



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 85390

(13) C2

(51) МПК (2009)

C07D 487/04 (2006.01)

C07D 237/32 (2006.01)

C07H 19/06 (2006.01)

A61K 31/519

A61K 31/502

A61K 31/7072 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) ЦИКЛІЧНІ БІОІЗОТЕРИ ПОХІДНИХ ПУРИНОВОЇ СИСТЕМИ І ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ НА ЇХ ОСНОВІ

1

(21) а200602343

(22) 04.08.2003

(24) 26.01.2009

(86) PCT/RU2003/000346, 04.08.2003

(46) 26.01.2009, Бюл.№ 2, 2009 р.

(72) ЖИЛОВ ВАЛЕРІЙ ХАЖМУРАТОВІЧ,
ЖУРАВЛЬОВ СЕРГЕЙ ВЛАДІМІРОВІЧ, МАРКОВ
АЛЕКСАНДР НІКОЛАЄВИЧ, ПОЛОСІН ВЛАДІМІР
МІХАЙЛОВІЧ

(73) ЖИЛОВ ВАЛЕРІЙ ХАЖМУРАТОВІЧ

(56) RU 2211036 C2 27.08.2003

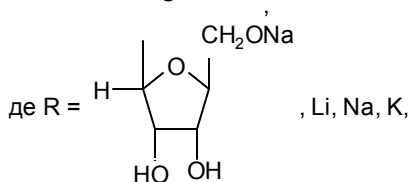
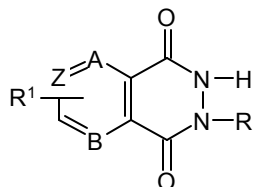
RU 2163122 C1 20.02.2001

RU 2169139 C1 20.06.2001

RU 2168511 C2 20.08.1998

US 5719151 A 17.02.1998

JP 05-078356 A 30.03.1993

(57) 1. Циклічний біоізомер похідних пуринової
системи, який має загальну структурну формулу:R¹ = -H, -NH₂, -Br, -Cl, -OH, -COOH,

B = -N=, -CH=, Z = -CH=N=,

A = -N= при B = -N=, Z = -CH=,

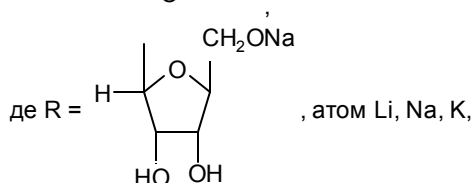
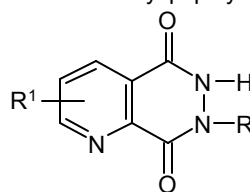
A = -CH= при B = -N=, Z = -CH=,

A = -CH= при B = -N=, Z = -N=,

A = -CH= при B = -CH=, Z = -CH=,

A = -CH= при B = -CH=, Z = -N=,

2

та його фармакологічно прийнятні солі, що мають
нормалізуючий вплив на внутрішньоклітинні про-
цеси.2. Сполука за п. 1, яка **відрізняється** тим, що є
похідною піридо[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону, яка
має загальну формулу:де R = -H, -NH₂, -Br, -OH, -COOH.3. Сполука за п. 1 або 2, яка **відрізняється** тим,
що вибрана з групи, що включає:7-(β-D-рибофуранозил)піридо[2,3-d]-6Н-
піридазин-5,8-діону натрієву сіль (1),4-аміно-7-(β-D-рибофуранозил)піридо[2,3-d]-6Н-
піридазин-5,8-діону натрієву сіль (2),3-бром-7-(β-D-рибофуранозил)піридо[2,3-d]-6Н-
піридазин-5,8-діону натрієву сіль (3),4-гідрокси-7-(β-D-рибофуранозил)піридо[2,3-d]-
6Н-піридазин-5,8-діону динатрієву сіль (4),3-карбокси-7-(β-D-рибофуранозил)піридо[2,3-d]-
6Н-піридазин-5,8-діону динатрієву сіль (5),піридо[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону літєву сіль
(6),піридо[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону натрієву сіль
(7),

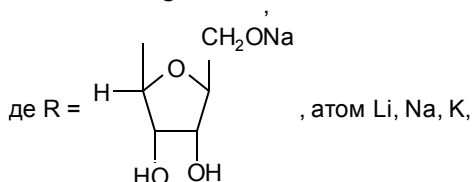
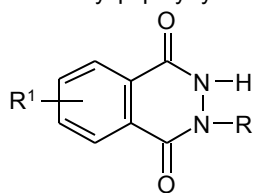
(13) C2

(11) 85390

(19) UA

піридо[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону калієву сіль (8).

4. Сполука за п. 1, яка **відрізняється** тим, що є похідною бензо[d]-3Н-піридазин-1,4-діону, яка має загальну формулу:



R¹ = -H, -NH₂, -Cl, -OH, -COOH.

5. Сполука за п. 1 або 4, яка **відрізняється** тим, що вибрана з групи, яка включає:

2-(β-D-рибофуранозил)бензо[d]-3Н-піридазин-1,4-діону натрієву сіль (9),

5-аміно-2-(β-D-рибофуранозил)бензо[d]-3Н-піридазин-1,4-діону натрієву сіль (10),

6-аміно-2-(β-D-рибофуранозил)бензо[d]-3Н-піридазин-1,4-діону натрієву сіль (11),

5-хлор-2-(β-D-рибофуранозил)бензо[d]-3Н-піридазин-1,4-діону натрієву сіль (12),

5-гідрокси-2-(β-D-рибофуранозил)бензо[d]-3Н-піридазин-1,4-діону динатрієву сіль (13),

5-амінобензо[d]-3Н-піридазин-1,4-діону літєву сіль (14),

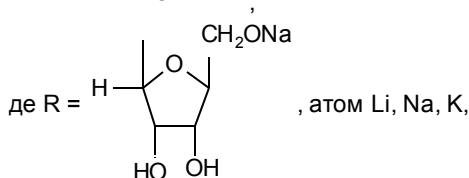
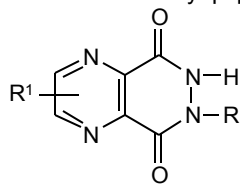
5-амінобензо[d]-3Н-піридазин-1,4-діону натрієву сіль (15),

6-амінобензо[d]-3Н-піридазин-1,4-діону калієву сіль (16),

5-гідроксибензо[d]-3Н-піридазин-1,4-діону динатрієву сіль (17),

6-карбоксибензо[d]-3Н-піридазин-1,4-діону динатрієву сіль (18).

6. Сполука за п. 1, яка **відрізняється** тим, що є похідною піразино[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону, яка має загальну формулу:



R¹ = -H, -NH₂, -Br, -OH, -COOH.

7. Сполука за п. 1 або 6, яка **відрізняється** тим, що вибрана з групи, яка включає:

7-(β-D-рибофуранозил)піразино[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону натрієву сіль (19),

2-аміно-7-(β-D-рибофуранозил)піразино[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону натрієву сіль (20),

3-аміно-7-(β-D-рибофуранозил)піразино[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону натрієву сіль (21),

3-бром-7-(β-D-рибофуранозил)піразино[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону натрієву сіль (22),

2-гідрокси-7-(β-D-рибофуранозил)піразино[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону динатрієву сіль (23),

2-карбокси-7-(β-D-рибофуранозил)піразино[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону динатрієву сіль (24),

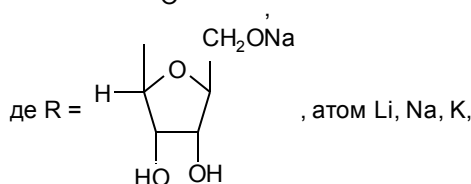
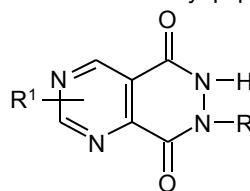
піразино[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону літєву сіль (25),

піразино[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону натрієву сіль (26),

3-бромпіразино[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону калієву сіль (27),

2-амінопіразино[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону натрієву сіль (28).

8. Сполука за п. 1, яка **відрізняється** тим, що є похідною піримідо[4,5-d]-6Н-піридазин-5,8-діону, яка має загальну формулу:



R¹ = -H, -NH₂, -Br, -OH, -COOH.

9. Сполука за п. 1 або 8, яка **відрізняється** тим, що вибрана з групи, яка включає:

7-(β-D-рибофуранозил)піримідо[4,5-d]-6Н-піридазин-5,8-діону натрієву сіль (29),

2-аміно-7-(β-D-рибофуранозил)піримідо[4,5-d]-6Н-піридазин-5,8-діону натрієву сіль (30),

4-аміно-7-(β-D-рибофуранозил)піримідо[4,5-d]-6Н-піридазин-5,8-діону натрієву сіль (31),

2-бром-7-(β-D-рибофуранозил)піримідо[4,5-d]-6Н-піридазин-5,8-діону натрієву сіль (32),

4-гідрокси-7-(β-D-рибофуранозил)піримідо[4,5-d]-6Н-піридазин-5,8-діону натрієву сіль (33),

4-карбокси-7-(β-D-рибофуранозил)піримідо[4,5-d]-6Н-піридазин-5,8-діону натрієву сіль (34),

піримідо[4,5-d]-6Н-піридазин-5,8-діону літєву сіль (35),

2-амінопіримідо[4,5-d]-6Н-піридазин-5,8-діону натрієву сіль (36),

4-бромпіримідо[4,5-d]-6Н-піридазин-5,8-діону калієву сіль (37).

10. Сполука за будь-яким з пп. 1-9, яка **відрізняється** тим, що має здатність усувати внутрішньоклітинний метаболічний ацидоз.

11. Сполука за будь-яким з пп. 1-9, яка **відрізняється** тим, що має здатність зв'язувати вільні радикали, які надмірно утворюються в клітині.

12. Сполука за будь-яким з пп. 1-9, 11, яка **відрізняється** тим, що має здатність зв'язувати вільно-

радикальні форми кисню, які надмірно утворюються в клітині.

13. Сполука за будь-яким з пп. 1-9, 11, яка **відрізняється** тим, що має здатність нормалізувати нитрергічні механізми клітин.

14. Сполука за будь-яким з пп. 1-9, яка **відрізняється** тим, що має здатність взаємодіяти з аденозінчутливими рецепторами.

15. Сполука за будь-яким з пп. 1-9, яка **відрізняється** тим, що має здатність взаємодіяти з аденозінчутливими рецепторами на мембрані неядерних клітин.

16. Сполука за будь-яким з пп. 1-9, 15, яка **відрізняється** тим, що має здатність знижувати агрегацію тромбоцитів.

17. Сполука за будь-яким з пп. 1-9, яка **відрізняється** тим, що має здатність взаємодіяти з аденозінчутливими рецепторами всередині ядровмісних клітин.

18. Сполука за будь-яким з пп. 1-13, яка **відрізняється** тим, що має гепатопротекторну дію.

19. Фармацевтична композиція, що містить біологічно активний інгредієнт і фармацевтично прийнятний носій, яка **відрізняється** тим, що як біологічно активний інгредієнт містить сполуку за будь-яким з пп. 1-18 в ефективній кількості.

20. Композиція за п. 19, яка **відрізняється** тим, що як активний інгредієнт містить сіль сполуки за будь-яким з пп. 1-9.

21. Композиція за п. 19 або 20, яка **відрізняється** тим, що активний інгредієнт вибраний з групи, яка включає солі лужних і лужноземельних металів.

22. Композиція за п. 20, яка **відрізняється** тим, що активний інгредієнт вибраний з групи, яка включає гідрохлориди, гідроброміди, сульфати, фосфати, цитрати, тартрати, фумарати, оксалати, малеати, ацетати, нітрати.

23. Композиція за будь-яким з пп. 19-21, яка **відрізняється** тим, що активний інгредієнт являє собою композицію солей, вибраних з групи, що включає солі лужних і лужноземельних металів, у будь-якому їх кількісному співвідношенні.

24. Композиція за будь-яким з пп. 19, 20, 22, яка **відрізняється** тим, що активний інгредієнт являє собою композицію солей, вибраних з групи, що включає гідрохлориди, гідроброміди, сульфати, фосфати, цитрати, тартрати, фумарати, оксалати, малеати, ацетати, нітрати, у будь-якому їх кількісному співвідношенні.

25. Композиція за будь-яким з пп. 19-24, яка **відрізняється** тим, що містить біологічно активний інгредієнт в ліпосомальній формі.

26. Композиція за будь-яким з пп. 19-25, яка **відрізняється** тим, що фармацевтично прийнятний носій являє собою композицію, що містить фармакологічно активні добавки.

27. Композиція за п. 26, яка **відрізняється** тим, що фармакологічно активні добавки вибрані з групи, яка включає стабілізатори, диспергатори, ароматизатори, емульгатори, провідники, засоби підвищення біодоступності.

28. Композиція за будь-яким з пп. 19-27, яка **відрізняється** тим, що являє собою активний інгредієнт у фармацевтично прийнятному рідкому носії або розчиннику.

29. Композиція за п. 28, яка **відрізняється** тим, що рідкий носій вибраний з групи, яка включає воду, фізіологічну рідину, буферні розчини.

30. Композиція за будь-яким з пп. 19-27, яка **відрізняється** тим, що являє собою тонкодисперсний порошок активного інгредієнта, необов'язково у фармацевтично прийнятному рідкому носії або розчиннику.

31. Композиція за будь-яким з пп. 19-30, яка **відрізняється** тим, що пристосована для введення способом, вибраним з групи, що включає ентеральне, парентеральне, інгаляційне, ректальне, вагінальне, наскірне, черезшкірне, інтраназальне введення, введення шляхом аплікації.

32. Композиція за будь-яким з пп. 19-31, яка **відрізняється** тим, що пристосована для місцевого введення.

33. Композиція за будь-яким з пп. 19-32, яка **відрізняється** тим, що пристосована для доставки до місця введення за допомогою пристрою.

34. Композиція за будь-яким з пп. 19-33, яка **відрізняється** тим, що пристосована для введення активним способом.

35. Композиція за будь-яким з пп. 19-33, яка **відрізняється** тим, що пристосована для введення пасивним способом.

36. Композиція за будь-яким з пп. 19-33, яка **відрізняється** тим, що являє собою спонтанно диспергований концентрат.

37. Композиція за будь-яким з пп. 19-33, яка **відрізняється** тим, що виготовлена у лікарській формі, яка забезпечує регульоване вивільнення активних інгредієнтів композиції.

38. Композиція за будь-яким з пп. 19-37, яка **відрізняється** тим, що додатково містить один або декілька агентів, які змінюють швидкість вивільнення активного інгредієнта.

39. Композиція за будь-яким з пп. 19-38, яка **відрізняється** тим, що пристосована для введення в дозованій кількості.

40. Композиція за будь-яким з пп. 19-39, яка **відрізняється** тим, що пристосована для застосування у твердому, напівтвердому, рідкому, суспензійному, аерозольному вигляді.

41. Композиція за будь-яким з пп. 19-40, яка **відрізняється** тим, що пристосована для розміщення у фармацевтично прийнятних засобах аплікації.

42. Композиція за будь-яким з пп. 2-31, яка **відрізняється** тим, що пристосована для введення у лікарській формі, вибраний з групи, що включає таблетки, грануляти, кульки, порошки, капсули, ампули, сухі препарати, яким перед застосуванням надається форма розчину або емульсії, свічки, тампони, мазі, гелі, солі, розчини для ін'єкцій, суспензії, емульсії, краплі, сиропи, пластири, аплікації, плівки, аерозолі, спреї.

Винахід відноситься до медицини, зокрема до фармацевтичних композицій для лікування різних захворювань, точніше - до лікарських засобів, що мають виражену нормалізуючу дію на внутрішньоклітинні процеси, зокрема усунення внутрішньоклітинного метаболічного ацидозу і зв'язування вільних радикалів, що надмірно утворюються.

Відомо, що гомеостатичними параметрами, що забезпечують виживання організму і нерозривно пов'язані між собою, є, головним чином, вміст газів O_2 і CO_2 у крові, вміст електролітів Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- та кислотно-основний стан клітини. Вміст газів у крові характеризує окисно-відновні процеси в клітині, кисень є важливим учасником процесу окиснення, а діоксид вуглецю - продуктом окисних реакцій. Електроліти складають основу позаклітинного і внутрішньоклітинного середовища, основу для клітинної інтеграції, для функціонування нервової і м'язової тканин.

Вміст іонів водню H^+ об'єктивно характеризує кислотно-основну рівновагу: іони водню забезпечують зв'язок між електролітами і газами крові за допомогою буферної системи ($HCO_3^- - CO_2$). Крім того, від вмісту іонів водню H^+ залежить діяльність ферментативних систем: ферменти зазвичай найбільш активні у вузькому діапазоні концентрації іонів водню. Для кожного ферменту існує певний інтервал значень рН, в якому фермент виявляє максимальну активність, наприклад для α -амілази слини і для каталази рН 6,8-7,0, уреазі рН 7,0-7,2, для трипсину рН 7,5-8,5, за межами цих інтервалів активність ферментів різко знижується.

Вплив змін рН середовища на стан молекули ферменту обумовлений, зокрема, ступенем іонізації $COOH$ -груп дикарбонових амінокислот, SH -груп цистеїну, імідазольного азоту гістидину, NH_2 -групи лізину та інших груп. При значній відмінності рН середовища від оптимальних значень ферменти зазнають конформаційних змін, що призводять до втрати активності внаслідок денатурації або зміни заряду молекули ферменту. При різних значеннях рН середовища активний центр ферменту може бути в частково іонізованому або неіонізованому стані, що позначається на третинній структурі білка і, відповідно, на формуванні активного фермент-субстратного комплексу.

Крім того, рН середовища впливає і на ступінь іонізації субстратів і коферментів.

Для клітини важливим є підтримання кислотно-лужної рівноваги - утворення іонів водню H^+ та їх виведення з клітини. Абсолютне або відносне збільшення концентрації водневих іонів в середовищі робить його кислим, а зменшення - лужним. Концентрація H^+ в плазмі крові при нормальному стані організму становить приблизно 10^{-7} . Значення рН крові є дуже стабільним, в нормі воно коливається від рН 7,35 до рН 7,45. Відхилення рН призводить до порушення функціонування клітин і, перш за все, їх численних ферментних систем, зміни спрямованості та інтенсивності окисно-відновних процесів, наприклад здатності гемоглобіну зв'язувати і віддавати кисень. При цьому змінюються всі обмінні процеси і, в першу чергу, водного та електролітного обміну, порушується чутливість клітинних рецепторів, змінюється про-

никність мембран, нервово-м'язова збудливість і провідність.

У підтриманні сталості нормальних для життєдіяльності значень рН крові і тканин беруть участь фізіологічні системи: легені, печінка, нирки, шлунковий тракт, і буферні системи: гемоглобінова, бікарбонатна, білкова і фосфатна. Буферні системи достатньо ефективно і швидко відвертають зсув кислотно-основної рівноваги, але вони не в змозі підтримувати її протягом тривалого періоду без участі фізіологічних систем.

У випадках, коли можливості вищезазначених компенсаційних систем по підтриманню концентрації іонів водню вичерпані, порушується кислотно-основна рівновага, і при цьому можуть виникати два різних стани: ацидоз, коли концентрація іонів водню вища за оптимальну концентрацію, тобто рН нижчий, ніж оптимальні значення, і алкалоз. Зниження рН нижче 6,8 є несумісним із життям.

Метаболічний ацидоз - найбільш тяжка і найчастіша форма порушення кислотно-основного стану. Причини метаболічного ацидозу можуть бути гіпоксії будь-якого походження: екзогенна, циркуляторна, дихальна, тканева, гемічна, а також цукровий діабет, голодування, лихоманка, ниркова недостатність, довготривала діарея, широкі запалення, наприклад перитоніт, передозування хлориду кальцію, та інші захворювання. До компенсації ацидозу підключаються нирки і печінка: активується ацидо- та амоніогенез в ниркових канальцях, якщо метаболічний ацидоз не є наслідком ниркової недостатності, а також підсилюється реасорбція бікарбонату в нирках і виділення його з печінки.

