126723. doi:10.1016/j.bmcl.2019.126723.

44. Zhao Y, Cao Y, Chen H, Zhuang F, Wu C, Yoon G, et al. Cheon, S.H. Synthesis, biological evaluation, and molecular docking study of novel allyl-retrochalcones as a new class of protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2019;27(6):963-977. doi:10.1016/j.bmc.2019.01.034.

45. Xu R, Qiu S, Zhang J, Liu X, Zhang L, Xing H, et al. Zhu, J. Silibinin Schiff Base Derivatives Counteract CCl4-Induced Acute Liver Injury by Enhancing Anti-Inflammatory and Antiapoptotic Bioactivities. Drug Design, Development and Therapy. 2022;16:1441-1456. doi:10.2147/DDDT.S356847.

46. Attaullah M, Ullah A, Hussain M, Zahoor M, Ullah R, Ali EA, et al. Jan, A. Antioxidant, hepatoprotective & nephroprotective potential of a novel synthetic compound 2',3'-dihydroxybenzylidene in paracetamol intoxicated rats. Heliyon. 2023;9(12):e22676. doi:10.1016/j.heliyon.2023.e22676.

47. Qayyum MI, Ullah S. Obaidullah; Rashid, U.; Mahnashi, M.H.; Alshahrani, M.M.; Al Ali, A.; Asiri, A.; Al Awadh, A.A.; Alshehri, O.M.; Sadiq, A. Design, synthesis and preclinical evaluations of (S)-2-((S)-1-benzyl-2,5- dioxopyrrolidin-3-yl)-3-(4-isopropylphenyl)-2-methylpropanal (succ-5) as cardioprotective, hepatoprotective and lipid lowering molecule: in-vivo and in-silico approaches. Arabian Journal of Chemistry. 2023;16(2):104504. doi:10.1016/j.arabjc.2022.104504.

48. Mhaidat I, Tahat L, Alomari G, AL-Quraan L, Gharaibeh A. Al-Trad, B. The Hepatoprotective Effect of a Newly Synthesized 5-mercapto-1,2,4-triazole Derivative based on Nalidixic Acid against CCl4 induced Oxidative Stress in Mice. Letters in Drug Design & Discovery. 2024;21(17):3823-3829. doi:10.2174/0115701808294306240613104855.

49. Sonawane G, Sharma S. Gilhotra, R. Synthesis, Characterization and Pharmacological Screening of 1,3,4-Oxadiazoles. Asian Journal of Chemistry. 2024;36(6):1436-1446. doi:10.14233/ajchem.2024.31776.

50. Lv M, Guo S, Huang C, Lu Z, Li Y, Li Y, et al. Li, Z. Design, Synthesis, and Mechanistic Evaluation of L-Theanine Derivatives Targeting Cathepsin D for Anti-Hepatic Fibrosis. Journal of Medicinal Chemistry. 2026;69(4):4493-4511. doi:10.1021/acs.jmedchem.5c03096.

51. Amin, Z.A. Synthesis, molecular docking, and protective effect of novel thiohydantoin derivative: (Z)-5-(pyridin-2-ylmethylene)-2-thioxothiazolidin-4-one in a diethynitrosamine model of hepatotoxicity. Journal of Molecular Structure. 2023;1288:135735. doi:10.1016/j.molstruc.2023.135735.

52. Kazunin MS, Groma NV, Nosulenko IS, Kinichenko AO, Antypenko OM, Shvets VM, et al. Kovalenko, S.I. Thio-containing pteridines: Synthesis, modification, and biological activity. Arch. Pharm. Chem. Life Sci. 2022;355(12):e2200252. doi:10.1002/ardp.202200252.

53. Groma N, Berest G, Antypenko O, Voskoboinik O, Kopiika V, Kovalenko S. Shvets, V. Evaluation of the toxicity and hepatoprotective properties of new S-substituted pteridins. Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences. 2023;36(1):21-26. doi:10.2478/cipms-2023-0006.

54. Banerjee P, Eckert AO, Schrey AK. Preissner, R. ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. Nucleic Acids Res. 2018;46(W1):W257-W263. doi:10.1093/nar/gky318. .

55. SwissADME. Available from: http://www.swissadme.ch/index.php# [cited 27 October 2024].

56. Daina A, Michielin O. Zoete, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. Sci Rep. 2017;7:42717. doi:10.1038/srep42717.

57. Daina A, Michielin O. Zoete, V. iLOGP: A Simple, Robust, and Efficient Description of n-Octanol/Water Partition Coefficient for Drug Design Using the GB/SA Approach. Journal of Chemical Information and Modeling. 2014;54(12):3284-3301. doi:10.1021/ci500467k.

58. Daina A. Zoete, V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. ChemMedChem. 2016;11(11):1117-1121. doi:10.1002/cmdc.201600182.

59. Skerratt SE, De Groot MJ. Phillips, C. Discovery of a novel binding pocket for CYP2C9 inhibitors: crystallography, pharmacophore modelling and inhibitor SAR. MedChemComm. 2016;7:813-819. doi:10.1039/C6MD00011H.

60. Trott O. Olson, A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. J. Comput. Chem. 2010;31(2):455-461. doi:10.1002/jcc.21334.

61. BIOVIA Discovery Studio Visualizer v19.1.0.18287. Accelrys Software Inc. 2019. Available from: https://www.3dsbiovia.com.

62. Kedare SB. Singh, R.P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. Journal of Food Science and Technology. 2011;48(4):412-422. doi:10.1007/s13197-011-0251-1.

63. Vlachou E-EN, Pontiki E, Hadjipavlou-Litina DJ. Litinas, K.E. Synthesis and Biological Evaluation of Substituted Fused Dipyranoquinolinones. Organics. 2023;4(3):364-385. doi:10.3390/org4030027.

64. Kozhem'yakin YuM, Khromov OS. Filonenko, M.A. Scientific and practical recommendations for the development of laboratory creatures and robots. Kyiv: Avitsena, 2002; 156 p.

65. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. European Treaty Series. 1986;No. 123. Strasbourg: Council of Europe.

66. Stefanov, O.V., editor. Preclinical study of drugs: methodical recommendations. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації. Kyiv: Avitsena, 2001. Ukrainian.

67. Prozorovskiy VB, Prozorovskaya MP. Demchenko, V.M. Express method for determining the average effective dose and its errors. Farmakol Toxicol. 1978;41(4):497-502.

68. Bhakuni GS, Bedi O, Bariwal J, Deshmukh R. Kumar, P. Animal models of hepatotoxicity. Inflamm. Res. 2016;65(1):13-24. doi:10.1007/s00011-015-0883-0.

69. Recknagel RO. Ghoshal, A.K. Quantitative estimation of peroxidative degeneration of rat liver microsomal and mitochondrial lipids after carbon tetrachloride poisoning. Experimental and Molecular Pathology. 1966;5(5):413-426. doi:10.1016/0014-4800(66)90023-2.

70. Mazur NA, Voloshyn NA, Chekman IS. et al. Thiotriazolin: pharmacological aspects and clinical application. Zaporozhye, 2005; 160 p.

71. Lohvinenko N, Shvets V, Antypenko O, Voskoboinik O, Bozhkov A, Maslak H, et al. Kovalenko, S. The Application of S-Substituted Pteridine for CCl4-Induced Acute Hepatitis Treatment in Rats. Biomedicines. 2025;13(6):1276. doi:10.3390/biomedicines13061276.

72. Vlizlo VV. et al. Laboratory research methods in biology, animal husbandry and veterinary medicine: handbook. Lviv: Spolom, 2012; 764 p.

73. Bakkum EA, Trimbos JB. Trimbos-Kemper, T.C.M. Postsurgical adhesion formation and prevention – recent developments with regard to the consecutive stages in adhesion formation. Reproductive Medicine Review. 1996;5(1):37-49. doi:10.1017/S0962279900001228.

74. Müller G, Frühauf A. Mathias, B. Thiobarbitursäure-positive Substanzen als Indikatoren der Lipidperoxidation. Z. Gesamte Inn. Med. 1986;41(24):673-676. .

75. Koroliuk MA, Ivanova LI, Maiorova IG. Tokarev, V.E. A method of determining catalase activity. Lab Delo. 1988;1:16-19. .

76. Kostiuk, V.A. A simple and sensitive method of determination of superoxide dismutase activity based on the reaction of quercetin oxidation. Vopr. Med. Khim. 1990;36(2):88-91. .

77. Akagawa, M. Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches. Free Radic. Res. 2021;55(4):307-320. doi:10.1080/10715762.2020.1851027.

78. Bergmeyer HU, Hørder M. Rej, R. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Scientific Committee, Analytical Section: approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3. IFCC method for alanine aminotransferase (L-alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.2). J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1986;24(7):481-495. .

79. Berg JM, Tymoczko JL. Stryer, L. Biochemistry. 5th ed. New York: W. H. Freeman; 2002; 974 p.

80. Schumann G, Klauke R, Canalias F, Bossert-Reuther S, Franck PFH, Gella F-J, et al. Ceriotti, F. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. Part 9: Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alkaline phosphatase. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2011;49(9):1439-1446. doi:10.1515/cclm.2011.621.

81. Young, D.S. Effects of Disease on Clinical Laboratory Tests. 4th ed. Washington, DC: AACC Press, 2001.

82. King EJ. Delory, G.E. Ascorbic acid and phosphatase activity. Biochemical Journal. 1938;32(7):1157-1162. doi:10.1042/bj0321157.

83. Jendrassik L. Gróf, P. Vereinfachte photometrische Methoden zur Bestimmung des Blutbilirubins. Biochem. Z. 1938;297:81-89.

84. Gutmann I. Bergmeyer, H.U. Lactate dehydrogenase. In: Bergmeyer, H.U., editor. Methods of Enzymatic Analysis. 2nd ed. New York: Academic Press, 1974; pp. 1794-1798.

85. Rifai N, Horvath AR. Wittwer, C.T., editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 6th ed. St. Louis, MO: Elsevier; 2018; 1867 p.

86. Burtis CA, Ashwood ER. Bruns, D.E., editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 4th ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2005.

87. Gornall AG, Bardawill CJ. David, M.M. Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. J. Biol. Chem. 1949;177(2):751-766. doi:10.1016/S0021-9258(18)57021-6. .

88. Karmen A, Wróblewski F. LaDue, J.S. Transaminase activity in human blood. J. Clin. Invest. 1955;34(1):126-131. doi:10.1172/JCI103055.

89. Young, D.S. Effects of Disease on Clinical Laboratory Tests. 4th ed. Washington, DC: AACC Press, 2001.

90. King EJ. Delory, G.E. Ascorbic acid and phosphatase activity. Biochemical Journal. 1938;32(7):1157-1162. doi:10.1042/bj0321157.

91. Rice-Evans CA, Diplock AT. Symons, M.C.R. Techniques in Free Radical Research. Amsterdam: Elsevier, 1991; 290 p. ISBN: 9780444813145

92. Müller G, Frühauf A. Mathias, B. Thiobarbitursäure-positive Substanzen als Indikatoren der Lipidperoxidation. Z. Gesamte Inn. Med. 1986;41(24):673-676. .

93. Levine RL. Stadtman, E.R. Oxidative Modification of Proteins During Aging. Exp. Gerontol. 2001;36(9):1495-1502. doi:10.1016/S0531-5565(01)00135-8.

94. Akagawa, M. Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches. Free Radic. Res. 2021;55(4):307-320. doi:10.1080/10715762.2020.1851027.

95. Kostiuk, V.A. A simple and sensitive method of determination of superoxide dismutase activity based on the reaction of quercetin oxidation. Vopr. Med. Khim. 1990;36(2):88-91. .

96. Rahman I, Kode A. Biswas, S.K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. Nature Protocols. 2006;1(6):3159-3165. doi:10.1038/nprot.2006.378.

97. Vairetti M, Di Pasqua LG, Cagna M, Richelmi P, Ferrigno A. Berardo, C. Changes in Glutathione Content in Liver Diseases: An Update. Antioxidants. 2021;10(3):364. doi:10.3390/antiox10030364.

98. Lohvinenko N, Shvets V, Antypenko O, Voskoboinik O, Bozhkov A, Maslak H, et al. Kovalenko, S. The Application of S-Substituted Pteridine for CCl4-Induced Acute Hepatitis Treatment in Rats. Biomedicines. 2025;13(6):1276. doi:10.3390/biomedicines13061276.

99. Best, F. Über Karminfärbung des Glykogens und der Kerne. Z. Wiss. Mikrosk. 1906;23:319-322.

100. Borkham-Kamphorst E, Kovalenko E. van Roeyen, C.R.C.; Gassler, N.; Bomble, M.; Ostendorf, T.; Floege, J.; Gressner, A.M.; Weiskirchen, R. Platelet-Derived Growth Factor Isoform Expression in Carbon Tetrachloride-Induced Chronic Liver Injury. Lab. Investig. 2008;88(10):1090-1100. doi:10.1038/labinvest.2008.71.

101. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA. Bacon, B.R. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Proposal for Grading and Staging the Histological Lesions. American Journal of Gastroenterology. 1999;94(9):2467-2474. doi:10.1111/j.1572-0241.1999.01377.x.

102. Milstien, Sheldon, Gregory Kapatos, Robert A. Levine, and Barry Shane Chemistry and Biology of Pteridines and Folates. Boston, MA: Springer US, 2002; ISBN 9781461353171. doi:10.1007/978-1-4615-0945-5.

103. Pontiki E, Hadjipavlou-Litina D, Patsilinakos A, Tran TM. Marson, C.M. Pteridine-2,4-diamine derivatives as radical scavengers and inhibitors of lipoxygenase that can possess anti-inflammatory properties. Future Medicinal Chemistry. 2015;7(14):1937-1951. doi:10.4155/fmc.15.111.

104. ProTox-II – Prediction of Toxicity of Chemicals. ProTox-II. Available from: https://tox.charite.de/protox_II [cited 11 May 2022].

105. Yousefi-Manesh H, Shirooie S, Partoazar A, Nikoui V, Estakhri MR. Bakhtiarian, A. Hepatoprotective effects of phosphatidylserine liposomes on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. J. Cell. Biochem. 2019;120(7):11853-11858. doi:10.1002/jcb.28464.

106. Hodgson, E. A Textbook of Modern Toxicology. 4th ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2011.

107. Christopher A. Lipinski, Franco Lombardo, Beryl W. Dominy, Paul J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Advanced Drug Delivery Reviews. Volume 23. 1997;(1–3): 3-25. doi:10.1016/S0169-409X(96)00423-1.

108. Kato, H. Computational prediction of cytochrome P450 inhibition and induction. Drug Metabolism and Pharmacokinetics. 2020;35(1):30-44. doi:10.1016/j.dmpk.2019.11.006.

109. Ogu CC. Maxa, J.L. Drug interactions due to cytochrome P450. Baylor University Medical Center Proceedings. 2000;13(4):421-423. doi:10.1080/08998280.2000.11927719.