Концентрація іонів K^+ в плазмі, як правило, збільшується внаслідок їх витиснення з клітин іонами H^+ . Білки, зв'язуючи іони H^+ , вивільняють у плазму іони K^+ і Na^+ . Підвищення осмотичного тиску плазми за рахунок гіпернатріємії сприяє переміщенню води з клітин і розвитку гіперосмолярного синдрому.

При метаболічному ацидозі виникають і патологічні зміни: судини, як правило, розширюються при помірному зниженні рН і звужуються при вираженому ацидозі, при зменшенні судинного тиску артеріальний і венозний тиск знижується, зменшується венозне повернення крові до серця, в результаті чого зменшується ударний і хвилинний об'єм серця. Зменшується чутливість міокардіоцитів до іонів кальцію і до адреналіну, що супроводжується зниженням скоротливої здатності міокарда.

Гіперкаліємія з вмістом у плазмі іонів K^+ більше 5,2 мМ/л спричиняє порушення нервово-м'язової збудливості і провідності і обумовлює такі симптоми, як підвищення тиску поперечносмугастої мускулатури, блювота, діарея, психічні розлади, порушення чутливості, брадикардію, екстрасистолію. При підвищенні концентрації іонів K^+ в плазмі більше 7,5 мМ/л можливий розвиток мерехтіння шлуночків серця та зупинка його в діастолі, а також параліч скелетної мускулатури. Підсилюється агрегація і аглютинація тромбоцитів, мікротромби, що виникають, ще більше порушують мікро-

циркуляцію, збільшуючи гіпоксію, викликають порушення метаболічних процесів і підсилюють ацидоз.

В результаті порушення діяльності серця, периферичного кровообігу вторинно порушується функція нирок, печінки, центральної нервової системи. У тяжких випадках розвивається кома, може настати зупинка дихання.

При надмірному зниженні рН в клітині - менше 6,8 - руйнуються лізосоми, і клітини піддаються аутолізу під впливом лізосомальних ферментів.

Розробка достовірних методів прижиттєвої рН-метрії клітин дозволила встановити, що зміни внутрішньоклітинного рН супроводжують багато найважливіших процесів на клітинному рівні. Ряд факторів свідчить про те, що для нормальної життєдіяльності клітин і тканин організму підтримання рН у певному діапазоні є необхідним. Причиною цього може бути, зокрема, висока чутливість основних клітинних ферментів до значення рН. Так, відомо, що активність одного з ключових ферментів гліколізу 6-фосфоглюкокінази [2.7.1.11] зростає у десятки разів при збільшенні рН середовища на 0,2 одиниці [Trump B.F., Berezesky I.K. The role of altered $[Ca^{2+}]_i$ regulation in apoptosis, oncosis and necrosis. *Biochem. Biophys. Acta*, 1996, v. 1313, p. 173-178].

Активність піруваткарбоксилази [6.4.1.1], фосфорилази [2.4.1.1], каталізуючої метаболізм глікогену, також залежить від величини рН, та їх діяльність інгібується при підвищенні рН цитоплазми [Roos A., Boron W.F. Intracellular pH. *Physiol. Rev.*, 1981, v. 61, p. 296-434].

Відомо, що існує кореляція між процесами прикріплення клітин субстрату, підвищенням рН і запуском механізму проліферації мінімально трансформованих клітин [Акопов В.С., Гробова М.Е., Кошевой Ю.В. Внутриклеточный рН и субстратная зависимость пролиферации фибробластов китайского хомячка. *Цитология*, 1991, 33 (7), с. 86-94; Gillies R.G., Martinez-Zaguilan R., Peterson E.P., Perona R. The role of intracellular pH in mammalian cell proliferation. *Cell. Physiol. Biochem.*, 1992, 2, p. 159-179; Akatov V.S., Grobova M.E. Activation of intracellular pH regulating systems upon cell adhesion to solid substrate. *Biol. Membr.*, 1993, v. 6, p. 917-934].

Було показано, що у макрофагів зниження рН інгібує продукування супероксиду і фагоцитувальну активність. Крім того, при активації фагоцитів відбувається вивід протонів, що приводить до підвищення рН [Karus A., Romanek R., Qu A. Y., Rotstein O.O., Grinstein S.A. pH-sensitive and voltage-dependent proton conductance in the plasma membrane of macrophages. *J. Gen. Physiol.*, 1993, v. 102 (4), p. 723-760].

Зміна рН розглядається як можливий медіатор розплавлення і хемотаксису нейтрофілів, і строга кореляція рН необхідна для успішного виконання ними мікробіцидної функції [Demaurex N., Downey G., Waddell T., Grinstein S. Intracellular pH regulator during spreading of human neutrophils. *J. Cell. Biol.*, 1996, v. 133, p. 1381-1402].

На основі вищеперелічених даних можна зробити достовірний висновок про те, що підвищення внутрішньоклітинного рН служить показником ак-

тивності клітин. Тому, використовуючи знання про величину рН і про шляхи і методи підтримання цього параметра в певному діапазоні, можна ефективно впливати на внутрішньоклітинні процеси.

Наприклад, відомі дослідження по розробці лікарських препаратів, здатних вибірково накопичуватися в клітинах пухлин, що відрізняються від нормальних клітин за величиною рН [Tannock L.A., Rotin D. Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploration. *Cancer Res.*, 1989, v. 49, p. 4373-4384; Stabbs M., Rodrigues L., Howl F.A., Wang L., Joeng K.-S., Veech R.L., Griffiths J.R. Metabolic consequences of a reversed pH gradient in rat tumors. *Cancer Res.*, 1994, v. 54, p. 4011-4016].

Можливість прогнозованої зміни внутрішньоклітинного рН має важливе практичне значення для регуляції внутрішньоклітинного метаболізму.

Тому розробка фармацевтичних композицій, здатних ефективно підвищувати рН, є досить актуальною задачею.

Відоме застосування залізовмісних сполук, в тому числі цитрату і ацетату заліза та їх комбінації, в умовах гіперфосфатемії як засобу утримання фосфору і корекції метаболічного ацидозу при нирковій недостатності [US, 5753706] на основі абсорбції увібраних фосфатів у кишечнику.

Відома ветеринарна композиція для лікування молочнокислого ацидозу або запобігання йому, яка містить альфа-2-адреноцеторні антагоністи з групи імідазолінів, бензодіоксанімідазолінів і бензофуорохінолінів [US, 5196432].

Відомий спосіб захисту клітин людини від необоротних порушень, викликаних молочнокислим ацидозом внаслідок кисневої недостатності, переважно клітин центральної нервової системи, який полягає у введенні в організм нетоксичної сполуки, здатної проникати крізь мембрану клітини або долати гематоенцефалічний бар'єр, яка може здійснювати захисну буферну функцію в клітині і тканинах, перешкоджаючи підвищенню концентрації іонів водню, підтримуючи при цьому рН у фізіологічно прийнятних межах (не нижче 6,8), з групи, що включає $NH_2CH_2CH_2SO_3H$, $NH_2-C(NH)NH(CH_2)_2SO_3H$ або $NH_2-C(NH)NH(CH_2)_2SO_3Na$ [US, 5312839, A].

Відоме застосування похідних 1,4-бензоксазину як лікарського засобу для лікування захворювань, викликаних внутрішньоклітинним ацидозом при міокардальній ішемії [US, 5597820, A].

Відомий препарат гемодинамічної дії, що являє собою водний розчин декстрану з молекулярною масою 40000 з додаванням солей: натрію хлориду, калію хлориду, магнію хлориду, кальцію хлориду і натрію ацетату, для нормалізації кислотно-основної рівноваги та електролітного балансу [RU, 2185173, C2]. Велика концентрація набору солей порівняно з препаратами декстран 40 (USA) і декстран 70 (USA) краще компенсує дефіцит солей крові і міжтканинної рідини, ефективніше коректує метаболічний ацидоз. Припускають, що натрію ацетат при введенні в організм включається в обмін речовин і аніон CH_3COO^- перетворюється на воду та вуглекислий газ, а катіон Na^+ взаємодіє з недоокисненими кислотними продуктами метаболізму і відновлює рН середовища. Однак віднов-

лення рН середовища не завжди приводить до необоротного відновлення рН_i клітини.

Відоме застосування намациту (карбостимуліну), що містить бікарбонат, солі магнію, марганцю і цинку і цитрат натрію для інтегральної корекції метаболічного ацидозу, при цьому активність препарату обумовлена взаємодією вуглекислоти з ферментними білками, що приводить до зміни активності ферментів щодо комплексу реакцій карбоксилювання і декарбоксилювання в тканинах, іони магнію, марганцю і цинку активують карбоксилази, а цитрат натрію служить субстратом для реакцій циклу трикарбонових кислот, ліпогенезу [RU, 2014077, C1].

Відомий спосіб лікування хвороби Альцгеймера, викликаній порушенням бета-амілоїд-пептидного метаболізму, що є результатом внутрішньоклітинного ацидозу, або коливання рН від нормального значення рН 7,3 і кислотним внутрішньоклітинним рН між 5,0 і 7,0, що полягає у введенні пацієнту фармакологічно ефективної кількості лужної сполуки або буфера, здатного підняти внутрішньоклітинний рН від рН 7,0 до рН 7,1-7,4 і подолати гематоенцефалічний бар'єр, пройти крізь клітинну мембрану, зменшити концентрацію іонів водню і мати рКа від 6,8 до 11,4, а саме сполук з групи гуанідиноетан сульфату, гуанідиноетан сульфонові кислоти та інших [US, 5723496].

Відомий бікарбонат натрію, який застосовують при різних захворюваннях, що супроводжуються вираженим ацидозом, для боротьби з ацидозом при хірургічних втручаннях, а також застосовують як антацидний засіб при підвищеній кислотності шлункового соку, при виразковій хворобі шлунка і дванадцятипалої кишки. Однак при його застосуванні необхідно враховувати, що тривале його введення в організм може призвести до некомпенсованого алкалозу, супроводжуваному тяжкими порушеннями кислотно-основного стану крові.

Відомий препарат трисамін, що як активну речовину містить три(оксиметил)амінометан, який є антацидом системної дії [US, 5256660, A]. Застосовують трисамін при гострих і хронічних захворюваннях, які супроводжуються метаболічним і змішаним ацидозом. Препарат застосовують внутрішньовенно у вигляді 3,66%-ного розчину. Трисамін зв'язує велику кількість іонів H^+ і виводить їх з сечею, тому його застосовують тільки при нормальній функції нирок, з іншого боку, трисамін сприяє збільшенню вмісту іонів HCO_3^- в крові. Однак трисамін протипоказаний при порушенні видільної функції нирок і порушеннях функції печінки. Оскільки препарат викликає також пригнічення дихання, то хворим з недостатністю вентиляції легенів його вводять тільки в умовах керованого або допоміжного дихання.

В даний час в медичній практиці усунення метаболічного ацидозу здійснюють кількома етапами. На початковому етапі застосовують розчини бікарбонату натрію або трисамін.

На наступному етапі проводять заходи, спрямовані на нормалізацію гемодинаміки і газообміну, на поліпшення мікроциркуляції крові та обмінних процесів в організмі, корекцію електролітного дисбалансу, а головне - на усунення причини, що викликала зсув кислотно-основної рівноваги.

Відомий лікарський препарат "димефосфон", що містить як активну речовину диметилівий ефір 1,1-диметил-3-оксобутилфосфонові кислоти [Машковский М.Д. Лекарственные средства. М., Медицина, 1993, ч. II, с. 137-140], антацидна дія якого пов'язана з активацією метаболічних процесів, регуляцією кислотно-основного стану організму, в тому числі при пневмонії, гострих респіраторних захворюваннях. Однак при застосуванні препарату виникають диспепсичні розлади.

Розробка лікарських препаратів, що усувають внутрішньоклітинний метаболічний ацидоз і нормалізують внутрішньоклітинні процеси, є досить актуальною задачею.

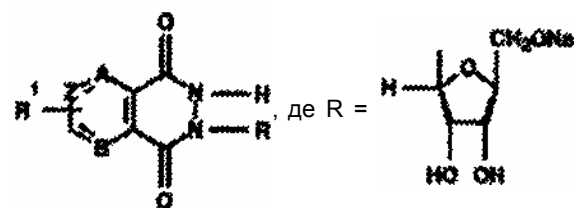
Метою даного винаходу є створення лікарського засобу для корекції порушень внутрішньоклітинних процесів.

При створенні винаходу було поставлене завдання створення лікарського засобу на основі сполук, що мають біологічну активність нормалізації кислотно-основного стану клітини за рахунок виводу з клітини надмірної кількості протонів і підвищення тим самим рН_i клітини, нормалізації діяльності ферментативних систем, нормалізації спрямованості та інтенсивності окисно-відновних процесів, здатність взаємодіяти з аденозинчутливими рецепторами на мембрані і всередині клітини, а також здатність зв'язувати вільні радикали, що надмірно утворюються.

Як біологічно активні сполуки, що мають необхідні для реалізації поставленого завдання властивості, були розглянуті похідні конденсованих піридазиндіонових систем, які, на думку авторів, можуть мати циклічний ізостеризм відносно аденозину, оскільки вони містять кільцеві системи, схожі з аденозином за розмірами і за характером електронної густини.

Автори припустили, що конденсовані піридазиндіонові системи завдяки схожій з аденозином будові можуть мати подібну реакційну здатність в організмі, здатні приєднувати β -D-рибофуранозні фрагменти, взаємодіяти з чутливими до аденозину рецепторами і проникати крізь клітинну мембрану, тобто можуть бути біологічними ізостерами аденозину. Одночасно вони є електрохімічно активними сполуками з достатньо низькими потенціалами відновлення і можуть приєднувати 2-4 протони і електрони, усуваючи тим самим внутрішньоклітинний метаболічний ацидоз.

Поставлене завдання було вирішене виявленням циклічних біоізостерів пуринової системи, що мають загальну формулу:



Li, Na, K,

$R^1 = -H, -NH_2, -Br, -Cl, -OH, -COOH,$

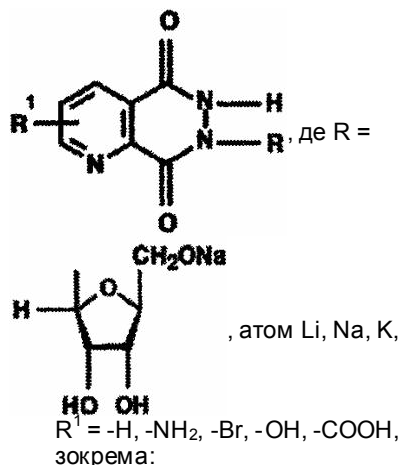
$B = -N= -CH=, Z = -CH= -N=$

$A = -N=$ при $B = -N= Z = -CH=,$

A = -CH= при B = -N= Z = -CH-,
 A = -CH= при B = -N= Z = -N=,
 A = -CH= при B = -CH= Z = -CH=,
 A = -CH= при B = -CH= Z = -N=,

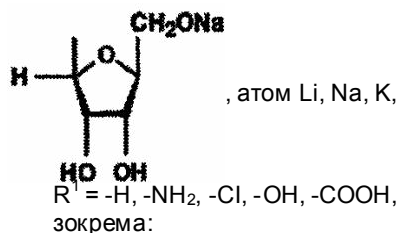
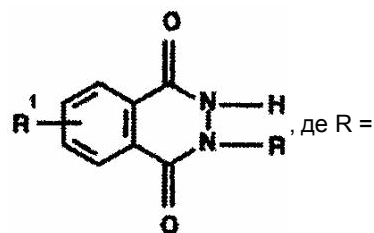
та їх фармакологічно прийнятних солей, що мають нормалізуючу дію на внутрішньоклітинні процеси.

Були синтезовані та досліджені похідні піридо[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону, циклічного біоізо-стеру похідних пуринової системи, в яких піридинове кільце сконденсоване з піридазиндіоновим кільцем, що мають загальну формулу:



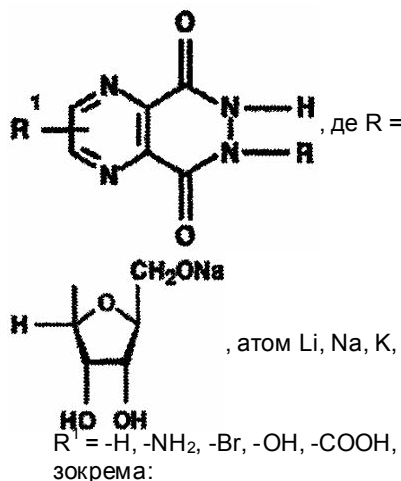
7-(β-D-рибофуранозил)піридо[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону натрієва сіль (1),
 4-аміно-7-(β-D-рибофуранозил)піридо[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону натрієва сіль (2),
 3-бром-7-(β-D-рибофуранозил)піридо[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону натрієва сіль (3),
 4-гідрокси-7-(β-D-рибофуранозил)піридо[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону динатрієва сіль (4),
 3-карбокси-7-(β-D-рибофуранозил)піридо[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону динатрієва сіль (5),
 піридо[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону літєва сіль (6),
 піридо[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону натрієва сіль (7),
 піридо[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону калієва сіль (8).

А також були синтезовані та досліджені похідні бензо[d]-3Н-піридазин-1,4-діону, циклічного біоізо-стеру похідних пуринової системи, в яких бензольне кільце сконденсоване з піридазиндіоновим кільцем, що мають загальну формулу:



2-(β-D-рибофуранозил)бензо[d]-3Н-піридазин-1,4-діону натрієва сіль (9),
 5-аміно-2-(β-D-рибофуранозил)бензо[d]-3Н-піридазин-1,4-діону натрієва сіль (10),
 6-аміно-2-(β-D-рибофуранозил)бензо[d]-3Н-піридазин-1,4-діону натрієва сіль (11),
 5-хлор-2-(β-D-рибофуранозил)бензо[d]-3Н-піридазин-1,4-діону натрієва сіль (12),
 5-гідрокси-2-(β-D-рибофуранозил)бензо[d]-3Н-піридазин-1,4-діону динатрієва сіль (13),
 5-аміно-бензо[d]-3Н-піридазин-1,4-діону літєва сіль (14),
 5-аміно-бензо[d]-3Н-піридазин-1,4-діону натрієва сіль (15),
 6-аміно-бензо[d]-3Н-піридазин-1,4-діону калієва сіль (16),
 5-гідрокси-бензо[d]-3Н-піридазин-1,4-діону динатрієва сіль (17),
 6-карбокси-бензо[d]-3Н-піридазин-1,4-діону динатрієва сіль (18).

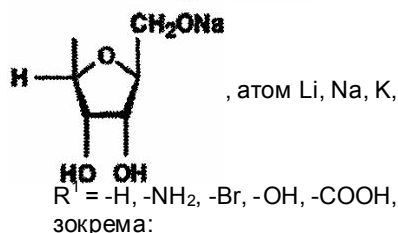
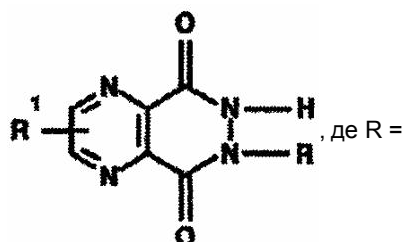
Були також синтезовані та досліджені похідні піразино[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону, циклічного біоізо-стеру(у) похідних пуринової системи, в яких піразинове кільце сконденсоване з піридазиндіоновим кільцем, які мають загальну формулу:



7-(β-D-рибофуранозил)піразино[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону натрієва сіль (19),
 2-аміно-7-(β-D-рибофуранозил)піразино[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону натрієва сіль (20),
 3-аміно-7-(β-D-рибофуранозил)піразино[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону натрієва сіль (21),
 3-бром-7-(β-D-рибофуранозил)піразино[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону натрієва сіль (22),
 2-гідрокси-7-(β-D-рибофуранозил)піразино[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону динатрієва сіль (23),

2-карбокси-7-(β-D)-рибофуранозилпіразино[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діонунатрієва сіль (24),
піразино[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону літєва сіль (25),
піразино[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону натрієва сіль (26),
3-бром-піразино[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону калієва сіль (27),
2-аміно-піразино[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону натрієва сіль (28).