110. McMasters DR, Torres RA, Crathern SJ, Dooney DL, Nachbar RB, Sheridan RP. Korzekwa, K.R. Inhibition of recombinant cytochrome P450 isoforms 2D6 and 2C9 by diverse drug-like molecules. Journal of Medicinal Chemistry. 2007;50(14):3205-3213. doi:10.1021/jm0700060.

111. Skerratt SE. de Groot, M.J.; Phillips, C. Discovery of a novel binding pocket for CYP2C9 inhibitors: crystallography, pharmacophore modelling and inhibitor SAR. MedChemComm. 2016;7(5):813-819. doi:10.1039/C6MD00011H.

112. Tomšíková H, Tomšík P, Solich P. Nováková, L. Determination of pteridines in biological samples with an emphasis on their stability. Bioanalysis. 2013;5(18):2307-2326. doi:10.4155/bio.13.194.

113. Kedare SB. Singh, R.P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. Journal of Food Science and Technology. 2011;48(4):412-422. doi:10.1007/s13197-011-0251-1.

114. Milstien S, Kapatos G, Levine RA. Shane, B., editors. Chemistry and Biology of Pteridines and Folates. Boston, MA: Springer, 2001; 677 p. doi:10.1007/978-1-4615-0945-5.

115. Carmona-Martínez V, Ruiz-Alcaraz AJ, Vera M, Guirado A, Martínez-Esparza M. García-Peñarrubia, P . Therapeutic potential of pteridine derivatives: A comprehensive review. Medicinal Research Reviews. 2019;39(2):461-516. doi:10.1002/med.21529.

116. Chauhan PMS, Martins CJA. Horwell, D.C. Syntheses of novel heterocycles as anticancer agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2005;13(10):3513-3518. doi:10.1016/j.bmc.2005.02.055.

117. Geng PF, Wang CC, Li ZH, Hu XN, Zhao TQ, Fu DJ, et al. Liu, H.M. Design, synthesis and preliminary biological evaluation of 5,8- dihydropteridine-6,7-diones that induce apoptosis and suppress cell migration. European Journal of Medicinal Chemistry. 2018;143:1959-1967. doi:10.1016/j.ejmech.2017.11.009.

118. Walters I, Austin C, Austin R, Bonnert R, Cage P, Christie M, et al. Robinson, D. Evaluation of a series of bicyclic CXCR2 antagonists. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2008;18(2):798-803. doi:10.1016/j.bmcl.2007.11.039.

119. Guiney D, Gibson CL. Suckling, C.J. Syntheses of highly functionalised 6-substituted pteridines. Organic & Biomolecular Chemistry. 2003;1(4):664-675. doi:10.1039/B211564F.

120. Ghoneim AA, Elkanzi NAA. Bakr, R.B. Synthesis and studies molecular docking of some new thioxobenzo[g]pteridine derivatives and 1,4- dihydroquinoxaline derivatives with glycosidic moiety. Journal of Taibah University for Science. 2018;12(6):774-782. doi:10.1080/16583655.2018.1510163.

121. Xiang D, Magana D. Dyer, R.B. CO2 Reduction Catalyzed by Mercaptopteridine on Glassy Carbon. J. Am. Chem. Soc. 2014;136(40):14007-14010. doi:10.1021/ja5081103.

122. Savéant J-M. Tard, C. Attempts To Catalyze the Electrochemical CO2-to-Methanol Conversion by Biomimetic 2e− + 2H+ Transferring Molecules. J. Am. Chem. Soc. 2016;138(3):1017-1021. doi:10.1021/jacs.5b12138.

123. Kazunin MS, V oskoboynik OY, Nosulenko IS, Berest GG, Sergeieva TY, Okovytyy SI, et al. Kovalenko, S.I. Synthesis and anti-inflammatory activity of 2-alkylthio-6-R-pteridin-4(3H)-ones. J. Heterocyclic Chem. 2018;55(4):1033-1041. doi:10.1002/jhet.3135.

124. Kazunin MS, V oskoboynik OY, Nosulenko IS, Berest GG, Kholodniak SV, Pryymenko BO. Kovalenko, S.I. Synthesis and antimicrobial activity of S-alkyl derivatives of pteridine-2-thiones. J. Heterocyclic Chem. 2020;57(1):268-280. doi:10.1002/jhet.3774.

125. Kazunin MS, Voskoboynik OY, Shatalova OM, Maloshtan LN. Kovalenko, S.I. Amides of substituted 3-(pteridin-6-yl)propanoic acids. Chem. Heterocycl. Compds. 2019;55(4-5):408-415. doi:10.1007/s10593-019-02473-x.

126. Breitmaier, E. Structure Elucidation by NMR in Organic Chemistry: A Practical Guide. 3rd ed. Chichester: Wiley, 2002; 272 p.

127. Carruthers W. Coldham, I. Modern Methods of Organic Synthesis. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2004; 493 p.

128. Garattini S, Bizzi A, Donelli MG, Guaitani A, Samanin R. Spadacini, F. Anorexia and cancer in animals and man. Cancer Treat. Rev. 1980;7(2):115-140.

129. Gäbele E, Froh M, Arteel GE, Uesugi T, Hellerbrand C, Schölmerich J, et al. Rippe, R.A. TNFα is required for cholestasis-induced liver fibrosis in the mouse. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2009;378(3):348-353. doi:10.1016/j.bbrc.2008.10.155.

130. Kadir FA, Kassim NM, Abdulla MA. Yehye, W.A. Hepatoprotective Role of Ethanolic Extract of Vitex negundo in Thioacetamide- Induced Liver Fibrosis in Male Rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013;2013:739850. doi:10.1155/2013/739850.

131. Asahina K, Zhou B, Pu WT. Tsukamoto, H. Septum transversum- derived mesothelium gives rise to hepatic stellate cells and perivascular mesenchymal cells in developing mouse liver. Hepatology. 2011;53(3):983-995. doi:10.1002/hep.24119.

132. Winters NI, Thomason RT. Bader, D.M. Identification of a novel developmental mechanism in the generation of mesothelia. Development. 2012;139(16):2926-2934. doi:10.1242/dev.082396.

133. Rinkevich Y, Mori T, Sahoo D, Xu PX. Bermingham, J.R., Jr.; Weissman, I.L. Identification and prospective isolation of a mesothelial precursor lineage giving rise to smooth muscle cells and fibroblasts for mammalian internal organs, and their vasculature. Nat. Cell Biol. 2012;14(12):1251-1260. doi:10.1038/ncb2610.

134. Karki S, Surolia R, Hock TD, Guroji P, Zolak JS, Duggal R, et al. Antony, V.B. Wilms' tumor 1 (Wt1) regulates pleural mesothelial cell plasticity and transition into myofibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. FASEB J. 2014;28(3):1122-1131. doi:10.1096/fj.13-236828.

135. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmoulière A, Varga J, et al. Gabbiani, G. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. Am. J. Pathol. 2012;180(4):1340-1355. doi:10.1016/j.ajpath.2012.02.004.

136. Aroeira LS, Aguilera A, Sánchez-Tomero JA, Bajo MA. del Peso, G.; Jiménez-Heffernan, J.A.; Selgas, R.; López-Cabrera, M. Epithelial to mesenchymal transition and peritoneal membrane failure in peritoneal dialysis patients: pathologic significance and potential therapeutic interventions. J. Am. Soc. Nephrol. 2007;18(7):2004-2013. doi:10.1681/ASN.2006111292.