Також були синтезовані та досліджені похідні піримідо[4,5-d]-6Н-піридазин-5,8-діону, циклічного біоізомеру похідних пуринової системи, в яких піримідинове кільце сконденсоване з піридазиндіоновим кільцем, що мають загальну формулу:



7-(β-D)-рибофуранозилпіримідо[4,5-d]-6Н-піридазин-5,8-діонунатрієва сіль (29),
2-аміно-7-(β-D)-рибофуранозилпіримідо[4,5-d]-6Н-піридазин-5,8-діонунатрієва сіль (30),
4-аміно-7-(β-D)-рибофуранозилпіримідо[4,5-d]-6Н-піридазин-5,8-діонунатрієва сіль (31),
2-бром-7-(β-D)-рибофуранозилпіримідо[4,5-d]-6Н-піридазин-5,8-діонунатрієва сіль (32),
4-гідрокси-7-(β-D)-рибофуранозилпіримідо[4,5-d]-6Н-піридазин-5,8-діонунатрієва сіль (33),

4-карбокси-7-(β-D)-рибофуранозилпіримідо[4,5-d]-6Н-піридазин-5,8-діонунатрієва сіль (34),
піримідо[4,5-d]-6Н-піридазин-5,8-діону літєва сіль (35),
2-аміно-піримідо[4,5-d]-6Н-піридазин-5,8-діонунатрієва сіль (36),
4-бром-піримідо[4,5-d]-6Н-піридазин-5,8-діонунатрієва сіль (37).

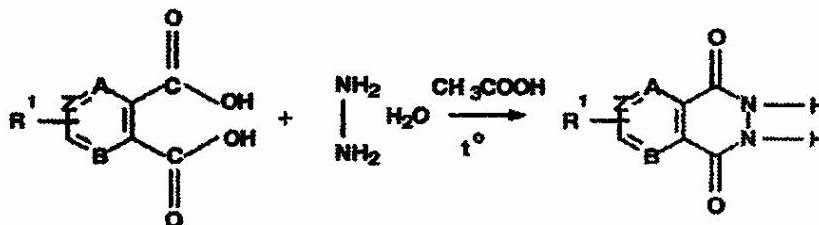
Сполуки 1-8, що є похідними піридо[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону, отримували конденсацією орто-дикарбоксизаміщених піридинів з гідразингідратом в середовищі оцтової кислоти [Taguchi Hiroshi. A new fluorometric assay method for guinolinic acid *Analytic Biochemistry*, 1983, 131 (1), p. 194-197].

Сполуки 9-18, що є похідними бензо[d]-3Н-піридазин-1,4-діону (фталазіндіону), отримували конденсацією орто-фталевої кислоти з гідразингідратом в середовищі оцтової кислоти [Huntress E.H., Stanley L.N., Parker A S The Preparation of 3-Aminophthalhydrazide for Use in the Demonstration of Chemiluminescence, *J Am. Chem. Soc.*, 1994, v 56, p. 241-242].

Сполуки 19-28, що є похідними піразино[2,3-d]-6Н-піридазин-5,8-діону, отримували конденсацією орто-дикарбоксизаміщених піразинів з гідразингідратом в середовищі оцтової кислоти [Zyczynska-Baloniak I., Czajka R., Zinkowska E Synthesis of Derivatives of 4-Hydroxypyrazine-[2,3-d]pyridazine-1-one *Polish Journal of Chemistry*. 1978, v. 52, p. 2461-2465; Komendy K., Ruff F. Pyridazines Condensed with a Heteroring. III., *Acta Chimica Hungarica*. 1990, 127 (2), p. 253-262].

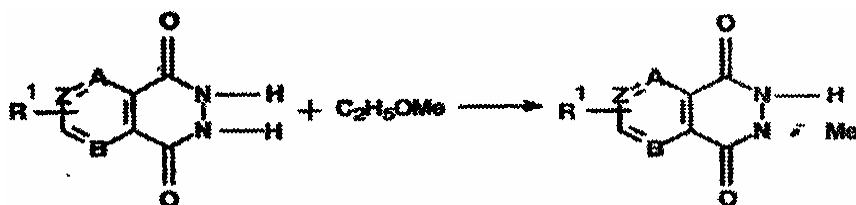
Сполуки 29-37, що є похідними піримідо[4,5-d]-6Н-піридазин-5,8-діону, отримували конденсацією орто-дикарбоксизаміщених піримідинів з гідразингідратом в середовищі оцтової кислоти [Yurugi S., Hieda M. Studies on the Synthesis of N- Heterocyclic Compounds. *Chemistry, Pharmaceutical Bull.*, 1972, v. 20 (7), p. 1522-1527, *ibid.*, p. 1513-1521].

Синтез зазначених сполук проводять в декілька етапів. На першому етапі здійснюють конденсацію орто-дикарбоксизаміщених гетероциклів (піридину, піразину, піримідину) або похідних фталевої кислоти з гідразингідратом в середовищі оцтової кислоти:



при A, B, Z = -NH= -CH= R¹ = -H, -NH₂, -Br, -Cl, -OH, -COOH.

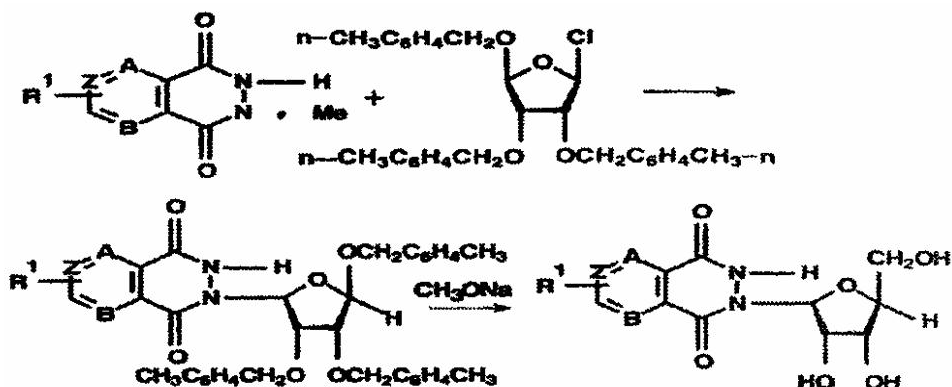
На другому етапі отримують натрієві, калієві, літєві солі відповідного конденсованого піридазиндіону взаємодією з відповідним етилатом:



На заключному етапі проводять конденсацію відповідної солі з 1-хлор-2,3,5-три-О-толуїл-β-D-рибофуранозою в середовищі безводного диметилформаміду (далі ДМФА) у присутності катализатора. Як катализатор використовують 15-краун-5 у

випадку солі Na або син-, цис-, антицидициклогексано-18-краун-6- у випадку солі K.

Зняття пара-толуїльного захисту проводять метилатом натрію.



Рибозилування солей гетероциклічних основ проводять за загальною методикою: До суміші 1,0мМ натрієвої солі гетероциклічної основи, 1,0мМ 15-краун-5 в 10,0мл сухого ДМФА в атмосфері осушеного аргону додають по краплям при перемішуванні 1,0мМ 1-хлор-2,3,5-три-О-толуїл-β-D-рибофуранози. Реакційну масу перемішують 6-10 годин при температурі 20°C. Потім додають 7,0мл 10%-ного розчину NaHCO₃ і перемішують 30 хвилин при 0°C. До отриманої суспензії додають 30,0мл хлороформу і потім відфільтровують через Nuffo Super Cel, органічний шар відокремлюють, промивають 10,0мл води і сушать Na₂SO₄. Отримані нуклеозиди хроматографують на силікагелі, елюють CHCl₃. Вихід нуклеозидів становить 45-65%.

Зняття гара-толуїльного захисту проводять за загальною методикою таким чином:

Розчин 0,32мМ нуклеозиду в суміші метанолу і діоксану у співвідношенні 5:1 охолоджують до 0°C і додають до нього 0,7мл 0,1М-ного розчину метил

ату натрію в метанолі і витримують в атмосфері аргону 24 години при температурі 6°C. Реакційну масу нейтралізують додаванням DOWEX 50 (H⁺) до pH 7,0, смолу відфільтровують. Кінцеві продукти виділяють з фільтрату хроматографією на силікагелі. Елюент являє собою суміш CHCl₃ і MeOH у співвідношенні 20:1. Вихід цільового продукту становить 66-85%.

Літієві, натрієві та калієві солі отримували змішуванням еквімолярних кількостей гетероциклічних сполук з водним розчином відповідних гідроксидів. Відгонку води здійснювали при зниженому тиску без нагріву аналогічно відомому способу отримання лужних і лужноземельних солей амінодигідрофалазиндіону [RU, 2169139, C1].

Будова синтезованих сполук була підтверджена даними елементного аналізу на приладі EA-11-08 ("Carlo Erba") і хроматомас-спектроскопії на хроматомас-спектрометрі "Agilent Technologies".

Таблиця 1

Результати мас-спектрометричного дослідження
та елементного аналізу сполук 1–37 згідно з винаходом

Номер Сполуки	(M+H) ⁺	Знайдено, %			Брутто-формула	Обчислено, %		
		C	H	N		C	H	N
1	295	45,60	3,90	13,12	C ₁₂ H ₁₂ N ₃ O ₆ Na	45,43	3,78	13,25
2	310	43,51	4,08	16,69	C ₁₂ H ₁₃ N ₄ O ₆ Na	43,37	3,92	16,87
3	374	36,30	2,84	10,56	C ₁₂ H ₁₁ BrN ₃ O ₆ Na	36,36	2,78	10,61
4	306	41,20	3,10	12,07	C ₁₂ H ₁₁ N ₃ O ₇ Na ₂	41,03	3,13	11,97
5	338	40,87	2,63	11,14	C ₁₃ H ₁₁ N ₃ O ₈ Na ₂	40,73	2,87	10,97
6	163	49,65	2,51	24,64	C ₇ H ₄ N ₃ O ₂ Li	49,70	2,37	24,85
7	163	45,48	2,24	22,63	C ₇ H ₄ N ₃ O ₂ Na	45,41	2,16	22,70
8	163	41,87	2,12	20,78	C ₇ H ₄ N ₃ O ₂ K	41,79	1,99	20,90
9	294	49,51	4,23	8,72	C ₁₃ H ₁₃ N ₂ O ₆ Na	49,37	4,11	8,86
10	309	47,04	4,28	12,74	C ₁₃ H ₁₄ N ₃ O ₆ Na	47,13	4,23	12,69
11	309	43,30	4,44	12,47	C ₁₃ H ₁₄ N ₃ O ₆ Na	47,13	4,23	12,69
12	329	44,55	3,60	8,12	C ₁₃ H ₁₂ ClN ₂ O ₆ Na	47,51	3,42	7,99
13	309	44,18	3,56	7,70	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₇ Na ₂	44,07	3,39	7,91
14	177	52,60	3,12	23,13	C ₈ H ₆ N ₃ O ₂ Li	52,46	3,28	22,95
15	177	48,40	3,20	21,15	C ₈ H ₆ N ₃ O ₂ Na	48,24	3,02	21,11
16	177	44,80	2,87	19,37	C ₈ H ₆ N ₃ O ₂ K	44,65	2,79	19,53
17	177	43,24	2,01	12,46	C ₈ H ₄ N ₂ O ₃ Na ₂	43,24	1,80	12,61
18	205	43,36	1,78	11,14	C ₉ H ₄ N ₂ O ₄ Na ₂	43,20	1,60	11,20
19	296	41,70	3,52	17,80	C ₁₁ H ₁₁ N ₄ O ₆ Na	41,51	3,46	17,61
20	311	39,75	3,55	21,12	C ₁₁ H ₁₂ N ₅ O ₆ Na	39,64	3,60	21,02
21	311	39,50	3,60	21,14	C ₁₁ H ₁₂ N ₅ O ₆ Na	39,64	3,60	21,02
22	375	33,40	2,47	14,15	C ₁₁ H ₁₀ BrN ₄ O ₆ Na	33,25	2,52	14,11
23	311	37,20	2,75	15,84	C ₁₁ H ₁₀ N ₄ O ₇ Na ₂	37,08	2,81	15,73
24	319	39,68	2,70	15,24	C ₁₂ H ₁₀ N ₄ O ₈ Na ₂	39,56	2,75	15,38
25	164	42,47	1,59	33,07	C ₆ H ₃ N ₄ O ₂ Li	42,35	1,76	32,94
26	164	38,65	1,50	30,27	C ₆ H ₃ N ₄ O ₂ Na	38,71	1,61	30,11
27	243	25,70	0,80	19,84	C ₆ H ₂ BrN ₄ O ₂ K	25,62	0,71	19,93
28	179	35,71	2,07	34,68	C ₆ H ₄ N ₅ O ₂ Na	35,82	1,99	34,83
29	296	41,56	3,64	17,55	C ₁₁ H ₁₁ N ₄ O ₆ Na	41,51	3,46	17,61
30	311	39,74	3,48	21,20	C ₁₁ H ₁₂ N ₅ O ₆ Na	39,64	3,60	21,02
31	311	39,60	3,72	21,13	C ₁₁ H ₁₂ N ₅ O ₆ Na	39,64	3,60	21,02
32	375	33,20	2,70	14,10	C ₁₁ H ₁₀ BrN ₄ O ₆ Na	33,25	2,52	14,11
33	311	37,00	2,94	15,57	C ₁₁ H ₁₀ N ₄ O ₇ Na ₂	37,08	2,81	15,73
34	319	39,60	2,67	15,50	C ₁₂ H ₁₀ N ₄ O ₈ Na ₂	39,56	2,75	15,38
35	164	42,30	1,91	33,07	C ₆ H ₃ N ₄ O ₂ Li	42,35	1,76	32,94
36	179	35,70	2,12	34,90	C ₆ H ₄ N ₅ O ₂ Na	35,82	1,99	34,83
37	243	25,47	0,87	20,06	C ₆ H ₂ BrN ₄ O ₂ K	25,62	0,71	19,93

Синтезовані сполуки являють собою безбарвні або жовтуваті кристалічні речовини з температурою плавлення більше 300°C.

Поставлене завдання було також вирішене розробкою фармацевтичної композиції, що містить як активний інгредієнт циклічні біоізостери похідних пуринової системи згідно з винаходом.

Далі винахід пояснюється викладом результатів проведених досліджень біологічної активності циклічних біоізостерів похідних пуринової системи згідно з винаходом, що не обмежують їх застосування і не виходять за межі формули винаходу, і кресленнями, що додаються, на яких:

Фіг.1а - калібрувальні криві залежності інтенсивностей флуоресцентності розчинів флуоросцеїну та клітин миші NIH 3Т3.

Фіг.1б - калібрувальна крива для визначення рН_i в клітинах миші NIH 3Т3.

Фіг.2 - залежність рН_i клітини від рН середовища.

Фіг.3 - зміна рН_i клітини при зміні рН середовища із сироваткою крові після введення в середовище сполук згідно з винаходом.

Фіг.4 - зміна рН_i клітини при зміні рН середовища без сироватки крові після введення в середовище сполук згідно з винаходом.

Фіг.5 - зміна рН_i фібробластів у прикріпленому розпластаному стані після введення в середовище сполук згідно з винаходом.

Фіг.6 - інтенсивність хемілюмінесценції І_h суспензії еритроцитів після інкубування зі сполуками згідно з винаходом при 37°C і при 4°C.

Фіг.7а - інтенсивність хемілюмінесценції І_h суспензії еритроцитів після інкубування зі сполуками згідно з винаходом в концентраціях 10⁻¹¹-10⁻⁸М.

Фіг.7б - інтенсивність хемілюмінесценції І_h суспензії еритроцитів після інкубування зі сполуками згідно з винаходом і додавання аденозину.

Фіг.8 - інтенсивність хемілюмінесценції І_h клітин селезінки після інкубування при 37°C і при 4°C зі сполуками згідно з винаходом.

Фіг.9 - вплив сполук згідно з винаходом на активність супероксиддисмутази.

Фіг.10 - вплив сполук згідно з винаходом на утворення супероксидаіон радикалів в клітинах.

Фіг.11 - вплив сполук згідно з винаходом на активність каталази.

Фіг.12 - вплив сполук згідно з винаходом на активність пероксидази еритроцитів.

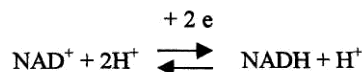
Фіг.13 - вплив сполук згідно з винаходом на активність NOC.

З опублікованих раніше даних відомо, що циклічні гідразиди або не піддаються полярографічному відновленню, або відновлюються в достатньо жорстких кислих або лужних умовах при достатньо високих потенціалах півхвилі E_{1/2}>1,0В [Seo E., Kuwana T. Polarography of cyclic Hydrazides. J. Electroanal. Chem., 1963, v. 6, p. 417-418; Lund H. Polarographic and electropreparative reduction of 1(2H)-phthalazinones, 2,3-dihydro-1,4-phthalazindiones and related compounds. Coll. Czechoslow. Chem. Com., 1965, v. 30, p. 4237-4249].

Однак авторами було встановлено, що сполуки 1-37 згідно з винаходом, які є солями лужних металів циклічних гідразидів, мають здатність до

електрохімічного відновлення, причому при значеннях потенціалів півхвилі E_{1/2} від мінус 0,09В до мінус 0,2В.

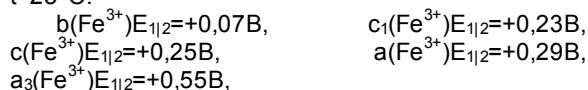
Для порівняння можна навести приклад електрохімічного відновлення коферменту NAD⁺, здійснюваний при E_{1/2}=-0,32В, в якому в молекулу NAD⁺ включаються 2 електрони і один протон, а другий протон залишається в середовищі:



У флавінових коферментах FAD⁺, активною частиною молекули якого є ізо алоксазинове кільце, в результаті відновлення при потенціалі E_{1/2}=-0,05В найчастіше спостерігається приєднання двох протонів і двох електронів одночасно.

Відновлені форми цих коферментів NADH і FADH транспортують водень і електрони до дихального ланцюга мітохондрій або інших енергоспрязувальних мембран.

В дихальному ланцюгу мітохондрій розташовані цитохроми b, c₁, c, а та a₃ в порядку зростання абсолютної величини їхнього окисно-відновного потенціалу, установленого в умовах рН 7,0, t=25°C:



які відіграють важливу роль в процесі тканинного дихання.

Цитохром а являє собою термінальну ділянку дихального ланцюга - цитохромоксидазу, яка здійснює окиснення цитохрому с з утворенням води. Елементарний акт являє собою двоелектронне відновлення одного атома кисню, при цьому кожна молекула кисню взаємодіє з двома електронотранспортними ланцюгами. При транспортуванні кожної пари електронів у внутрішньомітохондріальному просторі може накопичуватися до 6 протонів. Зміна співвідношення кількості протонів і електронів може призводити до порушення процесів тканинного дихання.

Авторами було встановлено, що кожна молекула сполук 1-37 згідно з винаходом здатна проникати у внутрішньоклітинний простір і, маючи окисно-відновний потенціал, порівнянний з потенціалами електрохімічного відновлення наведених вище процесів, необоротно приєднувати до 4 електронів і протонів, сприяючи тим самим інтенсифікації процесів тканинного дихання і значному зменшенню метаболічного внутрішньоклітинного ацидозу.

1. Електрохімічна активність сполук згідно з винаходом.

Були проведені дослідження електрохімічної активності сполук згідно з винаходом.

Були досліджені водні розчини сполук 1, 5, 7, 10, 15, 18, 23, 25, 27, 33, 35, 36 згідно з винаходом з початковою концентрацією 1·10⁻²М/л і, для порівняння, розчин препарату "димефосфон" в такій самій початковій концентрації.