137. Devuyst O, Margetts PJ. Topley, N. The pathophysiology of the peritoneal membrane. J. Am. Soc. Nephrol. 2010;21(7):1077-1085. doi:10.1681/ASN.2009070694.

138. Llewellyn J, Fede C, Loneker AE, Friday CS, Hast MW, Theise ND, et al. Wells, R.G. Glisson's capsule matrix structure and function is altered in patients with cirrhosis irrespective of aetiology. JHEP Reports. 2023;5(9):100760. doi:10.1016/j.jhepr.2023.100760.

139. Stecco C, Sfriso MM, Porzionato A, Rambaldo A, Albertin G, Macchi V. De Caro, R. Microscopic anatomy of the visceral fasciae. Journal of Anatomy. 2017;231(1):121-128. doi:10.1111/joa.12617.

140. Federative Committee on Anatomical Terminology. Terminologia Anatomica: International Anatomical Terminology. Stuttgart: Thieme, 1998.

141. Benias PC, Wells RG, Sackey-Aboagye B, Klavan H, Reidy J, Buonocore D, et al. Theise, N.D. Structure and Distribution of an Unrecognized Interstitium in Human Tissues. Scientific Reports. 2018;8(1):4947. doi:10.1038/s41598-018-23062-6.

142. Hayashi S, Murakami G, Ohtsuka A, Itoh M, Nakano T. Fukuzawa, Y. Connective tissue configuration in the human liver hilar region with special reference to the liver capsule and vascular sheath. Journal of Hepato-Biliary- Pancreatic Surgery. 2008;15(6):640-647. doi:10.1007/s00534-008-1336-8.

143. Wang J. Kubes, P. A Reservoir of Mature Cavity Macrophages that Can Rapidly Invade Visceral Organs to Affect Tissue Repair. Cell. 2016;165(3):668-678. doi:10.1016/j.cell.2016.03.009.

144. Wagner BA, Venkataraman S. Buettner, G.R. The rate of oxygen utilization by cells. Free Radical Biology and Medicine. 2011;51(3):700-712. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.024.

145. Acharya P, Chouhan K, Weiskirchen S. Weiskirchen, R. Cellular mechanisms of liver fibrosis. Frontiers in Pharmacology. 2021;12:671640. doi:10.3389/fphar.2021.671640.

146. Guilliams M, Bonnardel J, Haest B, Vanderborght B, Wagner C, Remmerie A, et al. Scott, C.L. Spatial proteogenomics reveals distinct and evolutionarily conserved hepatic macrophage niches. Cell. 2022;185(2):379-396.e38. doi:10.1016/j.cell.2021.12.018.

147. Xu S, Kang CH, Gou X, Peng Q, Yan J, Zhuo S, et al. Simpson, M.J. Quantification of liver fibrosis via second harmonic imaging of the Glisson's capsule from liver surface. Journal of Biophotonics. 2016;9(4):351-363. doi:10.1002/jbio.201500001.

148. Balog S, Li Y, Ogawa T, Miki T, Saito T, French SW. Asahina, K. Development of capsular fibrosis beneath the liver surface in humans and mice. Hepatology. 2020;71(1):291-305. doi:10.1002/hep.30809.

149. Guilliams M, Bonnardel J, Haest B, Vanderborght B, Wagner C, Remmerie A, et al. Scott, C.L. Spatial proteogenomics reveals distinct and evolutionarily conserved hepatic macrophage niches. Cell. 2022;185(2):379-396.e38. doi:10.1016/j.cell.2021.12.018.

150. Li Y, Wang J. Asahina, K. Mesothelial cells give rise to hepatic stellate cells and myofibroblasts via mesothelial–mesenchymal transition in liver injury. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2013;110(6):2324-2329. doi:10.1073/pnas.1214136110.

151. Hammoutene A, Laouirem S, Albuquerque M, Colnot N, Brzustowski A, Valla D, et al. QUID-NASH Research Group. A new NRF2 activator for the treatment of human metabolic dysfunction-associated fatty liver disease. JHEP Reports. 2023;5(10):100845. doi:10.1016/j.jhepr.2023.100845.

152. Zhou J, Zheng Q. Chen, Z. The Nrf2 Pathway in Liver Diseases. Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2022;10:826204. doi:10.3389/fcell.2022.826204.

153. Tebay LE, Robertson H, Durant ST, Vitale SR, Penning TM, Dinkova-Kostova AT. Hayes, J.D. Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease. Free Radical Biology and Medicine. 2015;88(Pt B):108-146. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.021.

154. An HS, Yoo JW, Jeong JH, Heo M, Hwang SH, Jang HM, et al. Roh, G.S. Lipocalin-2 promotes acute lung inflammation and oxidative stress by enhancing macrophage iron accumulation. International Journal of Biological Sciences. 2023;19(4):1163-1177. doi:10.7150/ijbs.79915.

155. Ghosh A, Onsager C, Mason A, Arriola L, Lee W. Mubayi, A. The role of oxygen intake and liver enzyme on the dynamics of damaged hepatocytes: Implications to ischaemic liver injury via a mathematical model. PLoS One. 2021;16(4):e0230833. doi:10.1371/journal.pone.0230833.

156. Radchenko O, Komarytsia O, Borovets M, Ivasivka R. Guta, R. Proinflammatory interleukins 2, 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with hypertension and diabetes mellitus depending on the presence of metabolic-associated liver steatosis. International Journal of Endocrinology (Ukraine). 2024;20(3):200-203. doi:10.22141/2224-0721.20.3.2024.1389.

157. Fuertes-Agudo M, Luque-Tévar M, Cucarella C, Martín-Sanz P. Casado, M. Advances in Understanding the Role of NRF2 in Liver Pathophysiology and Its Relationship with Hepatic-Specific Cyclooxygenase-2 Expression. Antioxidants. 2023;12(8):1491. doi:10.3390/antiox12081491.

158. Frank D, Savir S, Gruenbaum BF, Melamed I, Grinshpun J, Kuts R, et al. Boyko, M. Inducing Acute Liver Injury in Rats via Carbon Tetrachloride (CCl4) Exposure Through an Orogastric Tube. J. Vis. Exp. 2020;158:e60695. doi:10.3791/60695. .

159. Wang M, Niu J, Ou L, Deng B, Wang Y. Li, S. Zerumbone Protects against Carbon Tetrachloride (CCl4)-Induced Acute Liver Injury in Mice via Inhibiting Oxidative Stress and the Inflammatory Response: Involving the TLR4/NF-κB/COX-2 Pathway. Molecules. 2019;24(10):1964. doi:10.3390/molecules24101964.

160. Groma N, Berest G, Antypenko O, Voskoboinik O, Kopiika V, Kovalenko S. Shvets, V. Evaluation of the toxicity and hepatoprotective properties of new S-substituted pteridins. Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences. 2023;36(1):21-26. doi:10.2478/cipms-2023-0006.

161. Lohvinenko N, Shvets V, Antypenko O, Voskoboinik O, Bozhkov A, Maslak H, et al. Kovalenko, S. The Application of S-Substituted Pteridine for CCl4-Induced Acute Hepatitis Treatment in Rats. Biomedicines. 2025;13(6):1276. doi:10.3390/biomedicines13061276.

162. Lohvinenko N, Shvets V, Berest G, Nosulenko I, Voskoboinik O, Severina H, et al. Kovalenko, S. Prospects for the use of sulfur-containing pteridines in toxic liver damage. Regulatory Mechanisms in Biosystems. 2024;15(2):374-381. doi:10.15421/022453.

163. Mao J, Tan L, Tian C, Wang W, Zhang H, Zhu Z. Li, Y. Research progress on rodent models and its mechanisms of liver injury. Life Sciences. 2024;337:122343. doi:10.1016/j.lfs.2023.122343.

164. Student VO, Hladkykh FV, Liadova TI. Matvieienko, M.S. Особливості білкового обміну при німесулід-індукованому ураженні печінки та його відновлення під впливом безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів. Науковий вісник Ужгородського університету. Серія «Медицина». 2026;1(73):49-58.

165. Mazurkevych AY, Zoltan NI, Maliuk MO, Danilov VB, Kovpak VV. Kharkevych, Y.O. Зміна біохімічних показників сироватки крові щурів при експериментальному хронічному токсичному гепатиті. Біологія тварин. 2012;14(1-2):334-340.

166. Korylchuk, T.B. Порушення антиоксидантної, імунної і детоксикаційної систем організму за умов експериментальної печінково-ниркової недостатності та шляхи їх корекції. Dissertation, 2007.

167. Papadia FS, Marinari GM, Camerini G, Murelli F, Carlini F, Stabilini C. Scopinaro, N. Liver damage in severely obese patients: a clinical- biochemical-morphologic study on 1,000 liver biopsies. Obes. Surg. 2004;14(7):952-958. doi:10.1381/0960892041719644.

168. Opoku AR, Ndlovu IM, Terblanche SE. Hutchings, A.H. In vivo hepatoprotective effects of Rhoicissus tridentata subsp. cuneifolia, a traditional Zulu medicinal plant, against CCl4-induced acute liver injury in rats. South African Journal of Botany. 2007;73(3):372-377. doi:10.1016/j.sajb.2007.02.193.

169. Kanikovskyi OY, Karyi YV, Dovgan IP, Chereshniuk IL. Shypitsyna, O.V. Characterization of morphological disorders of the liver depending on the bilirubin count in patients with obstructive jaundice. Reports of Vinnytsia National Medical University. 2024;28(3):379-382. doi:10.31393/reports-vnmedical-2024-28(3)-02.

170. Ighodaro OM, Asejeje AO, Adeosun AM, Ujomu TS. Olisedeme, C.J. Dose and Time Dependent Effects of Intraperitoneal Administration of Carbon

Tetrachloride (CCl4) on Blood Lipid Profile in Wistar Rats. EC Pharmacology and Toxicology. 2020;8:21-25.

171. Manhar N, Singh SK, Yadav P, Bishnolia M, Khurana A, Bhatti JS. Navik, U. Methyl Donor Ameliorates CCl4-Induced Nephrotoxicity by Inhibiting Oxidative Stress, Inflammation, and Fibrosis Through the Attenuation of Kidney Injury Molecule 1 and Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Expression. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology. 2025;39(3):e70188. doi:10.1002/jbt.70188.

172. Mushtaq S, Naz L. Javed, A. Comparative evaluation of Caesalpinia bonducella leaf extract in CCl4-induced hepatotoxicity: Insights from lipid and protein peroxidation, DNA damage and histopathology. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences. 2026;39(8):2560-2569. doi:10.36721/PJPS.2026.39.8.240.1.

173. Jeong TB, Kwon D, Son SW, Kim SH, Lee YH, Seo MS, et al. Jung, Y.S. Weaning Mice and Adult Mice Exhibit Differential Carbon Tetrachloride-Induced Acute Hepatotoxicity. Antioxidants. 2020;9(3):201. doi:10.3390/antiox9030201.

174. Wang C, Luo M. et al. Hedyotis diffusa Willd. extract alleviates CCl4-induced liver fibrosis via modulation of the gut microbiota and FXR/SHP/CYP7A1-mediated bile acid metabolism. Journal of Ethnopharmacology. 2026;363:121450. doi:10.1016/j.jep.2026.121450.

175. Apetyk Y. Mul, O. Вплив вільнорадикального окиснення на процеси старіння. UNIVERSUM. 2026;28:237-245.

176. Knockaert L, Berson A, Ribault C, Prost PE, Fautrel A, Pajaud J, et al. Robin, M.A. Carbon tetrachloride-mediated lipid peroxidation induces early mitochondrial alterations in mouse liver. Laboratory Investigation. 2012;92(3):396-410. doi:10.1038/labinvest.2011.193.

177. Tkachova OV, Savokhina MV. Koshova, O.Yu. Оксидативний стрес як мішень гепатопротекторної фармакотерапії при токсичних і лікарсько-індукованих ураженнях печінки. Likarska Sprava. 2026;1:139. doi:10.31640/LS-2026-1-16.

178. Pimentel MVMB, Bertolami A, Fernandes LP, Barroso LP. Castro, I.A. Could a lipid oxidative biomarker be applied to improve risk stratification in the prevention of cardiovascular disease. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2023;160:114345. doi:10.1016/j.biopha.2023.114345.

179. Divani M, Katsanaki A, Poulianiti C, Lykotsetas E, Balatsouka A, Makri P, et al. Eleftheriadis, T. Lipid peroxidation marker malondialdehyde is an independent determinant of hepatitis B vaccine response in hemodialysis patients. Vaccine. 2026;87:128776. doi:10.1016/j.vaccine.2026.128776.

180. Baytar G, Oflamaz AO, Doganyigit Z, Aktas S, Kutlu T, Ates A. Ogut, S. Protective effects of oleuropein against monosodium glutamate-induced toxicity in aged rats. NeuroToxicology. 2025;111:103344. doi:10.1016/j.neuro.2025.103344.

181. Bauer A, Schumann A, Gilbert M, Wilhelm C, Hengstler JG, Schiller J. Fuchs, B. Evaluation of carbon tetrachloride-induced stress on rat hepatocytes by 31P NMR and MALDI-TOF mass spectrometry: lysophosphatidylcholine generation from unsaturated phosphatidylcholines. Chemistry and Physics of Lipids. 2009;159(1):21-29. doi:10.1016/j.chemphyslip.2009.02.006.

182. Luo W, Zhang J. Wu, H. Lipid Oxidation in Meat: From Fundamental Mechanisms to Latest Control Solutions. In: Toldrá, F., editor. Advances in Food and Nutrition Research. Academic Press, 2025;116:1-65. doi:10.1016/bs.afnr.2025.04.005.

183. Møller IM, Rogowska-Wrzesinska A. Rao, R.S.P. Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective. Journal of Proteomics. 2011;74(11):2228-2242. doi:10.1016/j.jprot.2011.05.004.

184. Ahmed AR, Farris FF. Ray, S.D. Lipid peroxidation. In: Wexler, P., editor. Encyclopedia of Toxicology. 4th ed. Academic Press, 2024; pp. 861-870. doi:10.1016/B978-0-12-824315-2.00624-2.

185. Thomson SM, Pulido P. Jarvis, R.P. Protein import into chloroplasts and its regulation by the ubiquitin-proteasome system. Biochemical Society Transactions. 2020;48(1):71-82. doi:10.1042/BST20190274.

186. Langin G, Gouguet P. Üstün, S. Microbial Effector Proteins – A Journey through the Proteolytic Landscape. Trends in Microbiology. 2020;28(7):523-535. doi:10.1016/j.tim.2020.02.010.

187. Ishihara Y, Hamaguchi A, Sekine M, Hirakawa A. Shimamoto, N. Accumulation of cytochrome P450 induced by proteasome inhibition during cardiac ischemia. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2012; 527(1):16-22. doi:10.1016/j.abb.2012.07.015.