Дослідження проводили на універсальному полярографі ПУ-1 з двокоординатним самописом типу "ЛКД" з використанням триелектродної термостатованої полярографічної комірки і ртутного

краплинного електрода (РКЕ) з примусовим відри-
вом краплі і періодом крапання 0,5сек. Як допомі-
жний електрод використовували платиновий дріт,
як електрод порівняння - насичений каломельний
електрод (НКЕ).

Як фон використовували 2,0%-ні розчини хло-
риду натрію з рН 7,0, 7,2, 7,4, 7,6; значення рН
фоновому розчину коректували розчином гідрокси-
ду натрію. В полярографічну комірку наливали
5,0мл фоновому розчину і протягом 5 хвилин про-
дували азотом для видалення розчиненого кисню.
Потім до фоновому розчину додавали 0,5мл роз-
чину досліджуваної речовини і здійснювали запис
полярограми у вигляді хвилі відновлення. Концен-
трація сполук у полярографічній комірці складала
 $9 \cdot 10^{-4} \text{M}$.

Вимірювання рН здійснювали на рН-метрі з
точністю плюс-мінус 0,05 одиниць рН. Полярогра-

фічні вимірювання проводили при температурі
37°C. Запис полярограм досліджуваних сполук
здійснювали в режимі постійного струму зі швидкі-
стю розгортки потенціалу 10,0мВ/сек, прямий хід -
від потенціалу 0 до мінус 0,5В, зворотний хід - від
мінус 0,5В до 0. Чутливість за струмом становила
5,0мкА. Масштаб за координатою потенціалів -
50,0мВ/см. Значення потенціалів півхвилі $E_{1/2}$ до-
сліджуваних сполук наведені відносно потенціалу
НКЕ.

Параметри полярограми - граничний струм i_{lim}
та $E_{1/2}$ визначали графічним методом. Кількість
електронів, що беруть участь а реакції, розрахову-
вали на основі аналізу хвилі відновлення за рів-
нянням Гейровського-Ільковича.

Середні величини параметрів хвилі віднов-
лення досліджуваних сполук при прямому ході
запису наведені в табл. 2.

Таблиця 2

Параметри полярограм сполук

№ сполуки	рН	7,0	7,2	7,4	7,6
1, 5, 7	i , мкА	$0,26 \pm 0,04$	$0,31 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,03$	$0,30 \pm 0,01$
—"	$-E_{1/2}$, В	$0,11 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,03$	$0,105 \pm 0,01$	$0,105 \pm 0,02$
10, 15, 18	i , мкА	$0,23 \pm 0,03$	$0,30 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,02$
—"	$-E_{1/2}$, В	$0,092 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,01$	$0,092 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,01$
23, 25, 27	i , мкА	$0,32 \pm 0,03$	$0,33 \pm 0,04$	$0,34 \pm 0,03$	$0,34 \pm 0,02$
—"	$-E_{1/2}$, В	$0,16 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,02$	$0,175 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,015$
33, 35, 36	i , мкА	$0,30 \pm 0,05$	$0,26 \pm 0,02$	$0,30 \pm 0,03$	$0,30 \pm 0,02$
—"	$-E_{1/2}$, В	$0,08 \pm 0,02$	$0,085 \pm 0,015$	$0,085 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,02$
Димефосфон	i , мкА	$0,10 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,03$	$0,11 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,02$
—"	$-E_{1/2}$, В	$0,175 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,01$

В процесі експериментів помітили, що, порів-
няно зі значеннями кривих прямого ходу, при за-
писі полярограм зворотного ходу значення потен-
ціалу півхвилі було більш позитивним на 25,0мВ
для сполук 1, 5, 7, на 30,0мВ для сполук 10, 15, 18,
на 20,0мВ для сполук 23, 25, 27, на 27,0мВ для
сполук 33, 35, 36 і на 50,0мВ для препарату "ди-
мефосфон".

Наведені дані свідчать про необоротність про-
цесу електрохімічного відновлення цих сполук.

Розрахунок кількості електронів, що беруть
участь в реакції відновлення, здійснювали за рів-
нянням Гейровського-Ільковича:

$$E = E_{1/2} - \frac{2,3RT}{nF} \lg \frac{i}{i_{\text{lim}} - i}$$

де n - кількість електронів;

i - поточне значення струму хвилі, мкА;

i_{lim} - значення граничного струму хвилі, мкА;

F - число Фарадея, що дорівнює 96500К;

R - універсальна газова стала, що дорівнює
8,31Джоуль/моль.К;

T - температура, К;

E , $E_{1/2}$ - потенціали, В.

В результаті розрахунків було встановлено,
що при відновленні:

- для сполук 1, 5, 7 кількість електронів стано-
вить 3,72;

- для сполук 10, 15, 18 - 4,09;

- для сполук 23, 25, 27 - 3,72;

- для сполук 33, 35, 36 - 3,5;

- для димефосфону - 1,6,

тобто при відновленні досліджуваних сполук
згідно з винаходом витрачаються 4 електрони, а

при відновленні димефосфону - 2 електрони, з чого можна зробити висновок, що сполуки згідно з винаходом виявляють більшу, ніж димефосфон, здатність до необоротного приєднання електронів.

Були проведені дослідження біологічної активності сполук згідно з винаходом.

2. Вплив сполук згідно з винаходом на рН_i клітини.

Відомо багато механізмів, які забезпечують регуляцію рН_i, в тому числі Na⁺/H⁺ обмінники, локалізовані в плазматичній мембрані, Na-залежний і Na-незалежний HCO₃⁻/Cl⁻ обмінники, що забезпечують збільшення рН_i цитозолу клітини, а також Cl⁻/HCO₃⁻ обмінники, що забезпечують зниження рН_i цитозолу, переносники комплексів іонів Na⁺ з монокарбоксилатами, протонні помпи H⁺-ATF-ази та інші [Ganz M.B. et al. Argininvasopression enhances pH_i regulation in the presence of HCO₃⁻ by stimulating three acid-base transport systems. *Nature*, 1989, v. 337, p. 648-651].

У зв'язку з подібністю біохімічних механізмів різних типів клітин можна зробити висновок, що, якщо якийсь агент змінює внутрішньоклітинний рН_i у певному типі клітин, то, в зв'язку з подібністю механізмів регуляції рН_i, цей самий агент буде викликати зміну рН_i і в інших типах клітин. Зокрема, якщо сполуки згідно з винаходом викликають зміну рН_i фібробластів, то вони можуть впливати на рН_i макрофагів і нейтрофілів.

Відомо, що активація макрофагів пов'язана з продукуванням і екструзією протонів, з активацією систем транспортування протонів з клітини за допомогою протонних pomp, Na⁺/H⁺-обмінників, систем транспортування бікарбонату [Rogachev B., Hausmann M.J., Julzari R., Weiler H., Holmes C., Falct D., Chaimovitz C., Douvdevani A. Effect of bicarbonate-based dialysis solution on intracellular pH (pH_i) and TNF-alpha production by peritoneal macrophages. *Perit. Dial. Int.*, 1997, Nov-Dec, 17 (6), p. 543-553; Bidani A., Heming T.A. Effect of concanavalin A on Na⁺-dependent and Na⁺-independent mechanism for H⁺ extrusion in alveolar macrophages. *Lung.*, 1998, 176 (1), p. 25-31; Swallow C.J., Grinstein S., Sudsbury R.A., Rotstein O.D. Relative roles of Na⁺/H⁺ exchange and vacuolar-type H⁺ ATPases in regulating cytoplasmic pH and function in murine peritoneal macrophages. *J. Cell. Physiol.*, 1993, 157(3), p. 453-460].

Наприклад, активація механізмів підвищення рН_i цитозолу клітини, наприклад Na⁺/H⁺-антипортера, необхідна для підвищення активності нейтрофілів, в тому числі їхньої мікробіцидної активності, оскільки зниження рН_i цитозолу блокує функціональну активність нейтрофілів.

2.1. Вплив сполук згідно з винаходом на рН_i фібробластів.

Був вивчений вплив сполук згідно з винаходом на внутрішньоклітинний рН_i ембріональних фібробластів миші NIH-3T3, отриманих із Всеросійської колекції клітинних культур Інституту цитології РАН, Санкт-Петербург. Клітини вирощували в середовищі DMEM (Sigma), яка містить 2,2г/л бікарбонату натрію з додаванням 80,0мкг/мл гентаміцину і 10,0%-ної ембріональної телячої сироватки, при температурі 37°C в атмосфері, що містить 5,0% діоксиду вуглецю. Для дослідів використовували

також середовище, забуферене 5,0мМ HEPES та 15,0мМ бікарбонату без сироватки або з додаванням 5,0% сироватки. Підрахунок клітин здійснювали за допомогою гемоцитометра. Частку клітин, що загинули, визначали за забарвленням трипановим синім.

Вимірювання внутрішньоклітинного рН_i проводили за допомогою барвників FDA (Sigma) і BCECF-AM (Calbiochem) на мікроспектрофлуориметрі за відомою методикою [Кошевой Ю.В., Акатов В.С., Грובה М.Е. Микроспектрофлуориметр для измерения внутриклеточного pH (ММКрН). Приборы и оборудование для исследований в области физико-химической биологии и биотехнологии. Пушино, 1990, с. 8-14].

Клітини при температурі 37°C забарвлювали протягом 5 хвилин 5,0мкМ FDA, який безпосередньо перед забарвлюванням готували з 10,0мМ розчину в ацетоні шляхом розведення протягом 30 хвилин у фосфатному буфері до 0,1мМ, або 2,0мкМ 1,0мМ-ного розчину BCECF-AM в DMSO.

Використовували двоххвильовий метод визначення рН_i щодо інтенсивностей флуоресценції клітин на двох довжинах хвиль [Акатов В.С. і др. Внутриклеточный pH и субстратная зависимость пролиферации фибробластов китайского хомячка. *Цитология*, 1991, 33 (7), с. 86-94]. Флуоресценцію викликали світлом з $\lambda=490\text{нм}$, емісію реєстрували одночасно за допомогою двох фотопомножувачів на довжинах хвиль $\lambda=535\text{нм}$, $\lambda=570\text{нм}$. Визначали значення K - відношення флуоресценції на двох довжинах хвиль з відніманням фонові флуоресценції середовища безпосередньо біля досліджуваних клітин, для 40-60 окремих клітин, яке потім усереднювали з визначенням похибки вимірювання. Використовували термостатований столик, який дозволяє здійснювати вимірювання при температурі 37°C Враховували фотодинамічне пошкодження забарвлених клітин при тривалому безперервному освітленні збуджувальним світлом. Показання знімали з ділянки препарату, експонованого не більше 5 хвилин.

Калібрування приладів

Калібрувальні криві для визначення абсолютних значень рН_i за величиною K будували за методикою Томаса [Thomas J.A., Bushbaum R.N., Zimniak A., Racker E. Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probe generated in situ. *Biochemistry*, 1979, v. 18, p. 2210-2218], для чого забарвлені клітини, оброблені протягом 5-10 хвилин карбоксисилотою нігеріцином (Calbiochem) в концентрації 5-10мкг/мл, поміщали в розчин з високим вмістом калію (130мМ KCl, 1,0мМ MgCl₂, 20,0мМ HEPES) і значеннями рН від 6,2 до 7,6. Виміряли значення K в середовищах з різним рН, вважаючи, що рН_i клітин співпадає з рН середовища внаслідок дії нігеріцину, який обмінює іони калію на протони і при високому вмісті калію в середовищі врівноважує значення рН середовища і клітин. Для контролю стабільності показань приладу використовували калібрувальні криві, побудовані за флуоресценції того самого середовища з додаванням 5,0мкМ флуоресцеїну або BCECF.

Коректність методики підтверджували в досліді по вимірюванню значень рН_i клітин, оброблених

протонофором моненсином, який підвищує рН клітин за рахунок обміну іонів натрію на протони, а також по встановленню залежності змін рН від зміни рН середовища. Величину рН середовища (рН₀) установлювали в середовищі DMEM без сироватки, яке містило 5мМ HEPES і 15мМ бікарбонату, шляхом титрування HCl або KOH. Час інкубації клітин в середовищі із заданим значенням рН становило не менше 10 хвилин, що є достатнім часом для встановлення рівноваги рН клітин з рН середовища [Li J., Eastman A. Apoptosis in an interleukin-2-dependent cytotoxic T-lymphocyte cell line in associated with intracellular acidification. J. Biol. Chem., 1995, v. 270, p. 3203-3211].

На графіку Фіг.1а представлені калібрувальні залежності величини K - відношення інтенсивностей флуоресценції при 530 і 570нм розчинів флуоресцеїну, які мають рН в діапазоні 6,4-7,5 (крива 1), і клітин миші NIH 3T3, навантажених FDA і поміщених у розчини, що містять KCl, нігерицин і забеферені HEPES в діапазоні рН 6,5-7,5 (крива 2). Як видно з графіків, калібрувальні залежності для клітин NIH 3T3 зсунуті вправо на 0,1 одиниць рН відносно калібрувальних кривих розчинів флуоресцеїну. По мірі вимірювання впливу сполук згідно з винаходом на рН контролювали сталість калібрування приладу по розчинах флуоресцеїну, а перерахування значень K в рН для клітин, навантажених FDA, здійснювали по кривій 2. Протягом одного дня калібрування зберігалося з точністю $\pm 0,05$ одиниць рН, а протягом місяця роботи - з точністю $\pm 0,1$ одиниць рН.

На графіку Фіг.1б показане калібрування для клітин, навантажених барвником BCECF-AM, поміщених в розчин з KCl, нагерицином і буфером HEPES (рН 6,5-7,5). Цю калібрувальну залежність використовували для визначення рН, в клітинах, навантажених BCECF-AM. При цьому використовували різні барвники, оскільки відомо, що при забарвленні FDA може показувати значення рН не тільки цитозолу, але й мітохондрій, тоді як BCECF-AM є індикатором рН, головним чином, цитозолу.

2.1.1. Оцінка залежності рН фібробластів від рН позаклітинного середовища.

Для оцінки можливого впливу сполук згідно з винаходом на підвищення рН клітини за рахунок підвищення рН середовища вивчали залежність рН фібробластів від рН середовища.

Клітини забарвлювали барвником BCECF-AM і виміряли рН після 10 хвилин інкубації в середовищі з відповідним значенням рН.

На графіку Фіг.2 показана залежність рН фібробластів мишей NIH 3T3 від рН середовища. Результати досліджень показали, що в оптимальному для клітинних процесів фізіологічному діапазоні рН середовища від 6,9-7,0 до 7,4-7,5 рН підтримується на постійному рівні. По мірі зменшення рН середовища нижче 6,9 рН падає, і при цьому клітини не здатні підтримувати рівень рН в оптимальному фізіологічному діапазоні.

Також було встановлено, що при рН середовища вище оптимального фізіологічного діапазону величина рН не зростає, а падає, що можна пояснити включенням якихось адаптаційних механізмів клітини. І тільки при сублетальних для клітин зна-

ченнях рН середовища приблизно 8,5 або більше в клітині спостерігається підйом рН до оптимальних значень і вище (рН, 6,9-7,1).

Відомо, що сироватка крові містить ростові фактори, які здатні викликати підйом рН. Щоб оцінити стан і можливості приладу, а також для порівняння з дією препарату, оцінювали вплив сироватки на величину рН фібробластів у суспензії. Для цього виміряли рН перед доданням і через 20 хвилин після додання 10% сироватки. Виявлено, що після додання сироватки рН підвищувався на 0,15 одиниць. За сукупністю 11 дослідів величина рН фібробластів у суспензії із сироваткою становила $6,94 \pm 0,01$ (12 вимірювань), а без сироватки - $6,85 \pm 0,01$ (14 вимірювань). Вимірювання здійснювали з використанням FDA і BCECF-AM.

Як відомо, Na^+ -іонофор моненсин викликає підсилене надходження в клітини Na^+ і вихід протонів, що веде до зростання рН. Наприклад, в клітинах мишей NSO і NIH 3T3 введення 1-5мкМ моненсину протягом 15-20 хвилин викликає підвищення рН, на 0,2 одиниць [Соловьева М.Е., Акатов В.С., Леценко В.В., Кудряцев В.А. Механизм гибели клеток миеломы NS/O в культуре. Известия РАН, 1998, с. 194-189], що добре узгоджується з даними літератури [Zhu W.-H., Loh T.-T. Effects of Na^+/H^+ antiport and intracellular pH in the regulation of HL-60 cell apoptosis. Biochem. Biophys. Acta, 1995, v. 1269, p. 122-128]. При перевірці цього результату помітили, що додання в середовище з сироваткою 10мкМ моненсину викликає зростання рН на 0,12 одиниць.

Отримані результати про вплив сироватки і моненсину на рН показують достовірність показань приладу і служать орієнтиром для порівняння ефектів, що їх викликають сполуки згідно з винаходом.

2.1.2. Дослідження впливу сполук згідно з винаходом на рН фібробластів.

На діаграмі Фіг.3 представлені результати досліджень зміни ΔpH фібробластів NIH3T3 в ростовому середовищі DME, що містить 10,0% сироватки крові (область 1), через 20 хвилин після додання в це середовище сполуки зі сполук 7, 15, 18, 23, 35, 36 в різних концентраціях: 0,02мкг/мл (область 3), 0,2мкг/мл (область 4), 2,0мкг/мл (область 5), 20,0мкг/мл (область 6), зліва направо, відповідно, величини ΔpH при введенні в середовище сполук 7, 15, 18, 23, 35, 36 і, для порівняння, при введенні в середовище 10мкМ моненсину (область 2).

Установлено, що сполуки згідно з винаходом в концентрації 0,02мкг/мл не викликали підвищення рН. При концентрації сполук 20,0мкг/мл зростання складало в середньому 0,05 одиниць рН, але достовірно не відрізнялося від нуля через великий розкид результатів. При концентрації 0,2 і 2,0мкг/мл сполуки викликали достовірне збільшення рН, цитозолу клітини в середньому на 0,10 і 0,12 одиниць рН, відповідно, аналогічне підвищення, яке спостерігали при додаванні сироватки або моненсину.

На діаграмі Фіг.4 показані результати досліджень зміни рН клітин через 20 хвилин після додання таких самих сполук в концентраціях 0,02мкг/мл (область 1 діаграми), 0,2мкг/мл (об-

ласть 2), 2,0мкг/мл (область 3), 20,0мкг/мл (область 4), 200мкг/мл (область 5) і 1000мкг/мл (область 6), відповідно зліва направо, при введенні сполук 7, 15, 18, 23, 35, 36 в середовище DME без сироватки крові при відсутності розчинних в середовищі ростових факторів, цитокінів. В цих умовах досліджували сполуки в концентрації 2,0 і 20,0мкг/мл достовірно підвищували рН_i в середньому на 0,08 одиниць рН і не було виявлено достовірного впливу на рН_i сполук згідно з винаходом при концентрації 0,02, 0,2, 200 і 1000мкг/мл.

На діаграмі Фіг.5 показані результати досліджень впливу введення в середовище сполук згідно з винаходом в концентраціях 2,0мкг/мл (область 2) і 20,0мкг/мл (область 3) на рН_i фібробластів у прикріпленому розпластаному стані в області 2 і 3 зліва направо зміна відповідно для сполук 7, 15, 18, 23, 35, 36 і, для порівняння, - вплив уведеної 10,0мкМ моненсину (область 1). Це дослідження виконали тому, що в умовах *in vivo* фібробласти зазвичай прикріплюються і розпластаються на елементах тканинного матриксу. Виявилось, що в цьому випадку досліджувані сполуки в концентрації 2,0 і 20,0мкг/мл також викликають достовірне підвищення рН_i в середньому на 0,10 і 0,07 одиниць рН, аналогічне підвищенню, яке спостерігається під впливом моненсину.