188. Lai W, Zhang J, Sun J, Min T, Bai Y, He J, et al. Su, Z. Oxidative stress in alcoholic liver disease, focusing on proteins, nucleic acids, and lipids: A review. International Journal of Biological Macromolecules. 2024; 278(Pt 3):134809. doi:10.1016/j.ijbiomac.2024.134809.

189. Zarrouk A, Smach MA, Hafsa J, Sghaier R, Majdoub H, Hammami M. Charfeddine, B. Effects of Carpobrotus edulis Extract on Oxidative Stress and 158N Oligodendrocyte Death. Biomedical and Environmental Sciences. 2019;32(4):291-299. doi:10.3967/bes2019.039.

190. Gahlawat A, Bhattacharyya S. Bhattacharyya, M.K. Hsp90 and associates shaping parasite biology. mSphere. 2025;10(10):e0032925. doi:10.1128/msphere.00329-25.

191. Kurhaluk N, Tkachenko H. Kamiński, P. Biomarkers of oxidative stress, metabolic processes, and lysosomal activity in the muscle tissue of the great tit (Parus major) living in sodium industry and agricultural areas in Inowrocław region (central part of northern Poland). Environmental Research. 2022;210:112907. doi:10.1016/j.envres.2022.112907.

192. Tran NH, Lockhart S, Eldalal O, Tran PG, Cooper J-PR, Tonoyan L, et al. Siraki, A.G. Proteomic identification of protein radicals from myeloperoxidase-mediated mefenamic acid oxidation reveals a mechanism of NSAID-induced oxidative injury. Redox Biochemistry and Chemistry. 2025;14:100066. doi:10.1016/j.rbc.2025.100066.

193. Ighodaro OM. Akinloye, O.A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their

fundamental role in the entire antioxidant defence grid. Alexandria Journal of Medicine. 2018;54(4):287-293. doi:10.1016/j.ajme.2017.09.001.

194. St. Clair D, Kasarskis E, St. Clair W. Chaiswing, L. Superoxide Dismutase and Catalase. In: McQueen, C.A., editor. Comprehensive Toxicology. 4th ed. Elsevier, 2026; pp. 311-334. doi:10.1016/B978-0-323-95488-4.00063-2.

195. Velasco Ramírez SF, Ramírez Anguiano AC, Colorado Torres LA, Manzo Godoy MA, Camacho Larroca AL, Velázquez Juárez G, et al. Flores-Fonseca, M.M. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses in plants under stress by toxic metals. In: Husen, A., editor. Role of Antioxidants in Mitigating Plant Stress. Academic Press, 2025; pp. 87-130. doi:10.1016/B978-0-443-26799-4.00020-7.

196. Hekmat A, Saboury AA. Saso, L. Superoxide dismutases inhibitors. In: Supuran, C.T.; Donald, W.A., editors. Metalloenzymes. Academic Press, 2024; pp. 523-531. doi:10.1016/B978-0-12-823974-2.00004-8.

197. Trusek-Holownia A. Noworyta, A. Efficient utilisation of hydrogel preparations with encapsulated enzymes – a case study on catalase and hydrogen peroxide degradation. Biotechnology Reports. 2015;6:13-19. doi:10.1016/j.btre.2014.12.012.

198. Cywińska-Antonik M, Szczepańska-Stolarczyk J. Marszałek, K. Quantitative assessment of oxidoreductase and catalase enzymatic activity in model systems for catalyzed degradation of glucose and hydrogen peroxide. Food Bioscience. 2025;73:107668. doi:10.1016/j.fbio.2025.107668.

199. Stehbens, W.E. Oxidative stress, toxic hepatitis, and antioxidants with particular emphasis on zinc. Experimental and Molecular Pathology. 2003;75(3):265-276. doi:10.1016/S0014-4800(03)00097-2.

200. de Duve, C. Commentary on “Intracellular localization of catalase and of some oxidases in rat liver” by C. de Duve, H. Beaufay, P. Jacques, Y. Rahman-Li, O.Z. Sellinger, R. Wattiaux and S. De Coninck, Biochim. Biophys. Acta 40 (1960) 186–187. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. 1989;1000:317-322. doi:10.1016/S0006-3002(89)80026-5.

201. Chouteau P, Brichler S, Bruscella P, Florimond A. Pawlotsky, J.-M. P0681: Catalase activity inhibition by hepatitis C virus (HCV) in HCV-induced oxidative stress, a trigger of hepatic carcinogenesis. Journal of Hepatology. 2015;62(Suppl 2):S577. doi:10.1016/S0168-8278(15)31541-5.

202. Su X, Wang S, Wang X, Ji W, Zhang H, Tu T, et al. Huang, H. Targeting deoxynivalenol for degradation by a chimeric manganese peroxidase/glutathione system. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2024;273:116130. doi:10.1016/j.ecoenv.2024.116130.

203. Zhu Q, Gao M, Yan M, Ma Z, Li X, Yu M, et al. Wang, J. Naringin alleviates autoimmune hepatitis in mice via the gut-liver axis through modulation of microbiota, metabolites, and immune responses. International Immunopharmacology. 2026;177:116498. doi:10.1016/j.intimp.2026.116498.

204. Vairetti M, Di Pasqua LG, Cagna M, Richelmi P, Ferrigno A. Berardo, C. Changes in Glutathione Content in Liver Diseases: An Update. Antioxidants. 2021;10(3):364. doi:10.33

ДОДАТОК А1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
т..в.о. ректора Дніпровського національного
університету імені Олеся Гончара
к.біол.наук, професор
Олег Маренков
"____" _____ 2026р

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: Результати дослідження дисертаційної роботи «Зміни біохімічних показників у щурів при гострому гепатиті та його корекція за допомогою нових похідних птеридину», а саме:

- методологію послідовного пошуку (дизайн) біологічно активних речовин із потенційними гепатопротекторними властивостями із застосуванням комплексу методів *in silico*, *in vitro* та *in vivo*;
- відомості про взаємозв'язок між хімічною будовою S-заміщених 6-R^1-7-R^2-2-тіоксо-2,3-дигідроптеридин-4(1H)-онів, їх розчинністю, гострою токсичністю та біологічною активністю;

2. Установа-розробник: Запорізький національний університет МОН України, кафедра фізіології, імунології і біохімії з курсом цивільного захисту та медицини (69001, м.Запоріжжя, вул. Університетська, 66), Логвіненко Наталя Володимирівна

3. Джерело інформації:

1. Kazunin M. S.; Groma N. V., Nosulenko I. S., Kinichenko A.O., Antypenko O.M., Shvets V. M., Voskoboinik O. Y., Kovalenko S.I. Thio-containing pteridines: synthesis, modification and biological activity. *Archiv der Pharmazie*. – 2022; Vol. 355, Issue12. doi:10.1002/ardp.202200252.
2. Groma N., Berest G., Antypenko O., Voskoboinik O., Kopiika V., Kovalenko S., Shvets V. Evaluation of toxicity and hepatoprotector properties of new S-pteridine derivatives. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*. – 2023; Vol. 36, No. 1. – P.21-26; doi:10.2478/cipms-2023-0006.
3. Lohvinenko N., Shvets V., Berest G., Nosulenko I., Voskoboinik O., Severina H., Okovytyy S., Kovalenko S. Prospects for the use of sulfur-containing pteridines in toxic liver damage. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. – 2024; 15(2). – P.374-381. doi:10.15421/022453.
4. Lohvinenko N., Shvets V., Antypenko O., Voskoboinik O., Bozhkov A., Maslak H., Oksenych V., Kamyshnyi O., Okovytyy S., Kovalenko S. The Application of S-Substituted Pteridine for CCl_4-Induced Acute Hepatitis Treatment in Rats. *Biomedicines*. – 2025; 13, 1276. doi:10.3390/biomedicines13061276.