Висновки

Отримані результати показують, що в середовищі з сироваткою крові, у присутності ростових факторів і цитокінів, сполуки 7, 15, 18, 23, 35, 36 згідно з винаходом викликають достовірне підвищення рН_i цитозолу ембріональних фібробластів мишей лінії NIH 3T3: в концентраціях 0,2мкг/мл - в середньому на 0,1 одиниць рН, а в концентраціях 2,0мкг/мл - в середньому на 0,12 одиниць рН, і не ініціюють зміни рН_i при концентрації 0,02 і 20,0мкг/мл. Величина зростання рН_i, викликана введенням сполук згідно з винаходом, порівнянна з тією, що спостерігається при дії ростових факторів сироватки крові або іонофора моненсину - відомого агента, що викликає збільшення рН_i цитозолу.

В середовищі без сироватки крові сполуки згідно з винаходом в концентрації 2,0мкг/мл і в концентрації 20,0мкг/мл достовірно підвищували рН_i фібробластів миші лінії NIH 3T3 в середньому на 0,08 одиниць рН і не було виявлено достовірного впливу на рН_i сполук згідно з винаходом в концентраціях 0,02, 0,20, 200 і 1000мкг/мл.

Сполуки згідно з винаходом в концентрації 2,0мкг/мл і в концентрації 20,0мкг/мл достовірно індукували збільшення рН_i цитозолу прикріплених до позаклітинного матриксу фібробластів миші лінії NIH 3T3 в середньому на 0,08 одиниць рН.

Всі сполуки згідно з винаходом в концентрації принаймні до 2,0мкг/мл не викликали зміни рН середовища з сироваткою крові, і їхній вплив на рН_i фібробластів не пов'язаний зі зміненням ними рН середовища.

Додавання сполук згідно з винаходом в концентрації до 2,0мкг/мл в середовище з 10,0% сироватки при початковому рН середовища 7,2±0,1 не викликало підвищення рН середовища при вимірюванні з точністю до 0,03 одиниць рН.

Таким чином, показано, що сполуки згідно з винаходом в концентраціях 0,2, 2,0, 20мкг/мл викликають підвищення рН_i цитозолу фібробластів як у прикріпленому стані, так і в суспензії, незалежно від наявності в середовищі ростових факторів і цитокінів сироватки крові. Величина підвищення рН_i, викликана цими сполуками, порівнянна з величиною, яка спостерігається при дії ростових факторів сироватки або іонофора моненсину - відомого агента підвищення рН цитоплазми.

3. Взаємодія сполук згідно з винаходом з аденосинчувливими рецепторами.

При порівняльному аналізі хімічної структури сполук згідно з винаходом - похідних бензо[d]піридазиндіону, піридо[2,3-d]піридазиндіону, піразино[2,3-d]піридазиндіону і піримідо[4,5-d]піридазиндіону - були зроблені припущення про циклічний ізостеризм цих сполук та інших похідних пуринової системи - аденіну, гуаніну, гіпоксантину. Аналіз їхньої структури дозволяє зробити висновок про те, що всі перелічені похідні є конденсованими гетероциклічними сполуками, що мають схожий розподіл електронної густини. Моделі Стюарта-Бріглеба та описані вище реакції рибозилування сполук згідно з винаходом переконливо доводять, що β-d-рибофуранозний фрагмент може приєднуватися до атома азоту піридазиндіонового фрагменту будь-якого з перелічених гетероциклів. Отримані дані дозволили припустити, що сполуки згідно з винаходом можуть мати і схожу з похідними пуринової системи біологічну активність, зокрема мати ізотропність до аденосинчувливих рецепторів, а відмінності, що є в структурі і розподілі π-електронної хмари молекул, дозволяють припускати наявність додаткової біологічної активності, якої не мають похідні пуринової системи - аденін, гуанін, гіпоксантин.

3.1. Взаємодія сполук згідно з винаходом з аденосинчувливими рецепторами тромбоцитів.

Одним з прикладів, що підтверджують вірогідну подібність структури сполук згідно з винаходом до структури аденозину, є зменшення агрегації тромбоцитів.

В даний час як засоби, що пригнічують агрегацію тромбоцитів і поліпшують мікроциркуляцію, відома незначна кількість лікарських препаратів, наприклад ацетилсаліцилова кислота, дипіридабол, індобуфен, пентоксифілін, клопідогрел і тиклопідин. При цьому ефективність їх не у всіх випадках буває достатньо високою, а використання їх супроводжується побічними проявами через їхню ульцерогенність, гепатотоксичність, алергізувальні властивості та інші небажані ефекти.

Були проведені дослідження впливу сполук згідно з винаходом на агрегацію тромбоцитів, індуковану попереднім введенням розчину індуктора агрегації, при конкуруючому введенні сполук згідно з винаходом.

Агрегація тромбоцитів вивчалася методом Борна, в основі якого лежить визначення змін оптичної густини плазми, збагаченої тромбоцитами, після її інкубації з індуктором агрегації.

Як індуктор агрегації була вибрана аденозиндифосфорна кислота (ADP), визнана ендегенним фактором агрегації. Використовували зразок (ре-

естраційний номер 885) фірми Sigma Diagnostics (USA) в кінцевій концентрації 10^{-5} М.

ADP, вивільняючись з тромбоцитів на початкових етапах клітинного гемостазу, ініціює утворення необоротного конгломерату кров'яних пластинок і є одним з інтеграторів різних шляхів збільшення кількості тромбоцитарних агрегатів фосфоінозитольний шлях, вивільнення кальцію, циклічних мононуклеотидів, активація кальмодуліну, та інших шляхів.

Експерименти здійснювали на кроликах-самцях породи "Шиншила" масою $2,7 \pm 0,3$ кг. Напередодні, за 18-24 години до експерименту, їх позбавляли корму, зберігаючи вільний доступ до води.

Для отримання плазми, збагаченої тромбоцитами, з надрізу крайової вени вуха кролика забирали кров, стабілізували її 3,8%-ним розчином цитрату натрію у співвідношенні 9:1 і центрифугували при 200г (1000 об/хвил) протягом 10 хвилин Верхній надосадовий шар, збагачений тромбоцитами, переносили автоматичною піпеткою в силіконову пробірку і зберігали при 37°C . Плазма, багата на тромбоцити, містила в середньому 3×10^8 кров'яних пластинок в 1,0л. Якщо ця кількість була більше зазначених 3×10^8 кров'яних пластинок віл, дану пробу розводили до потрібної концентрації плазмою, позбавленою тромбоцитів, яку отримували центрифугуванням крові при 650г протягом 10 хвилин.

Заміри оптичної густини зразків проводили на двоканальному агрегометрі фірми "Chrono-log"

(США). Кювету, куди вносили 490мкл плазми, багатої на тромбоцити, поміщали в прилад, опускали в неї магнітну мішалку, покриту тефлоном. Реєстрували показник максимальної амплітуди агрегації МА, виражений у відсотках падіння оптичної густини плазми під впливом індуктора агрегації. Показник МА, який є контролем, порівнювали з МА плазми, інкубованої протягом 3 хвилин з різними концентраціями сполук: від 10^{-3} до 10^{-7} М у дослідах in vitro, або плазми, отриманої через 15, 30, 60 і 120 хвилин після внутрішньовенового введення різних доз сполук у дослідах in vivo

Процес агрегації тромбоцитів реєстрували за допомогою комп'ютера, при цьому на екрані монітора були представлені криві, що відображали зміни оптичної густини багатої на тромбоцити плазми, яку приймали за еталон 100% порівняно з оптичною густиною безтромбоцитарної плазми, прийнятої за 0% вмісту тромбоцитів

3.1.1. Дослідження in vitro.

В умовах in vitro в кювету із збагаченою тромбоцитами плазмою крові спочатку вводили індуктор агрегації ADP в концентрації 10^{-5} М, інкубували протягом 3 хвилин, потім додавали безпосередньо в кювету сполуки згідно з винаходом їхню дію на агрегацію тромбоцитів вивчали після 3-хвилинного інкубування при широкому діапазоні концентрацій від 10^{-3} до 10^{-7} М, аж до мінімальної концентрації 10^{-7} М, яка не викликає ефекту пригнічення агрегації. Результати досліджень наведені в табл. 3.

Таблиця 3

Вплив сполук згідно з винаходом на ADF-індуковану агрегацію тромбоцитів кроликів в умовах in vitro

Сполука	МА - падіння оптичної густини плазми, % до еталона, при концентрації сполук					
	10^{-3} М		10^{-4} М		10^{-5} М	
	Контр.	Дослід	Конт.	Дослід	Контр.	Дослід
2	60,8 \pm 3,4	51,4 \pm 2,7*	60,0 \pm 2,1	50,4 \pm 1,7*	52,5 \pm 2,1	48,2 \pm 1,0*
4	"-	49,2 \pm 2,3*	"-	50,2 \pm 2,0*	"-	46,2 \pm 3,1*
6	"-	5,00 \pm 1,9*	"-	53,3 \pm 2,2*	"-	47,4 \pm 2,0*
9	"-	47,3 \pm 2,0*	"-	53,1 \pm 1,8*	"-	41,4 \pm 3,4*
10	"-	46,2 \pm 2,7*	"-	48,7 \pm 2,4*	"-	40,2 \pm 4,0*
15	"-	44,8 \pm 2,8*	"-	46,3 \pm 1,7*	"-	39,8 \pm 3,1*
21	"-	47,1 \pm 3,0*	"-	49,2 \pm 2,1*	"-	41,8 \pm 2,4*
25	"-	48,2 \pm 2,9*	"-	48,6 \pm 2,0*	"-	43,4 \pm 3,2*
28	"-	49,7 \pm 2,2*	"-	48,9 \pm 2,4*	"-	44,2 \pm 2,7*
31	"-	44,9 \pm 2,3*	"-	46,7 \pm 2,2*	"-	39,9 \pm 2,1*
36	"-	45,8 \pm 2,3*	"-	46,9 \pm 2,4*	"-	40,1 \pm 2,0*
37	"-	46,9 \pm 2,7*	"-	47,1 \pm 2,0*	"-	40,6 \pm 1,7*

Продовження таблиці 3

Сполука	МА - падіння оптичної густини плазми, % до еталона, при концентрації сполук			
	10^{-6} М		10^{-7} М	
	Контр.	Дослід	Конт.	Дослід
2	52,8 \pm 1,8	50,1 \pm 2,0	51,5 \pm 2,1	50,8 \pm 2,2
4	"-	50,6 \pm 3,1	"-	49,9 \pm 3,4
6	"-	51,2 \pm 3,2	"-	50,7 \pm 3,2
9	"-	49,4 \pm 3,2	"-	51,2 \pm 1,7
10	"-	48,4 \pm 2,4	"-	49,8 \pm 2,0
15	"-	47,3 \pm 1,8*	"-	49,3 \pm 1,4

1	2	3	4	5
21	-"	49,6±1,7	-"	49,7±2,1
25	-"	50,3±2,1	-"	50,1±3,0
28	-"	50,9±2,7	-"	50,4±3,0
31	-"	47,5±1,7*	-"	49,5±1,2
36	-"	49,3±2,6	-"	49,7±1,8
37	-"	48,1±2,9	-"	50,1±1,0

Примітка: * достовірно при $p \leq 0,05$

З даних табл. 3 видно, що на моделі ADP-індукованої агрегації тромбоцитів введення сполук згідно з винаходом в концентрації 10^{-3} М викликає падіння оптичної густини плазми в діапазоні від 5,4% до 36,5% порівняно з контролем. При введенні сполук в концентрації 10^{-4} М ефект становить від 4,0% до 29,2%. При введенні в плазму, збагачену тромбоцитами, сполук згідно з винаходом в концентрації 10^{-5} М також помітили пригнічення агрегаційної функції кров'яних пластинок, падіння оптичної густини становило від 2,3% до 34,1% порівняно з контролем. Таким чином, в діапазоні концентрацій 10^{-3} М, 10^{-4} М, 10^{-5} М досліджувані сполуки згідно з винаходом виявляли приблизно однаковий ступінь придушення агрегації.

Більш низька концентрація сполук 10^{-6} М знижувала агрегацію вже в значно меншому діапазоні - від 3,3% до 17,2%. В концентрації 10^{-7} М дія сполук припинялася.

Отримані *in vitro* дані свідчать про високу антиагрегаційну здатність сполук згідно з винаходом в діапазоні концентрацій від 10^{-3} М до 10^{-5} М.

3.1.2. Дослідження *in vivo*.

Була досліджена антиагрегаційна здатність сполук 2, 15, 21, 37 згідно з винаходом в досліджах *in vivo*. Тваринам вводили внутрішньовенно індуктор агрегації ADP в концентрації 10^{-5} М і потім сполуки згідно з винаходом. В експерименті були ви-

користані дози сполук в діапазоні від 15 до 60мг/кг. Ці дози були вибрані з урахуванням найбільш ефективних концентрацій від 10^{-3} М до 10^{-5} М, отриманих в досліджах *in vitro*, і обумовлені морфофункціональними особливостями організму кролика, такими як швидкість біотрансформації ліків, співвідношення розмірів печінки і всього організму, інтенсивність фільтраційної здатності нирок та іншими.

Для нівелювання відмінностей сили дії сполук в різні дні, можливо, обумовлених змінами температури оточуючого середовища, вологості та інших параметрів, щоденно брали в експеримент по 2 тварини кожної серії. Під серією розуміють групу з 6 тварин, на яких вивчається одна з доз речовини.

Кров для отримання плазми, багатой на тромбоцити, брали з крайової вени вуха: в контрольній групі - безпосередньо перед введенням досліджуваних сполук, в досліджуваних групах - через 15 хвилин після введення досліджуваних сполук і потім через 30, 60, 120 хвилин і так далі, аж до того моменту, коли ефект придушення агрегації зникав.

До експерименту і в кінці його в кожному зразку плазми підраховували кількість тромбоцитів. Результати досліджень наведені в табл. 4.

Таблиця 4

Вплив сполук згідно з винаходом на ADP-індуковану агрегацію тромбоцитів кроликів (МА - падіння оптичної густини, % до еталона)

МА, % контроль	Сполука	Доза, мг/кг	МА, % через 15хв.	МА, % через 30хв.	МА, % через 60хв.	МА, % через 120хв.
50,1±1,7	2	15,0	44,2±2,0*	42,2±1,6*	46,9±1,7*	49,2±2,0
-"	15		42,8±1,8*	41,8±1,5*	45,6±1,5*	48,3±2,3*
-"	21		43,5±1,7*	43,3±1,7*	46,7±1,5*	49,1±1,7
-"	37		42,9±1,6*	41,9±1,6*	45,9±1,6	48,7±2,1
61,0±1,3	2	30,0	45,3±2,0*	43,7±1,7*	40,1±2,2*	59,7±2,2
-"	15		43,2±2,2*	41,8±1,9*	37,8±1,8*	58,1±1,7
-"	21		46,7±1,9*	45,4±1,8*	45,0±1,9	60,3±2,1
-"	37		43,5±2,0*	42,0±1,4*	41,6±1,4*	58,4±1,7
48,6±1,3	2	60,0	45,2±1,2*	43,6±2,0*	47,8±1,5	48,0±1,2
-"	15		43,1±1,5*	41,3±1,5*	44,7±0,8	47,2±1,6
-"	21		45,1±0,9*	43,2±2,0*	47,3±1,6	48,3±1,5
-"	37		43,4±1,8*	42,4±0,7*	46,2±2,0	47,3±1,7

Примітка: * достовірно) при $p \leq 0,05$

З даних табл. 4 видно, що сполуки 2, 15, 21, 37 згідно з винаходом в дозі 30мг/кг уже через 15

хвилин після введення придушували агрегацію тромбоцитів: зменшення значень падіння оптичної

густини МА складало від 17,5% до 34,9% порівняно з контролем. Цей ефект зберігався на досягнутому рівні ще 15 хвилин, а потім дещо підсилювався до 60 хвилин від початку дослідів. Відновлення початкового значення МА реєстрували наприкінці спостереження після закінчення 120 хвилин.

При збільшенні дози до 60мг/кг відмічали аналогічну картину, хоча здатність тромбоцитів до склеювання (МА) знижувалась до діапазону 1,7-17,5% порівняно з контролем. Ефект зниження агрегації через 30 хвилин дослідів зберігався в діапазоні 3,5-20,1% і зникав приблизно на 120 хвилині спостереження.

Доза 15мг/кг зменшувала ефект дії індуктора агрегації в діапазоні від 6,8% до 23% в перші 30 хвилин експерименту. Ефект зниження агрегації зникав приблизно на 120 хвилині дослідів.

Висновки

Результати проведених досліджень свідчать про те, що сполуки згідно з винаходом при внутрішньовенному введенні в дозах 15, 30, 60мг/кг мають виражений антиагрегаційний ефект, тривалість якого становить приблизно 2 години.

3.2. Взаємодія сполук згідно з винаходом з аденозинчутливими рецепторами еритроцитів.

Були проведені дослідження взаємодії сполук 2, 15, 21, 37 згідно з винаходом з аденозинчутливими рецепторами еритроцитів мишей лінії BALB/c, самок віком 8-12 місяців.

Була визначена залежність інтенсивності хемілюмінесценції сполук згідно з винаходом в лужному середовищі - децинормальному розчині NaOH у присутності перекису водню, який є ініціатором процесу хемілюмінесценції. Хемілюмінесцентні дослідження проводили на хемілюмінометрі "ЛКБ".

Еритроцити периферичної крові мишей спочатку тричі відмивали фізіологічним розчином при центрифугуванні і потім розводили у розчині Хенкса без глюкози 10 об'ємами дистильованої води і використовували в досліді негайно.

На першій стадії дослідів відмиті еритроцити інкубували при температурі 37°C або при 4°C з розчинами сполук згідно з винаходом в концентрації від 10^{-7} М до 10^{-5} М протягом 5-30 хвилин, потім відмивали фізіологічним розчином двократним центрифугуванням на холоді. Отриману суспензію еритроцитів зі зв'язаними з ними сполуками згідно з винаходом поміщали в децинормальний розчин NaOH з додаванням перекису водню в кінцевій концентрації 10^{-7} М. Проводили вимірювання інтенсивності хемілюмінесценції. Контролем служила суспензія еритроцитів без введення сполук згідно з винаходом.

Результати дослідів представлені на діаграмі Фіг.6, де показані величини інтенсивності хемілюмінесценції I_n протягом 3 хвилин суспензії еритроцитів в контролі (лінії "к") при температурі інкубування 37°C (безперервні лінії на діаграмі) і 4°C (пунктирні лінії на діаграмі) і те саме в досліді після інкубування з досліджуваними сполуками (зліва направо для сполук 2, 15, 21, 37) при 37°C (безперервні лінії) і при 4°C (пунктирні лінії) в концентрації K_i від 10^{-7} М, 10^{-6} М і 10^{-5} М. Результати показують, що зв'язування сполук згідно з винаходом з еритроцитами периферичної крові мишей не

залежить від температури, що, згідно з відомими даними, відповідає умовам рецепторного зв'язування.

На другій стадії дослідів відмиті еритроцити інкубували при температурі 37°C з розчинами сполук згідно з винаходом в концентрації від 10^{-11} до 10^{-8} М протягом 5-30 хвилин, потім відмивали фізіологічним розчином двократним центрифугуванням на холоді, в отриману суспензію додавали розчин аденозину в концентрації 10^{-6} - 10^{-4} М та інкубували протягом 15 хвилин, потім відмивали фізіологічним розчином двократним центрифугуванням на холоді. Отриману суспензію еритроцитів зі зв'язаними з ними сполуками згідно з винаходом поміщали в децинормальний розчин NaOH з додаванням перекису водню в кінцевій концентрації 10^{-7} М. Проводили вимірювання інтенсивності хемілюмінесценції. Результати дослідів представлені на Фіг.7а і 7б.

На діаграмі Фіг.7а показана величина інтенсивності хемілюмінесценції I_n протягом 3 хвилин в контролі (область 0) і після інкубування еритроцитів зі сполуками 2, 15, 21, 37 згідно з винаходом (на діаграмі відповідно в областях зліва направо) при 37°C при концентрації сполук від 10^{-11} М до 10^{-8} М.

На діаграмі Фіг.7б показана величина інтенсивності хемілюмінесценції I_n протягом 3 хвилин після інкубування еритроцитів зі сполуками 2, 15, 21, 37 (зліва направо в областях) при температурі 37°C (область 0) і з додаванням аденозину в концентрації 10^{-6} М, 10^{-5} М і 10^{-4} М.

Як видно з отриманих даних, аденозин в концентраціях 10^{-6} - 10^{-4} М знижує зв'язування сполук згідно з винаходом з еритроцитами у 1,5 раза, що може бути результатом конкурентного зв'язування з рецепторами одного виду.

Висновки

Таким чином, було показано, що сполуки згідно з винаходом виявляють ізотропність до аденозинових рецепторів, які знаходяться як на тромбоцитах, так і на еритроцитах.

3.3. Взаємодія сполук згідно з винаходом з ядромісними клітинами.

Були досліджені особливості взаємодії сполук згідно з винаходом з ядромісними клітинами на прикладі клітин селезінки мишей лінії BALB/c віком 8-12 місяців.

Клітини селезінки очищали центрифугуванням в градієнті густини фіколу, відмивали центрифугуванням і суспендували в розчині Хенкса. Потім клітини селезінки інкубували зі сполуками 6, 15, 25, 37 в кінцевій концентрації 10^{-5} М протягом 30 хвилин при температурі 37°C або 4°C, потім двічі відмивали центрифугуванням на холоді. Після цього проводили хемілюмінесцентні дослідження на хемілюмінометрі "ЛКБ" аналогічно описаним вище.

Отримані результати представлені на діаграмі Фіг.8, де в області 1 показана інтенсивність хемілюмінесценції I_n клітин селезінки, інкубованих при температурі 37°C без досліджуваних сполук (контроль, значення перше зліва) і клітин селезінки, інкубованих зі сполуками згідно з винаходом (зліва направо, починаючи з другого значення, відповідно для сполук 6, 15, 25 і 37), а в області 2 показана

інтенсивність хемілюмінесценції для аналогічних груп клітин і в аналогічному порядку, інкубованих при 4°C.

З діаграми Фіг.8 можна зробити висновок, що в ядровмісних клітинах селезінки після введення сполук згідно з винаходом при температурі 37°C рівень світіння значно вищий, ніж при 4°C, що свідчить про проникнення цих сполук крізь клітинну мембрану в цитозоль клітини і зв'язування їх з аденозинчутливими рецепторами, що знаходяться всередині клітини.

Висновок

Результати проведених досліджень дозволяють зробити висновок про те, що сполуки згідно з винаходом є біологічними ізостерами похідних пуринової системи, зокрема аденозину. Маючи подібну до аденіну реакційну здатність приєднувати β-D-рибофуранозний фрагмент і аналогічну аденозину хімічну структуру, сполуки згідно з винаходом здатні взаємодіяти з аденозинчутливими рецепторами, що знаходяться на мембранах неядерних клітин, а також проникати крізь клітинні мембрани ядровмісних клітин. Ці властивості сполук згідно з винаходом обумовлюють можливість їхнього впливу на аденозинзалежні ферменти з виконанням функцій, притаманних, наприклад, нікотинамідним коферментам - нікотинамідаденіндинуклеотиду NAD⁺ та його фосфорилованим похідним NADPH⁺ або флавінзалежним коферментам FAD⁺, які є важливими біологічними переносниками атомів водню.

4. Вплив сполук згідно з винаходом на гемостаз.

Відомо, що нормально функціонуюча система гемостазу повинна забезпечувати збереженість рідкого стану крові в межах судин, що забезпечується могутньою протизсідною системою крові, та швидке тромбування пошкоджених ділянок для запобігання крововтраті та крововиливу в тканини, що забезпечується системою зсідання крові, в утворенні та формуванні яких бере участь ряд факторів плазми крові, тромбоцитів і тканин.

Вважається, що в організмі існують специфічні інгібітори для кожного фактора зсідання крові. Зниження активності цих інгібіторів підвищує зсілість крові і сприяє утворенню тромбів. Підвищення активності цих інгібіторів утруднює зсілість крові і може супроводжуватись розвитком геморагій.

Були проведені дослідження сполук згідно з винаходом за їх впливом на фактори плазми крові, зокрема на стан плазмового гемостазу.

Дослідження були проведені на 72 кроликах породи "Шиншила" масою 2,5±0,3кг, яким внутрішньовенно були введені розчини сполук 2, 15, 21, 37 згідно винаходу в дозах 15, 30 і 60мг/кг. В дослідках були використані тромбін-тест (серія №7300) і коагуло-тест (серія №5000), придбані на НПО "Ренам", тромбопластин (серія №240600) і хлорид кальцію, придбані на НПО "Медіолаб".

Статичні параметри зсідання крові і плазми - частковий активований тромбопластиновий час, тромбіновий час, максимальна згідна активність (тест автокоагуляції) - визначали на коагулометрі Behnk Electronic (Німеччина). Принцип роботи даного приладу оснований на тому, що зсідок, що утворився, розмикає контакт лічильника імпульсів в ланцюгу кювету - шифт, останній постійно коливається у вертикальній площині. Момент утворення зсідка реєструють зупинкою стрілки секундомера.

Вимірювання здійснювали при постійній температурі 37°C, яку підтримували блоком термостатування.

4.1. Вплив на частковий активований тромбопластиновий час (АЧТЧ).

АЧТЧ є стандартизованою коагуляційною пробою, чутливою до дефіциту всіх плазмових факторів (крім VI), відображає стан початкового етапу внутрішнього механізму коагуляції і показує наявність в крові речовин, що мають антикоагулянтні властивості, наприклад як у гепарину.

Піддослідним тваринам (описані вище) внутрішньовенно вводили сполуки 2, 15, 21, 37 згідно з винаходом в концентрації 15, 30 і 60мг/кг і потім відбирали кров через 15, 30, 60 і 120 хвилин після введення.

Зразки плазми крові, позбавленої тромбоцитів, отримані, як описано вище, в кількості 0,1мл вносили в кювету коагулометра і прогрівали протягом 1 хвилини при 37°C, потім додавали 0,1мл 0,277%-ного розчину хлориду кальцію і реєстрували час зсідання крові. Порівнювали час зсідання Т, в секундах, контрольної плазми і плазми, отриманої після внутрішньовенного введення через 15, 30, 60 і 120 хвилин. Результати вимірювань наведені в табл. 5.

Таблиця 5

Вплив сполук згідно з винаходом на показники АЧТЧ кроликів при внутрішньовенному введенні

Т, сек. контроль	Сполука	Доза, мг/кг	Т, сек. через 15хв.	Т, сек. через 30хв.	Т, сек. через 60хв.	Т, сек. через 120хв.
37,0±0,2	2	15,0	37,0±0,1	37,0±0,2	36,9±0,1	37,0±0,3
"-	15	"-	37,0±0,1	37,0±0,2	36,9±0,1	37,0±0,3
"-	21	"-	37,1±0,1	37,2±0,1	36,9±0,1	37,0±0,2
"-	37	"-	37,0±0,2	37,1±0,1	37,0±0,2	36,9±0,1
33,3±0,8	2	30,0	32,7±0,5	32,0±0,1	32,2±0,1	32,1±0,2
"-	15	"-	32,9±0,8	32,1±0,1	32,0±0,2	32,0±0,1
"-	21	"-	32,8±0,4	32,0±0,1	32,2±0,1	32,1±0,1
"-	37	"-	33,1±0,1	33,3±0,1	33,3±0,2	33,0±0,4

Продовження таблиці 5

1	2	3	4	5	6	7
32,5±0,3	2	60,0	32,3±0,2	32,4±0,1	32,3±0,1	32,4±0,1
"-	15	"-	32,2±0,1	32,2±0,1	32,1±0,2	32,2±0,1
"-	21	"-	32,0±0,4	32,1±0,2	32,0±0,1	32,3±0,2
"-	37	"-	32,5±0,1	32,3±0,2	32,4±0,1	32,6±0,3

З даних табл. 5 видно, що в проведених дослідженнях сполуки 2, 15, 21, 37 згідно з винаходом в дозах 15,0, 30,0, 60,0мг/кг не приводять до зміни АЧТЧ.

4.2. Вплив на протромбіновий час.

"Протромбіновий час" є одним з найважливіших показників стану гемостазу, який постійно використовується в експериментальній та клінічній медицині.

Метод його визначення оснований на оцінці зсідання цитратної або оксалатної плазми крові при змішуванні її з тромбопластином і розчином хлориду кальцію. Оскільки в цих умовах час утворення зсідка залежить від вмісту II, VII, IX, X факторів в досліджуваному зразку плазми, в даний час тест називається "тромбопластиновий час за Кві-

ком" або "активність тромбопластинового комплексу".

Піддослідним тваринам (описані вище) внутрішньовенно вводили сполуки 2, 15, 21, 37 згідно з винаходом в концентрації 15, 30 і 60мг/кг і потім відбирали кров через 15, 30, 60 і 120 хвилин після введення.

Цитратну кров, яка містить 1 частину цитрату на 9 частин нативної крові, центрифугували при 3000об/хв. протягом 10 хвилин для отримання плазми, позбавленої тромбоцитів.

У пробірку, що знаходилася у водяній бані, вводили 0,1мл плазми і 0,1мл розчину тромбопластину. Через 60 секунд додавали 0,1мл 0,277%-ного розчину хлориду кальцію і фіксували час реакції T₁ в секундах. Результати досліджень наведені в табл. 6.

Таблиця 6

Вплив сполук згідно з винаходом на показники протромбінового часу кроликів при внутрішньовенному введенні

T ₁ , сек. контроль	Сполука	Доза, мг/кг	T ₁ , сек. через 15хв.	T ₁ , сек. через 30хв.	T ₁ , сек. через 60хв.	T ₁ , сек. через 120хв.
11,8±0,1	2	15,0	11,7±0,2	11,5±0,2	11,4±0,2	11,7±0,1
"-	15	"-	11,5±0,2	11,7±0,2	11,2±0,2	11,5±0,2
"-	21	"-	11,4±0,2	11,5±0,1	11,3±0,1	11,5±0,2
"-	37	"-	11,6±0,2	11,6±0,1	11,5±0,2	11,8±0,1
11,2±0,1	2	30,0	11,1±0,2	11,0±0,1	11,3±0,1	11,2±0,2
"-	15	"-	11,0±0,2	11,2±0,2	11,4±0,2	11,3±0,2
"-	21	"-	11,2±0,1	11,2±0,1	11,3±0,2	11,2±0,2
"-	37	"-	11,3±0,1	11,2±0,2	11,4±0,1	11,1±0,1
12,0±0,1	2	60,0	12,0±0,1	11,9±0,2	12,1±0,2	11,9±0,1
"-	15	"-	12,0±0,1	12,0±0,1	12,0±0,2	12,0±0,1
"-	21	"-	12,0±0,2	11,8±0,1	12,1±0,1	12,0±0,2
"-	37	"-	12,1±0,1	12,0±0,1	12,1±0,2	12,0±0,1

З даних табл. 6 видно, що в проведених дослідженнях сполуки 2, 15, 21, 37 згідно з винаходом в дозах 15,0, 30,0, 60,0мг/кг не впливають на показник протромбінового часу.

4.3. Вплив на показники автокоагуляційного тесту.

Даний параметр відображає динаміку наростання, а потім інактивації тромбопластин-тромбінової активності досліджуваної крові.

Піддослідним тваринам (описані вище) внутрішньовенно вводили сполуки 2, 15, 21, 37 згідно з винаходом в концентрації 15, 30 і 60мг/кг і потім відбирали кров через 15, 30, 60 і 120 хвилин після введення.

В 0,2мл плазми, отриманої центрифугуванням цитратної крові при 1500об/хв. протягом 10 хвилин, вносили гліколізат-кальцієву суміш (2,0мл 0,222%-ного CaCl₂+0,1мл досліджуваної цитратної крові) через 4, 6, 8, 10 хвилин з моменту приготування цієї суміші і визначали час зсідання у зразку.

Отримані результати, в секундах, за допомогою спеціальної таблиці переводили у показники зсідної активності А, в %, які свідчать про стан як прокоагулянтної, так і антикоагулянтної ланок зсідної системи крові. Результати дослідів наведені в табл. 7.

Таблиця 7

Вплив сполук згідно з винаходом на значення зсідної активності А за даними автокоагуляційного тесту кроликів при внутрішньовенному введенні

А, % контроль	Сполука	Доза, мг/кг	А, % через 15хв.	А, % через 30хв.	А, % через 60хв.	А, % через 120хв.
85,6	2	15,0	80,2	100,0	87,4	98,0
-"	15	-"	82,3	103,0	89,0	101,2
-"	21	-"	81,4	101,3	86,5	97,4
-"	37	-"	82,1	102,8	88,7	100,6
70,0	2	30,0	98,4	71,2	104,2	70,9
-"	15	-"	100,3	68,4	106,6	70,6
-"	21	-"	97,2	69,1	103,7	71,0
-"	37	-"	99,8	68,3	105,8	70,4
65,9	2	60,0	72,3	60,8	62,5	65,7
-"	15	-"	74,4	63,2	64,4	66,5
-"	21	-"	71,9	62,1	63,7	66,2
-"	37	-"	74,3	63,0	64,2	66,3

З даних табл. 7 видно, що в проведених дослідженнях сполуки 2, 15, 21, 37 згідно з винаходом в дозах 15,0, 30,0, 60,0мг/кг не впливали на показник зсідної активності за автокоагуляційним тестом.

4.4. Вплив на тромбіновий час.

"Тромбіновий час" характеризує швидкість перетворення фібриногену на фібрин. Його визначали вимірюванням часу зсідання позбавленої тромбоцитів плазми під впливом стандартизованого на контрольній плазмі тромбіну.

До 0,2мл досліджуваної плазми крові підослідних тварин, у яких кров забирали через 15, 30, 60 і 120 хвилин після введення внутрішньовенно сполук 2, 15, 21, 37 згідно з винаходом в дозах 15, 30 і 60мг/кг, інкубованої протягом 1 хвилини при температурі 37°C, додавали 0,2мл розчину тромбіну і на коагулометрі Behnk Electronics (Німеччина) реєстрували час утворення зсідка Т₂ в секундах. Результати досліджень наведені в табл. 8.

Таблиця 8

Вплив сполук згідно з винаходом на тромбіновий час плазми кроликів при внутрішньовенному введенні

Т ₂ , сек. контроль	Сполука	Доза, мг/кг	Т ₂ , сек. через 15хв.	Т ₂ , сек. через 30хв.	Т ₂ , сек. через 60хв.	Т ₂ , сек. через 120хв.
15,8	2	15,0	16,2*	17,0*	16,0*	15,3*
-"	15	-"	17,0*	18,5*	16,5*	15,5*
-"	21	-"	16,4*	17,7*	16,1*	15,7*
-"	37	-"	16,9*	18,2*	16,3*	15,6*
14,7	2	30,0	17,8*	18,4*	19,2*	15,3*
-"	15	-"	19,7*	20,5*	21,3*	15,0*
-"	21	-"	17,9*	18,8*	19,0*	15,6*
-"	37	-"	19,5*	20,3*	21,0*	15,2*
15,2	2	60,0	16,0*	16,9*	15,9*	15,3*
-"	15	-"	16,8*	18,0*	16,5*	14,7*
-"	21	-"	16,2*	17,7*	16,3*	15,7*
-"	37	-"	16,6*	17,8*	16,2*	15,0*

Примітка: * - достовірно порівняно з контролем, при $p \leq 0,05$.

З наведених в табл. 8 даних видно, що в дозі 15мг/кг введення сполук згідно з винаходом збільшувало тромбіновий час ближче до 15 хвилини спостереження, цей ефект досягав максимуму на 30-ій хвилині, слабшав протягом наступної півгодини і повністю зникав на 120-ій хвилині. Аналогічні результати були отримані і при введенні сполук в дозі 60,0мг/кг. Вплив сполук на цей показник гемостазу дещо підсилювався тільки при дозі 30,0мг/кг: час зсідання крові поступово збільшувався протягом перших 25 хвилин досліду, сягав

максимуму біля 60-ої хвилини, а потім нормалізувався на 120-ій хвилині експерименту.

Висновки

Отримані дані свідчать про те, що сполуки згідно з винаходом не мають патологічної дії на нормально функціонуючу систему гемостазу.

5. Вплив сполук згідно з винаходом на процеси продукування і зв'язування активних форм кисню.

Становило великий інтерес вивчення впливу сполук згідно з винаходом на активність трьох найважливіших ферментів окисної системи організму каталази, пероксидази і супероксидисмутази.

Ці ферменти доступні для визначення в крові людини і тварин і відображають три різних рівні інактивації активних форм кисню - перекису водню, супероксидних радикалів і проміжних форм їх обміну.

Вільне окиснення протікає за участю вільно-радикальних форм кисню, які утворюються в процесі одноелектронного відновлення кисню і, перш за все, супероксид-аніон радикала кисню O_2^- . Цей радикал може утворюватись і при зміні умов функціонування дихального ланцюга, і під впливом ультрафіолетових променів, а також при взаємодії кисню з іонами металів змінної валентності, частіше за все - із залізом Fe^{2+} і може продукуватись в клітинах ферментами, такими, як ксантиноксидаза або NADPH-оксидаза. Він є високореакційною сполукою, яка внаслідок високої гідрофільності не може залишати клітину і накопичується в цитозолі клітини.

Живі клітини мають системи захисту від підвищеного продукування вільних радикалів. Фермент супероксиддисмутаза SOD перетворює супероксиданіон радикал кисню на менш реакційноздатний і більш гідрофобний пероксид водню H_2O_2 . Пероксид водню є субстратом для каталази і глутатіонзалежних пероксидаз, які каталізують його перетворення на молекули води. Посилене генерування вільних радикалів супроводжує патологічні стани, наприклад хвороба Паркінсона, хвороба Альцгеймера, а також процеси біологічного старіння. Однак повне придушення процесу перекисних процесів у тканинах недоцільне, оскільки вільні радикали мають корисні властивості. Вони індукують апоптоз, беруть участь у формуванні клітинного імунітету, регулюють жир-

нокислотний склад ліпідних молекул в клітинній мембрані.

Відомо, що циклічні гідразиди ароматичних і гетероциклічних ортодикарбонових кислот здатні взаємодіяти з активними формами кисню, зокрема супероксид-аніонами, гідроксильними радикалами і гідроперекисними радикалами HO_2^\bullet , що характеризується явищем хемілюмінесценції зазначених циклічних гідразидів [Brenton P.D. Mechanistic Aspect of Diazaquinone Chemiluminescence. Aust. J. Chem., 1984, v. 37, p. 1001-1008].

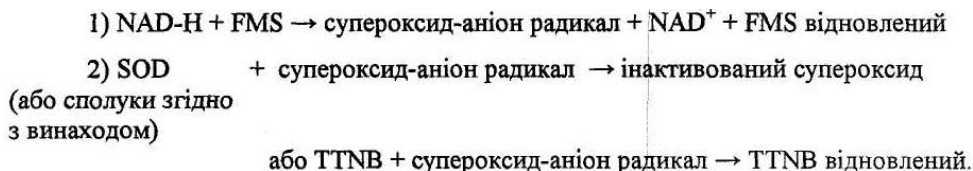
Автори винаходу провели дослідження можливості сполук згідно з винаходом, які мають, як було показано вище, здатність проникати крізь коїтинну мембрану, зв'язувати надмірно продуковані супероксид-аніони кисню.

5.1. Вплив сполук згідно з винаходом на активність SOD зв'язування супероксид-аніон радикалів.

Були проведені дослідження впливу сполук згідно з винаходом на активність зв'язування супероксид-аніонів кисню супероксиддисмутазою SOD.