4. Де і коли впроваджено: У освітньо-науковий процес кафедри фізичної, органічної та неорганічної хімії Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара. Матеріали дисертації використано під час викладання ОП «Хімія лікарських речовин», зокрема дисциплін «Хімія гетероциклічних сполук», «Медична хімія», «Комп'ютерний дизайн лікарських речовин» та «Основи фармакології», у лекційних матеріалах, практичних заняттях, завданнях для самостійної роботи здобувачів вищої освіти та під час організації студентської науково-дослідної роботи. Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фізичної, органічної та неорганічної хімії, протокол № 3 від «14» 09 2026 року.

5. Зауваження та пропозиції: не вносилися.

Відповідальний за впровадження:
к.хім.наук, завідувач кафедри
фізичної, органічної та неорганічної хімії
Надія СТЕЦЬ

ДОДАТОК А2

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
проректор з науково-педагогічної роботи
Запорізький державний
медико-фармацевтичний університет
д.мед.наук, професор
Вадим Візір
"22" 09 2026р

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: Результати експериментального дослідження біохімічних механізмів розвитку гострого тетрахлорметанового ураження печінки та його корекції новими S-заміщеними похідними птеридину. Особливості змін показників функціонального стану печінки, процесів перекисного окиснення ліпідів та окиснювальної модифікації білків, ферментативної і неферментативної ланок антиоксидантної системи за умов CCl_4-індукованого гострого гепатиту та при застосуванні Тіоптерину (DCTP).

2. Установа-розробник: Запорізький національний університет МОН України, кафедра фізіології, імунології і біохімії з курсом цивільного захисту та медицини (69001, м.Запоріжжя, вул. Університетська, 66), Логвіненко Наталя Володимирівна

3. Джерело інформації:

1.Maxim S. Kazunin; N. V. Groma; Inna S. Nosulenko; Anna O. Kinichenko; Oleksii M. Antypenko; Volodymyr M. Shvets; Oleksii Y. Voskoboinik; Serhii I. Kovalenko. Thio-containing pteridines: synthesis, modification and biological activity. Archiv der Pharmazie. 2022; Vol. 355, Issue12. doi:10.1002/ardp.202200252.

2.Shvets V.M., Kovalenko S.I., Voskoboinik O.Yu., Groma N.V., Kopiika V.V., Berest G.G., Antypenko O.M. Evaluation of toxicity and hepatoprotector properties of new S-pteridine derivatives. Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences. 2023; Vol. 36, No. 1, P.21-26; doi:10.2478/cipms-2023-0006.

3.Lohvinenko N., Shvets V., Berest G., Nosulenko I., Voskoboinik O., Severina H., Okovytyy S., Kovalenko S. Prospects for the use of sulfur-containing pteridines in toxic liver damage. Regulatory Mechanisms in Biosystems. 2024; 15(2)., P.374-381. doi:10.15421/022453.

4.Lohvinenko, N.; Shvets, V.; Antypenko, O.; Voskoboinik, O.; Bozhkov, A.; Maslak, H.; Oksenych, V.; Kamyshnyi, O.; Okovytyy, S.; Kovalenko, S. The Application of S-Substituted Pteridine for CCl4-Induced Acute Hepatitis Treatment in Rats. Biomedicines. 2025; 13, 1276. doi:10.3390/biomedicines13061276.

4. Де і коли впроваджено: у освітньо-науковий процес кафедри клінічної лабораторної діагностики та біологічної хімії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету. Результати дослідження використовуються при викладанні біохімії в межах тем, присвячених біохімії печінки, механізмам токсичного ураження гепатоцитів, оксидативному стресу, перекисному окисненню ліпідів, окиснювальній модифікації білків та функціонуванню антиоксидантної системи. Матеріали впроваджено до лекційних і практичних занять. Обговорено та затверджено на засіданні кафедри клінічної лабораторної діагностики та біологічної хімії, протокол № 1 від «31» серпня 2026 року.

5. Зауваження та пропозиції: не вносилися.

Відповідальний за впровадження:
професор, д.біол. наук, завідувач кафедри
клінічної лабораторної
діагностики та біологічної хімії
Сергій ПАВЛОВ

ДОДАТОК А3



«ЗАТВЕРДЖУЮ»
проректор з наукової роботи
Запорізький національний університет
д.мед.наук, професор
Дмитро ЯРМОШ
"__" ____ 2026р

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** Результати дослідження метаболічних і прооксидантно-антиоксидантних порушень у печінці щурів за умов гострого CC_4-індукованого гепатиту та їх експериментальної корекції новими S-заміщеними похідними птеридину. Закономірності змін біохімічних показників функціонального стану печінки, продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів і білків, активності супероксиддисмутази, каталази та показників глутатіонової системи.

2. **Установа-розробник:** Запорізький національний університет МОН України, кафедра фізіології, імунології і біохімії з курсом цивільного захисту та медицини (6901, м.Запоріжжя, вул. Університетська, 66), Логвіненко Наталя Володимирівна

3. **Джерело інформації:**

1.Maxim S. Kazunin; N. V. Groma; Inna S. Nosulenko; Anna O. Kinichenko; Oleksii M. Antypenko; Volodymyr M. Shvets; Oleksii Y. Voskoboinik; Serhii I. Kovalenko. Thio-containing pteridines: synthesis, modification and biological activity. Archiv der Pharmazie. 2022; Vol. 355, Issue12. doi:10.1002/ardp.202200252.

2.Shvets V.M., Kovalenko S.I., Voskoboinik O.Yu., Groma N.V., Kopiika V.V., Berest G.G., Antypenko O.M. Evaluation of toxicity and hepatoprotector properties of new S-pteridine derivatives. Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences. 2023; Vol. 36, No. 1, P.21-26; doi:10.2478/cipms-2023-0006.

3.Lohvinenko N., Shvets V., Berest G., Nosulenko I., Voskoboinik O., Severina H., Okovytyy S., Kovalenko S. Prospects for the use of sulfur-containing pteridines in toxic liver damage. Regulatory Mechanisms in Biosystems. 2024; 15(2)., P.374-381. doi:10.15421/022453.

4.Lohvinenko, N.; Shvets, V.; Antypenko, O.; Voskoboinik, O.; Bozhkov, A.; Maslak, H.; Oksenych, V.; Kamyshnyi, O.; Okovytyy, S.; Kovalenko, S. The Application of S-Substituted Pteridine for CCl4-Induced Acute Hepatitis Treatment in Rats. Biomedicines. 2025; 13, 1276. doi:10.3390/biomedicines13061276.

4. **Де і коли впроваджено:** У освітньо-науковий процес кафедри фізіології, імунології та біохімії з курсом цивільного захисту Запорізького національного університету. Результати дисертаційного дослідження використовуються під час викладання дисципліни «Біохімія» при розгляді питань метаболічної функції печінки, біохімічних механізмів дії ксенобіотиків, вільнорадикального окиснення, оксидативного стресу та механізмів ферментативного і неферментативного антиоксидантного захисту. Результати впроваджено до матеріалів лекційних та практичних занять. Обговорено та затверджено на засіданні кафедри біохімії, протокол № 1 від «28» 08 2026 року.

5. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Відповідальний за впровадження:
д.біол.наук, завідувач кафедри
фізіології, імунології, біохімії
з курсом цивільного захисту та медицини

Оксана КУЩ

ДОДАТОК Б

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ АВТОРОМ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Maxim Kazunin; Natalia Groma; Inna Nosulenko; Anna Kinichenko; Oleksii Antypenko; Volodymyr Shvets; Oleksii Voskoboinik; Serhii Kovalenko. Thio-containing pteridines: synthesis, modification and activity. Archiv der Pharmazie. 2022; Vol. 355, Issue12. doi:10.1002/ardp.202200252. (Scopus Q2)

2. Shvets V.M., Kovalenko S.I., Voskoboinik O.Yu., Groma N.V., Kopiika V.V., Berest G.G., Antypenko O.M. Evaluation of toxicity and hepatoprotector properties of new *S*-pteridine derivatives. Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences. 2023; Vol. 36, No. 1, P.21-26; doi:10.2478/cipms-2023-0006. (Scopus Q3)

3. Lohvinenko N., Shvets V., Berest G., Nosulenko I., Voskoboinik O., Severina H., Okovytyy S., Kovalenko S. Prospects for the use of sulfur-containing pteridines in toxic liver damage. Regulatory Mechanisms in Biosystems. 2024; 15(2)., P.374-381. doi:10.15421/022453. (Scopus Q1)

4. Lohvinenko, N.; Shvets, V.; Antypenko, O.; Voskoboinik, O.; Bozhkov, A.; Maslak, H.; Oksenych, V.; Kamyshnyi, O.; Okovytyy, S.; Kovalenko, S. The Application of *S*-Substituted Pteridine for CCl_4-Induced Acute Hepatitis Treatment in Rats. Biomedicines. 2025; 13, 1276. doi:10.3390/ biomedicines13061276. (Scopus Q1)

5. Groma N. V., Nosulenko I.S., Berest G.G., Shvets V.M., Kovalenko S.I. Use of *in vitro* methodology and search of antioxidants among *S*-pteridin derivatives. IX науково-практична конференція з міжнародною участю «Науково -технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів»; 22 вересня 2022 року; Тернопіль; 2022. С 22-23.

6. Groma N. V., Nosulenko I.S., Berest G.G., Shvets V.M., Kovalenko S.I. Use of in silico approaches in the study of anti-radical, antioxidant effects in a

series of *S*-substituted pteridins with potential hepatoprotective effect. VI міжнародна наукова конференція актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології; 6-7 жовтня 2022; Дніпро; 2022. С 53-54.

7. N. Groma, O. Voskoboinik, V. Shvets. Hepatoprotective activity and toxicity of novel pteridine derivatives. VI Науково-практична internet-конференція з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція». 16 листопада 2023; Харків; 2023. С.43

8. N.V. Lohvinenko, V.M. Shvets, I.V. Dobrodub. Virtual screening of biologically active substances among s-containing derivatives of pteridine. Конференція з міжнародною участю "Youth Science - 2024. 17 травня 2024. Вінниця; 2024. С. 7-8

9. N.V. Lohvinenko, V.M. Shvets. Assessment of toxicity and hepatoprotective properties of new *S*-substituted pteridinsю. VII Міжнародна науково-практична конференція «Сучасні проблеми біології, екології та хімії». 25-27 квітня 2024. Запоріжжя; 2024. С.46

10. Lohvinenko N., Kovalenko S., Shvets V. ДОСЛІДЖЕННЯ *S*-ЗАМІЩЕНИХ 6-R_1-7-R_2-2-ТІОКСО-2,3-ДИГІДРО-ПТЕРИДИН-4(1Н)-ОНІВ МЕТОДАМИ *in silico*, *in vitro* ТА ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ ДЛЯ ОЦІНКИ ПОДАЛЬШОГО ЗАСТОСУВАННЯ ПРИ експериментальних моделях патології печінки. The 7th International Scientific Conference "Current problems of biochemistry, cell biology and physiology". 3-4 жовтня 2025; Дніпро; 2025. С.58-60.

11. Логвіненко Н .В., Швець В. М., Берест Г. Г., Носуленко І. С., Воскобойнік О. Ю., Коваленко С.І «Drug-design» птеридинів на основі «фолатного циклу» як стратегія пошуку нових гепатопротекторів. І Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю "Міждисциплінарні підходи до створення ліків". 14 -15 квітня 2026. Одеса; 2026. С. 114-117

12. Логвіненко Н.В., Швець В.М., Коваленко С.І. Оцінка метаболітотропної дії *S*-птеридинів при експериментальному гепатиті у щурів. ІІ Всеукраїнська науково-практична конференція «Актуальні проблеми та

перспективи розвитку природничих, медичних та фармацевтичних наук». 25 квітня 2026; Запоріжжя; 2026.

ДОДАТОК В

ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

1. Groma N. V., Nosulenko I.S., Berest G.G., Shvets V.M., Kovalenko S.I. Use of *in vitro* methodology and search of antioxidants among *S*-pteridin derivatives. IX науково-практична конференція з міжнародною участю «Науково -технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів»; 22 вересня 2022 року; Тернопіль; 2022. С 22-23.

2. Groma N. V., Nosulenko I.S., Berest G.G., Shvets V.M., Kovalenko S.I. Use of *in silico* approaches in the study of anti-radical, antioxidant effects in a series of *S*-substituted pteridins with potential hepatoprotective effect. VI міжнародна наукова конференція актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології; 6-7 жовтня 2022; Дніпро; 2022. С 53-54.

3. N. Groma, O. Voskoboinik, V. Shvets. Hepatoprotective activity and toxicity of novel pteridine derivatives. VI Науково-практична internet-конференція з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція». 16 листопада 2023; Харків; 2023. С.43

4. N.V. Lohvinenko, V.M. Shvets, I.V. Dobrodub. Virtual screening of biologically active substances among *S*-containing derivatives of pteridine. Конференція з міжнародною участю “Youth Science - 2024. 17 травня 2024. Вінниця; 2024. С. 7-8

5. N.V. Lohvinenko, V.M. Shvets. Assessment of toxicity and hepatoprotective properties of new S-substituted pteridinsю. VII Міжнародна науково-практична конференція «Сучасні проблеми біології, екології та хімії». 25-27 квітня 2024. Запоріжжя; 2024. С.46

6. Lohvinenko N., Kovalenko S., Shvets V. ДОСЛІДЖЕННЯ *S*-ЗАМІЩЕНИХ 6-R_1-7-R_2-2-ТІОКСО-2,3-ДИГІДРО-ПТЕРИДИН-4(1Н)-ОНІВ МЕТОДАМИ *in silico, in vitro* ТА ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ ДЛЯ ОЦІНКИ ПОДАЛЬШОГО ЗАСТОСУВАННЯ ПРИ експериментальних моделях патології

печінки. The 7th International Scientific Conference “Current problems of biochemistry, cell biology and physiology”. 3-4 жовтня 2025; Дніпро; 2025. С.58-60.

7. Логвіненко Н .В., Швець В. М., Берест Г. Г., Носуленко І. С., Воскобойнік О. Ю., Коваленко С.І «Drug-design» птеридинів на основі «фолатного циклу» як стратегія пошуку нових гепатопротекторів. І Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю “Міждисциплінарні підходи до створення ліків”. 14-15 квітня 2026. Одеса; 2026. С. 114-117

8. Логвіненко Н.В., Швець В.М., Коваленко С.І. Оцінка метаболітотропної дії *S*-птеридинів при експериментальному гепатиті у щурів. ІІ Всеукраїнська науково-практична конференція «Актуальні проблеми та перспективи розвитку природничих, медичних та фармацевтичних наук». 25 квітня 2026; Запоріжжя; 2026.