Принцип методу оснований на конкуренції SOD або сполук згідно з винаходом з нітросинім тетразолієм (TTNB) за супероксид-аніони, що утворюються при аеробній реакції NAD-H і фенозинметосульфату (FMS). Відомо, що у присутності SOD відновлення TTNB знижується. У разі взаємодії сполук згідно з винаходом із супероксид-аніон радикалами відновлення TTNB також буде знижуватись [Nishikimi M., Rao N.A. and Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1972, v. 46, p. 849-855].

Процес можна представити такою схемою:



Інтенсивність генерації і перехоплення супероксид-аніон радикала реєстрували при 560нм за ступенем блокування супероксиддисмутазою або досліджуваними сполуками реакції відновлення TTNB. При цьому активність SOD або досліджуваних сполук згідно з винаходом оцінювали, приймаючи за одиницю активності 50%-не інгібування утворення TTNB відновленого. Активність SOD в залежності від впливу сполук згідно з винаходом виражали в одиницях за хвилину в перерахуванні на 1мг лізату еритроцитів.

Еритроцити мишей лінії BALB/c, самок віком 3 місяці, відмивали при центрифугуванні та лізували 10 об'ємами дистильованої води. Гемолізат потім інкубували протягом 30 хвилин при 37°C зі сполуками 3, 15, 23, 37 згідно з винаходом в різних концентраціях, мкМ: 10,0; 50,0; 100,0, і виміряли активність SOD.

Результати досліджень представлено на графіках Фіг.9, де криві 1, 2, 3, 4 показують активність SOD Asod після інкубування, відповідно, зі сполуками 3, 15, 23, 37.

З графіків Фіг.9 видно, що присутність сполук згідно з винаходом дозозалежно інгібує активність SOD, що пояснюється конкурентним зв'язуванням супероксид-аніон радикалів сполуками згідно з винаходом.

5.2. Вплив на продукування супероксид-аніон радикалів.

Були проведені дослідження можливого впливу сполук 3, 15, 23, 37 згідно з винаходом в концентраціях 10, 50, 100мкМ на утворення супероксид-аніон радикалів в реакції NAD-F + FMS + TTNB. Вплив оцінювали за зміною оптичної густини розчинів при утворенні TTNB відновленого.

Використовували НСТ в кінцевій концентрації 0,7мМ, FMS - 33мкМ, NAD-H - 70мкМ і досліджувані сполуки в різних концентраціях в розчині Хенкса. Реакційну масу інкубували 10 хвилин при температурі 37°C. Зміну світлопропускної здатності С реакційної суміші фіксували на спектрофотометрі при 560нм і оцінювали у відсотках відносно прийнятої за еталон світлопропускної здатності в моделі реакції NAD-F + FMS + TTNB з використанням за-

мість сполук згідно з винаходом SOD еритроцитів 98% чистоти (рекомбінантна SOD людини). Результати іспитів представлені на графіках Фіг.10, де криві 1, 2, 3, 4 показують вплив сполук відповідно 3, 15, 23, 37 на активність SOD.

З графіків Фіг.10 видно, що досліджувані сполуки дозозалежно зв'язують супероксид-аніон радикали, що утворюються.

5.3. Вплив сполук згідно з винаходом на активність каталази і пероксидази.

В основі методів визначення активності каталази лежить кількісне визначення швидкості процесу розкладу перекису водню, який є специфічним субстратом для цього ферменту. Були проведені дослідження процесів конкурентної взаємодії сполук 3, 15, 23, 36 згідно з винаходом з перекисом водню.

Для визначення активності каталази автори винаходу використовували метод спектрофотометричної реєстрації продуктів, що утворюються в процесі взаємодії перекису водню з молібдатом амонію. Це реакція є специфічною і такою, що швидко перебігає, в результаті якої утворюються стійкі продукти.

До 0,1мл гомолізованих еритроцитів крові мишей лінії BALB/c додавали 2,0мл 0,03%-ного розчину перекису водню (еталон) або готували таку саму суміш з доданням однієї зі сполук 3, 15, 23, 36 згідно з винаходом в концентраціях 1,0 або 10,0мкг/мл (дослід), а потім в різних дослідах через 10, 20, 30, 60, 90, 120 хвилин додавали 1,0мл 4%-ного розчину молібдату амонію. Реакція супроводжується швидким і необоротним розкладом перекису водню і утворенням кольорових продуктів. Світлопоглинання отриманих розчинів виміряли при 410нм, товщині кювети 1,0см, в контрольній кюветі використовували дистильовану воду.

Результати досліджень представлені на графіках Фіг.11, активність каталази показана у відносних величинах А_к. Криві 1, 2, 3, 4 відображають вплив відповідно сполук 3, 15, 23, 36 в концентрації 1,0мкг/мл на активність каталази протягом часу експерименту. Для концентрації 10,0мкг/мл залежність аналогічна (на графіку не показана).

Визначення активності пероксидази становить значний інтерес в клінічній практиці. Для її визначення застосували метод, оснований на окисненні індігокарміну в слабкокислому середовищі.

До 2,0мл ацетатного буферного розчину додавали 0,1мл осаду гомолізованих еритроцитів крові мишей лінії BALB/c, додавали 2,0мл 0,03%-ного розчину перекису водню (контроль) або готували таку саму суміш з доданням сполук 3, 15, 23, 36 згідно з винаходом в концентраціях 1,0 або 10,0мкг/мл (дослід), а потім в різних дослідах через 10, 20, 30, 60, 90, 120 хвилин додавали 1,0мл індігокарміну. Відмічали час реакції з індігокарміном в секундах за зміною переходу забарвлення розчину з синього через зелене у безколірне, потім в рожеве. В дослідах час закінчення реакції відмічали при переході кольору забарвлення у безколірний.

Отримані результати представлені у відносних величинах А_р на графіках Фіг.12, криві 1, 2, 3, 4 для сполук відповідно 3, 15, 23, 36 згідно з винаходом в концентрації 1,0мкг/мл, для концентрації

10,0мкг/мл (на графіках не показано) спостерігається аналогічна залежність.

Висновки

Таким чином, сполуки згідно з винаходом здійснюють виражений вплив на активність найважливіших ферментів окисної системи організму - каталази, пероксидази і супероксиддисмутази, при цьому вплив на кінетику ферментів має коливальний характер з обмеженою амплітудою, що вказує на регулюючий характер дії сполук згідно з винаходом і перевід ферментів в режим активної адаптації до нових умов. Крім того, визначена здатність сполук згідно з винаходом взаємодіяти з активними формами кисню, які надмірно продукуються в клітині.

6. Вплив сполук згідно з винаходом на розвиток окисного стресу.

Відомо, що в умовах окисного стресу, викликаного надмірним утворенням в клітинах активних форм кисню або реакційно активних метаболітів азоту в клітині змінюється багато біохімічних показників крові та порушуються нітрергічні механізми клітини.

Як модель створення окисного стресу в клітинах була вибрана модель морфінової абстиненції у щурів, яка є аналогом героїнової абстиненції людини.

Фізичну залежність від морфіну моделювали на самцях-щурах Wistar масою 250-350г віком 6 місяців ін'єкуванням внутрішньочеревинно морфіну гідрохлориду протягом 6 днів 2 рази на добу (в 10.00 годин і 20.00 годин) в дозах із зростанням за схемою, мг/кг: 10, 10; 20, 20; 40, 40; 60, 60; 80, 80; 100, 100 [Rahman S., Ali Khan R, Kumar A. Experimental study of the morphine deaddiction properties of Delphinium denudatum Wall//BMC Complement Altern. Med. 2002, v. 29, p. 1-6; Dum J., Blasig I, Herz A. Buprenorphine: demonstration of physical dependence liability. Eur. J. Pharmacol., 1981, v. 70, p. 293-300].

В експериментах були проведені досліді на щурах в серіях по 7 тварин на кожну сполуку згідно з винаходом. Контрольною групою служили неморфінізовані тварини, без введення сполук згідно з винаходом. Першу дослідну групу складали тварини, морфінізовані за вищезазначеною методикою, другу групу - тварини, яким вводили тільки сполуки 6, 15, 25, 37 згідно з винаходом в внутрішньом'язово в дозі 20,0мг/кг три рази упродовж доби, третю - морфінізовані тварини, яким тричі протягом доби, яка йшла слідом після останньої дози морфіну, вводили сполуки 6, 15, 25, 37 згідно з винаходом внутрішньом'язово в дозі 20,0мг/кг. Потім щурів декапітували, кров з сонних артерій збирали в пробірки з розчином EDTA як антикоагулянта, центрифугували при 1500г протягом 15 хвилин при 4°C.

6.1. Вплив сполук згідно з винаходом на активність ферментів у плазмі крові.

Для оцінки можливої гепатопротекторної дії сполук згідно з винаходом в умовах розвитку окисного стресу в клітинах печінки, був досліджений вплив сполук згідно з винаходом на найважливіші біохімічні показники крові, зокрема на вміст у плазмі крові індикаторних ферментів аспартатамінотрансферази (AST), аланінамінотрансферази (ALT),

γ -глутамілтранспептидази (γ -GTP). Вміст ферментів оцінювали за їхньою каталізуючою активністю в плазмі крові.

Відомо, що морфінова абстиненція приводить до підвищення активності ферментів AST і γ -GTP в

плазмі крові, що свідчить про токсичну дію морфіну на печінку тварин.

Активність AST, ALT і γ -GTP визначали за допомогою діагностичних наборів DiaSys (Німеччина). Результати дослідів наведені в табл. 9.

Таблиця 9

Вплив морфіну та сполук згідно з винаходом на вміст C_i індикаторних ферментів у плазмі крові

Фермент	C_i , мЕ/1 контроль	C_i , мЕ/1 контроль+морфін	Сполука	C_i , мЕ/1 контроль+сполука	C_i , мЕ/1 контроль+морфін+сполука
ALT	106,76±11,35	116,12±10,44	6	114,5±1,13	122,44±2,01
	"-		15	113,48±2,39	121,08±5,04
	"-		25	115,27±1,09	121,96±3,4
	"-		37	113,84±2,0	120,84±5,20
AST	179,88±11,94	238,20±14,71	6	176,18±3,26	198,34±9,32
	"-		15	173,46±5,63	195,57±18,68
	"-		25	177,34±6,13	196,46±15,34
	"-		37	174,82±4,91	193,58±14,18
γ -GTP	6,26±1,80	16,80±3,32	6	8,27±2,12	12,52±2,02
	"-		15	7,03±2,82	10,69±1,84
	"-		25	7,57±1,93	11,37±1,54
	"-		37	8,14±2,64	10,32±2,67

З даних табл. 9 видно, що при введенні тільки сполук згідно з винаходом активність ферментів AST і γ -GTP не змінювалась і відповідала показникам контрольної групи. Введення морфіну призводило до підвищення активності зазначених ферментів у крові, що свідчить про порушення діяльності печінки, а наступне введення сполук згідно з винаходом приводило до нормалізації діяльності печінки та усунення наслідків дії морфіну на клітини печінки щурів.

6.2. Вплив сполук згідно з винаходом на внутрішньоклітинні метаболічні процеси.

Для оцінки інтенсивності метаболізму оксиду азоту у щурів проводили кількісне визначення стабільних метаболітів оксиду азоту - нітритів і нітратів NO_x^- в плазмі крові, супернатантах печінки і тимуса спектрометричним методом, а також в супернатантах мозку - флуориметричним методом.

В основі спектрометричного методу лежить взаємодія нітритів з реактивом Грісса (суміш 2%-ного розчину сульфаніламідів і 0,2%-ного N-(1-нафтил)етиленадіаміну). На першому етапі нітрит реагує з сульфаніламідом з утворенням солі діазонію, а потім в результаті реакції з другим компонентом утворюється азобарвник з максимумом адсорбції при 540нм. Для відновлення нітратів у нітрити ферментативним способом застосовували бактеріальну нітратредуктазу [Grisham M.B. et al., 1995]. Депротейнізовані при 100°C протягом 5 хвилин зразки плазми і супернатанта печінки інкубували протягом 30 хвилин при 37°C в 50,0мМ HEPES pH 7,4 у присутності 0,2одиниць/мл Aspergillus нітратредуктази, 5,0мкМ FAD і 0,1мМ NAD-Ph. Наприкінці реакції додавали лактатдегідрогеназу і піруват для вилучення NAD-Ph, який заважає реакції Грісса. Потім додавали реактив Грісса і після 10-хвилинної інкубації виміряли світлопоглинання зразків при 540нм. Для розрахунку кількості NO_x^- застосовували нітрат натрію як стандарт.

В основі флуориметричного методу лежить визначення рівня нітритів за інтенсивністю флуоресценції 2,3-діамінонафтотриазолу, продукту реакції 2,3-діамінонафталіну (DAN) і нітриту в кислому середовищі [Misko T.R., Schilling R.J., Salvemini D. et al. A fluoremetric assay for the measurement of nitrite of biological samples Anal. Biochem., 1993, v. 214, p. 11-16]. Депротейнізовані при 100°C супернатанти мозку поміщали в нітрит-регенеруючу систему, що містить 0,125одиниць/мл нітратредуктази, 25мкМ NADPh і 25мкМ FAD, приготованих в 20мМ Tris-HCl буфері pH 7,6, та інкубували протягом 30 хвилин при 37°C. Для окиснення NADPh використовували систему лактатдегідрогеназа/піруват. Потім додавали 316мкМ розчину DAN в 0,62М соляної кислоти та інкубували 10 хвилин у темряві. Для стабілізації флуоресценції 2,3-діамінонафтотриазолу, що утворився, додавали 280мМ NaOH. Інтенсивність флуоресценції виміряли на спектрофлуориметрі Hitachi F-3000 при довжині хвилі збудження 365нм та емісії 405нм. Для розрахунку концентрації NO_x^- в мозку був використаний стандартний розчин нітрату натрію.

Був також вивчений вплив сполук 6, 15, 25, 37 згідно з винаходом на активність ізоформ синтази оксиду азоту (NOC), зокрема на активність Ca^{2+} -незалежної та Ca^{2+} -залежної ізоформ NOC у печінці морфінізованих щурів радіометричним методом за швидкістю накопичення L-цитруліну в реакції окиснення [^3H]L-аргініну, яку каталізує NOC [Bredt and Snyder. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, v. 86, p. 9030-9033]. Утворення L-цитруліну в цій реакції еквівалентне біосинтезу оксиду азоту.

Реакцію ініціювали додаванням супернатанта печінки, мозку або тимуса в реакційне середовище, яке містить 2,0мкКу/мл [^3H]L-аргініну, 20мМ HEPES pH 7,4, 0,2мМ CaCl_2 , 5,0мкМ FAD, 5,0мкМ FMN, 1,0мМ NADPh, 50,0мкМ BEЦ при дослідженні

супернатантів мозку, а при аналізі супернатантів печінки для інгібування аргінази і рециклізації $[^3\text{H}]$ -цитруліну в $[^3\text{H}]$ -аргінін в середовище додатково вводили 50,0мМ L-валіну і 1,0мМ L-цитруліну. Після 15-60 хвилин інкубації при 37°C у зразки додавали суспензію Dowex 50WX8-400 (Na^+ -форма), яка сорбує L-аргінін, що не прореагував, але не L-цитрулін. Після сорбції активність зразків визначали на сцинтиляційному лічильнику SL-4000 "Intertechnique". Активність Ca^{2+} -залежної

та Ca^{2+} -незалежної ізоформ NOC визначали за різницею швидкостей утворення $[^3\text{H}]$ -цитруліну в трьох паралельних зразках, що містили 2,0мМ EDTA як хелатор Ca^{2+} і як інгібітор всіх форм NOC, - 2,0мМ EDTA + 2,0мМ L-NAME, та без інгібіторів. Активність ферменту NOC в досліджуваному супернатанті рахували в пМ $[^3\text{H}]$ -цитруліну, накопиченого за одиницю часу на 1мг білка в супернатанті. Результати досліджень представлені в табл. 10 і на Фіг.13.

Таблиця 10

Вплив морфіну і сполук згідно з винаходом на рівень нітритів у плазмі крові і супернатантах печінки і мозку та активність синтази оксиду азоту (NOC) в мозку

Показник	Контроль	Контроль+морфін	Сполука	Контроль+сполука	Контроль+морфін+сполука
Нітрити в плазмі крові, мкМ/мл	18,30±2,14	12,12±0,61	6	15,83±1,21	15,86±1,20
			15	14,39±0,84	13,91±1,91
			25	17,10±2,05	16,78±2,11
			37	16,13±1,80	15,33±0,87
Нітрити в печінці, нМ/мг білка	0,260±0,023	0,259±0,012	6	0,245±0,010	0,294±0,02
			15	0,259±0,019	0,285±0,02
			25	0,307±0,012	0,287±0,01
			37	0,262±0,018	0,274±0,01
Нітрити в мозку, нМ/мг білка: Кора великих півкуль	4,63±0,29	5,31±0,29	6	4,59±0,44	5,12±0,18
			15	4,31±0,37	4,72±0,37
			25	4,47±0,43	4,91±0,32
			37	4,36±0,24	4,77±0,28
Середній мозок	5,66±0,19	9,41±1,20	6	7,01±0,82	5,76±0,94
			15	6,65±0,70	5,50±0,43
			25	6,98±1,02	5,91±0,74
			37	6,84±0,56	5,63±0,37
Гіпоталамус	6,57±0,50	4,62±0,71	6	6,94±0,67	6,72±0,94
			15	6,77±0,83	6,57±0,88
			25	6,87±0,80	6,67±0,79
			37	6,79±0,92	6,52±0,83
Активність NOC, пМ/хв/мг білка: Середній мозок	2,18±0,09	3,08±0,09	6	2,84±0,31	1,99±0,31
			15	2,60±0,29	1,83±0,23
			25	2,65±0,43	1,97±0,27
			37	2,62±0,27	1,85±0,30
Гіпоталамус	5,37±0,20	3,42±0,54	6	5,93±0,27	5,34±0,24
			15	5,45±0,24	5,26±0,28
			25	5,88±0,27	5,23±0,27
			37	5,61±0,22	5,59±0,22

З наведених в табл. 10 рівнів вмісту нітритів у крові видно, що морфін достовірно знижував вивільнення в кров нітритів (при $p \leq 0,02$), таке зниження рівня нітритів у крові може свідчити про зменшення генерації оксиду азоту в органах або судинах при морфіновій абстиненції. Сполуки згідно з винаходом запобігали цьому ефекту, що може свідчити про вплив цих сполук на активність синтази оксиду азоту в тканинах або на активність відповідного ферменту в ендотелії судин.

В печінці (табл. 10) сполуки згідно з винаходом запобігали накопиченню продуктів перекисного окиснення.

В мозку (табл. 10) введення тваринам морфіну специфічно впливало на накопичення нітритів і

активність NOC: в гіпоталамусі - зниження, а в корі великих півкуль і середньому мозку - підвищення нітратних показників. При введенні тільки сполук згідно з винаходом в корі великих півкуль спостерігалось зниження нітратних показників, а в середньому мозку і в гіпоталамусі - їх підвищення. Наступне введення сполук згідно з винаходом відновлювало порушену морфіном активність NOC в гіпоталамусі, середньому мозку, корі великих півкуль.

На діаграмі Фіг.13 показана активність NOC загальна (область 1 діаграми), активність кальцій-залежної NOC (область 2) і активність кальцій-незалежної NOC (область 3) в контролі (значення к), при введенні морфіну (значення м), при вве-

денні тільки сполук 6, 15, 23, 37 (група С), і при введенні сполук згідно з винаходом після введення морфіну (група D), відповідно, зліва направо в областях 1, 2, 3, 4.

Результати досліджень дозволяють зробити висновок, що в печінці активність ізоформ NОC достовірно змінювалась під дією морфіну. Порівняно з контролем загальна активність NОC у морфінізованих щурів і щурів, які отримали тільки сполуки згідно з винаходом, не змінювалась. Однак введення морфіну викликало підвищення активності кальцій-залежної форми NОC і зниження активності кальцій-незалежної форми NОC. А введення сполук згідно з винаходом морфінізованим

тваринам приводило до нормалізації активності кальцій-залежної NОC і до збільшення активності кальцій-незалежної NОC вище початкового рівня, що приводило до підвищення загальної активності ферменту NОC.

Був також досліджений вплив сполук згідно з винаходом на стан тимуса щурів: контрольна група, дослідна група морфінізованих тварин, дослідна група тварин, ін'єктованих сполуками згідно з винаходом, і дослідна група тварин, морфінізованих і потім ін'єктованих сполуками згідно з винаходом. Експеримент проводили аналогічно описаному вище. Результати наведені в табл. 11.

Таблиця 11

Вплив морфіну та сполук згідно з винаходом на стан тимуса

Показник	Контроль	Введення морфіну	Сполука	Введення сполуки	Введення морфіну та сполуки
Маса тимуса, мг	230±14	145±9	6	242±17	207±14
			15	298±25	214±12
			25	254±14	218±17
			37	263±21	228±15
Нітрити, нмол/мг білка супернатанта	0,331±0,041	0,511±0,05	6	0,424±0,04	0,419±0,02
			15	0,407±0,02	0,383±0,02
			25	0,417±0,02	0,396±0,02
			37	0,410±0,01	0,387±0,01

З даних, наведених в табл. 11, видно, що морфінова абстиненція викликає інволюцію тимуса, а сполуки згідно з винаходом повністю запобігають цьому ефекту морфіну. Крім того, сполуки згідно з винаходом запобігають накопиченню нітритів у тимусі.

Висновки

Таким чином, можна зробити висновок, що сполуки згідно з винаходом мають гепатопротекторну дію: запобігають підвищенню активності ферментів AST і γ -GTP і купірують окисний стрес в печінці.

Крім того, сполуки згідно з винаходом запобігають інволюції тимуса, впливають на різні ізоформи синтази оксиду азоту, здійснюючи корекцію порушених нітрергічних механізмів у печінці, відділах мозку і тимусі.

7. Оцінка загальнотоксичної дії сполук згідно з винаходом.

Загальнотоксична дія сполук згідно з винаходом була вивчена в хронічному експерименті на щурах при введенні щурам сполук у формі свічок, що містили як активний інгредієнт сполуки згідно з винаходом: 5% активного інгредієнта в свічковій основі, отриманій сплавленням на водяній бані Вітепсола марок Н-15 і W-35 в рівних кількостях.

Досліди проводили на інбредних щурах. Тварин для експерименту відбирали в групу методом випадкової вибірки з урахуванням маси тіла як визначального показника, по 24 самця або 24 самки на один препарат із досліджуваних в одній дозі

сполук 2, 15, 23, 34, 37. За 4-5 годин до ректального введення препарату тваринам припиняли давати корм, маніпуляції з тваринами приводили до рефлекторного акту дефекації, що звільняла порожнину прямої кишки.

В експериментах використовували дві дози препаратів - 50мг/кг і 500мг/кг. Свічки перед введенням розм'яшували розігрівом на водяній бані в скляній склянці при температурі 38-39°C, набирали в туберкуліновий шприц об'ємом 1мл, приєднували до шприца голку з оливою і вводили свічкову масу в пряму кишку тваринам на глибину 1,5-2,0см. Тваринам контрольної групи вводили стерильне медичне вазелінове масло в об'ємі, що відповідав об'єму досліджуваної свічки. Повний курс введення препаратів тваринам склав 2 місяці. Комплекс лабораторних діагностичних досліджень проводили через місяць після початку введення препарату тваринам - посередині курсу (8 тварин), через два місяці - після закінчення курсу (8 тварин) і через три місяці - після закінчення відновлювального періоду тривалістю один місяць (8 тварин). Масу тіла щурів протягом першого місяця введення препарату визначали щотижня, а потім - один раз на два тижні. На основі динаміки показника маси тіла тварини робили корекцію об'єму препарату, який вводили, з урахуванням досліджуваної дози. Результати досліджень наведені в табл. 12, 13, 14.

Таблиця 12

Показники периферичної крові самців щурів
після введення досліджуваних препаратів у свічках протягом 1 і 2 місяців

Показник крові	Контроль 1міс./2міс.	Сполука	Доза 50мг/кг 1міс/2міс.	Доза 500мг/кг 1міс/2міс.
Гемоглобін, мМ/дм ³	10,5±0,2/11,4±0,2	2	10,5±0,1/11,1±0,1	10,6±0,1/12,3±0,3*
		15	10,6±0,2/11,2±0,1	10,6±0,2/12,5±0,4*
		23	10,7±0,1/11,0±0,1	10,7±0,2/12,3±0,3*
		34	10,6±0,1/11,1±0,2	10,6±0,3/12,4±0,4*
		37	10,5±0,1/11,0±0,1	10,6±0,1/12,1±0,4*
Еритроцити, млн/мм ³	5,6±0,1/6,1±0,1	2	5,6±0,2/6,1±0,1	5,6±0,1/6,5±0,1*
		15	5,7±0,2/6,0±0,1	5,7±0,1/6,7±0,2*
		23	5,7±0,1/6,0±0,2	5,7±0,2/6,4±0,2*
		34	5,6±0,1/6,1±0,2	5,6±0,2/6,6±0,1*
		37	5,6±0,2/6,2±0,1	5,7±0,1/6,5±0,2*
Гематокрит, %	45,9±1,7/45,9±1,8	2	47,8±1,3/47,9±1,5	47,5±1,6/50,3±2,0
		15	47,9±1,4/47,5±1,2	47,6±1,3/53,9±2,1*
		23	47,7±1,2/46,5±1,3	47,9±1,1/49,4±1,9*
		34	46,9±1,1/47,5±1,2	48,1±1,5/53,1±1,6*
		37	47,8±1,4/47,5±1,2	47,9±1,8/52,5±1,7*
Середній об'єм еритроцитів, мкм ³	81,4±1,7/74,6±1,9	2	83,4±1,4/77,9±2,1	85,2±1,2/72,0±2,5*
		15	84,4±1,5/78,6±1,5	82,6±1,1/80,2±1,2*
		23	82,7±1,6/77,5±1,7	83,5±1,7/82,1±1,4*
		34	81,6±1,9/76,7±1,9	84,1±1,3/83,8±1,5*
		37	83,9±1,7/78,5±1,4	82,3±1,5/80,1±1,0*
Ретикулоцити, %	2,8±0,3/2,9±0,2	2	2,8±0,2/2,8±0,2	2,9±0,3/3,5±0,2
		15	2,6±0,2/3,0±0,1	3,1±0,2/3,3±0,3
		23	2,7±0,3/2,8±0,1	3,1±0,1/3,4±0,1
		34	2,7±0,1/2,9±0,2	3,2±0,2/3,5±0,3
		37	2,6±0,1/3,1±0,1	3,0±0,2/3,4±0,2
Тромбоцити, %	707±23/593±14	2	659±26/566±20	681±26/583±25
		15	678±13/597±24	683±14/616±40
		23	659±18/586±28	678±18/628±23
		34	670±23/610±15	682±24/631±26
		37	675±22/609±18	671±26/639±34
Час зсістості, сек.	152±10,2/316±8	2	145±16/322±18	149±11/305±13
		15	140±12,2/321±12	151±6,4/308±16
		23	150±15/313±17	156±11/317±12
		34	148±16/321±10	165±10/312±9
		37	151±13/319±12	157±14/316±14
ШОЕ, мм/год	2,2±0,4/1,4±0,2	2	1,9±0,3/1,7±0,1	2,1±0,3/1,9±0,1
		15	1,8±0,4/1,6±0,2	2,2±0,4/1,8±0,4
		23	1,7±0,8/1,5±0,1	2,0±0,3/1,7±0,3
		34	1,8±0,5/1,7±0,3	2,0±0,4/1,8±0,2
		37	1,8±0,3/1,6±0,3	2,2±0,3/2,0±0,1
Лейкоцити, тисяч/мм ³	17,4±1,3/19,1±1,9	2	16,0±1,4/19,3±1,6	15,6±0,8/18,6±1,9
		15	14,8±2,0/16,3±1,0	17,0±1,4/21,1±2,4
		23	15,5±1,1/17,6±1,2	16,4±1,1/20,1±1,7
		34	15,9±1,3/17,8±1,4	16,9±1,0/22,1±1,1
		37	14,9±1,5/16,7±1,2	17,1±0,9/18,7±1,7
Базофіли, %	0	2	0	0
		15	0	0
		23	0	0
		34	0	0
		37	0	0
Еозинофіли, %	4,0±0,3/4,4±1,2	2	3,4±0,6/4,2±0,8	3,2±0,9/4,8±1,6
		15	3,2±1,0/3,6±1,2	3,0±1,0/3,2±1,4
		23	3,6±0,5/4,0±0,7	3,3±0,7/3,8±1,3
		34	3,5±1,0/4,1±0,4	3,0±0,9/3,9±1,4
		37	3,8±0,8/4,2±0,3	3,5±1,0/4,1±1,3

Продовження таблиці 12

Юні, %	0	2	0	0
		15	0	0
		23	0	0
		34	0	0
		37	0	0
Паличкоядерні, %	0,8±0,4/2,4±0,4	2	0,8±0,3/1,7±0,3	0,9±0,2/1,1±0,3
		15	1,2±0,5/0,8±0,5	0,8±0,5/0,8±0,5
		23	1,1±0,5/1,6±0,2	1,0±0,3/1,6±0,2
		34	1,0±0,4/1,8±0,5	0,9±0,2/1,4±0,3
		37	1,3±0,5/1,9±0,4	0,9±0,4/1,1±0,6
Сегментно-ядерні, %	29,2±2,4/23,0±1,2	2	25,2±1,7/27,8±3,4	27,1±1,5/24,8±2,6
		15	27,4±1,3/26,2±2,2	26,3±1,2/22,4±1,5
		23	24,0±1,4/28,6±4,2	28,2±1,7/25,3±1,8
		34	25,6±1,2/25,2±2,7	26,4±1,0/24,7±2,3
		37	28,3±1,6/26,0±3,6	27,9±1,1/25,2±2,8
Лімфоцити, %	60,2±1,8/64,8±1,6	2	61,4±1,8/63,9±2,1	59,2±1,3/68,Ш,7
		15	65,0±1,5/61,8±2,5	61,6±2,5/67,6±1,3
		23	64,2±1,8/63,0±3,7	63,7±1,9/68,7±1,4
		34	63,8±1,6/62,8±2,9	62,9±1,6/67,9±2,1
		37	65,0±1,2/63,4±1,9	64,0±1,7/66,3±1,9
Моноцити, %	5,8±0,7/5,4±0,6	2	5,9±0,8/5,7±0,7	6,0±1,1/5,9±1,1
		15	6,6±0,9/7,6±1,0	6,4±0,9/6,0±0,9
		23	6,5±0,7/6,9±1,0	6,1±1,4/6,2±0,7
		34	5,8±0,9/6,2±0,9	5,9±0,8/6,0±1,0
		37	6,0±1,2/6,4±0,7	6,1±1,3/6,3±0,7

Таблиця 13

Біохімічні показники сироватки крові самців щурів
після 1 місяця введення свічок з вмістом сполук згідно з винаходом

Показник	Контроль	Сполука	Доза 50мг/кг	Доза 500мг/кг
Загальний білок, г/л	94,89±6,67	2	87,34±5,56	70,84±7,47
		15	90,22±6,78	71,56±8,23
		37	89,44±7,72	70,88±7,24
Глюкоза, мМ/л	9,76±0,15	2	9,85±0,37	10,20±0,74
		15	10,00±0,41	10,71±0,41
		37	9,9±0,51	10,93±0,84
Сечовина, мкМ/л	8,44±0,60	2	11,02±0,73	11,30±0,80
		15	10,33±0,51	10,89±0,73
		37	9,36±0,62	10,57±0,56
Холестерин, мМ/л	3,02±0,08	2	2,77±0,71	2,96±0,52
		15	2,01±0,50	2,30±0,57
		37	2,48±0,62	2,64±0,46
Креатинін, мкМ/л	40,23±2,84	2	47,38±3,26	49,87±8,12
		15	45,59±2,68	48,27±12,29
		37	46,84±2,92	47,13±9,82
ALT, одиниць/л	11,33±1,96	2	10,84±2,02	11,23±1,70
		15	7,63±1,95	9,48±1,85
		37	8,98±2,43	9,56±1,34
AST, одиниць/л	19,13±1,02	2	20,41±3,06	20,13±2,95
		15	19,49±2,90	15,14±1,58
		37	19,97±2,78	18,21±1,87
Лужна фосфатаза, одиниць/л	40,74±1,57	2	42,12±4,23	43,4±2,12
		15	40,74±6,78	41,60±2,26
		37	41,86±5,26	42,18±2,34
Білірубін, мМ/л	35,93±2,19	2	44,38±4,12	42,56±7,56
		15	43,07±3,57	40,69±15,75
		37	42,17±3,28	41,45±7,18

Таблиця 14

Показники сечі щурів через 1 місяць введення сполук згідно з винаходом у свічках

Показник	Контроль	Сполука	Доза 50 мг/кг	Доза 500 мг/кг
Білок, г/л	0,74±0,26	2	0,69±0,33	0,76±0,31
		15	0,71±0,274	0,87±0,24
		37	0,70±0,19	0,72±0,14
Сечовина, мМ/л	472±140	2	457±144	492±187
		15	413±128	485±131
		37	427±137	489±152
Глюкоза, мМ/л	<6	2	<5	<5
		15	<6	<6
		37	<5	<5
Калій, г/л	5,96±1,1	2	5,78±1,7	6,24±1,8
		15	5,28±1,5	6,13±1,6
		37	6,12±1,4	6,44±1,3
Натрій, г/л	0,9±0,1	2	1,7±0,3	1,27±0,3
		15	1,2±0,4	0,64±0,4
		37	1,4±0,2	0,88±0,4
Уробіліноген, мкМ/л	<17	2	<16	<16
		15	<17	<17
		37	<15	<15
рН	6,2±0,3	2	6,1±0,3	6,2±0,2
		15	6,3±0,4	6,2±0,3
		37	6,4±0,4	6,2±0,3
Білірубін, мМ/л	<5	2	<5	<5
		15	<5	<5
		37	<5	<5
Кетонів тіла, мМ/л	<1	2	<1	<1
		15	<1	<1
		37	<1	<1

Протягом курсу введення препаратів у тварин всіх груп незалежно від дози препаратів був відмічений стабільний клінічний стан без ознак інтоксикації, зовнішній вигляд і поведінкові реакції були звичайними для здорових щурів, споживання корму і води відповідало фізіологічній нормі.

З наведених в табл. 12, 13 14 результатів досліджень видно, що після 1 місяця введення сполук згідно з винаходом у свічках змін у показниках периферичної крові тварин не виявлено. Після 2 місяців введення свічок у тварин, які отримували свічки з дозою 50мг/кг, достовірних відмінностей у показниках периферичної крові не виявлено. У тварин, що отримували свічки в дозі 500мг/кг, відмічені окремі зміни, зокрема достовірно підвищені значення загальної кількості еритроцитів, гемоглобіну, гематокритної величини і середнього об'єму еритроцитів, в деяких випадках відмічено зменшення часу зсілоності крові порівняно з контролем.

Дослідження біохімічних показників сироватки крові та сечі після тривалого введення сполук згідно з винаходом у свічках не виявило відмінностей між піддослідними і контрольними тваринами.

Патолого-анатомічні дослідження через один місяць після початку введення свічок і після закінчення повного курсу введення показали, що при розтині виявлялась однакова картина без ознак патології: шерстний покрив був гладким, блискучим; шкіра - еластичною, рухомою; підшкірна жирова клітковина - помірно вираженою. Легені -

повітряні, блідо-рожевого кольору, з розрізу паренхіми стікає невелика кількість пінистої червоної рідини. Печінка - еластична, має звичайну форму, краї органу трохи закруглені, капсула гладка, блискуча, тканина органу на розрізі темно-червона, повнокровна, блискуча. Нирки - оточені помірною кількістю жирової тканини, мають бобоподібну форму, еластичні, капсула блискуча, чиста, легко знімається. Кіркова і мозкова речовина має звичайний малюнок з вираженою роздільною межею, в мисках - невелика кількість прозорої, трохи опалесцювальної рідини. Надниркові залози - округлої форми, на зрізі чітко диференційовані на світлішу - кіркову речовину і темнішу - мозкову. Селезінка - подовженої форми, капсула блискуча, пульпа - темно-вишневого кольору, з поверхні розрізу зіскрібається незначна кількість тканини і кров'янистої рідини. Товстий кишечник - з невеликою кількістю слизу, без ознак здуття, судинний малюнок помірно виражений, слизові - чисті, без укривань виразками, калові маси в кінцевому відділі - сформовані. Сім'яники - овальної форми, щільної консистенції, з помірно вираженою судинною сіткою.

Динаміка маси тіла щурів під час введення препаратів (1-9 тижнів) була позитивною і не відрізнялася від динаміки в контрольній групі.

При досліджуваннях також визначали наявність подразливої дії свічок на слизову оболонку кишечника і резорбтивної дії: на щурах з масою

тіла 169 ± 7 г, доза 500 мг/кг однократно, обслідування патолого-анатомічне через 30 хвилин і через 2 години після введення свічки, і через 24 години. При досліджуванні прямої кишки виявлена помірна кількість слизу у просвіті кишки, відсутність набряку або гіперемії слизової оболонки.

Також визначали наявність подразливої дії свічок на слизові оболонки ока: на 5 кроликах породи шиншила масою тіла $2,6\text{--}2,9$ кг, введення препарату в кількості 75 мг при $37\text{--}38^\circ\text{C}$ в кон'юнктивальний мішок одного ока, спостерігали через 15, 30, 60 і 120 хвилин після введення і потім протягом 24 годин. Не було встановлено яких-небудь запальних явищ, не було сльозотечі, набряків або ін'єкції судин склери та кон'юнктиви.

Крім того, визначали наявність подразливої дії свічок на шкіру: наносили 10 щурам масою тіла 175 ± 6 г та морським свинкам масою тіла 235 ± 17 г з білим шерстним покривом на депільовані ділянки шкіри розміром 2×2 см препарати, що містять сполуки згідно з винаходом у свічковій масі, підіпрітій до $37\text{--}38^\circ\text{C}$, у кількості 1000 мг . Тривалість аплікації становила 4 години. Не було помічено гіперемії шкіри, потовщення шкірної складки або яких-небудь інших ознак подразнення. Упродовж часу аплікації і протягом 24 годин після неї змін клінічного стану експериментальних тварин не виявлено.

Таким чином, встановлена відсутність місцевої подразливої та токсичної резорбтивної дії препаратів, що містять сполуки згідно з винаходом, при одноразовому застосуванні в значній дозі.

Для фахівців в галузі медицини та біоорганічної хімії має бути зрозуміло, що описані вище властивості сполук згідно з винаходом можуть проявлятися і в нормалізації інших виникаючих в організмі процесів, пов'язаних з метаболічним ацидозом і впливом надмірної кількості вільнорадикальних форм кисню, зокрема неконтрольованих запалень, неконтрольованого протеолізу, недостатньої активності ферменту хелікази, що відповідає за розкручування подвійної спіралі ДНК в реплікаційній вилці, неконтрольованих окисно-відновних процесів, процесів передчасного старіння організму з впливом на електронно-протонні процеси в мітохондріях і на функціонування дихального ланцюга.

Застосування циклічних біоізостерів похідних пуринової системи згідно з винаходом або їх фармакологічно прийнятних солей як активних інгредієнтів фармацевтичної композиції дозволяє створювати фармацевтичні композиції широкої галузі застосування. При цьому вони мають нормалізуючий вплив на життєво важливі системи організму, який, в залежності від показань, від кількості активного інгредієнта в лікарському препараті, від величини дози, від умов уведення в організм, від режиму прийому препарату, може бути спрогнозований і вибраний оптимальним.

Фармацевтично прийнятними солями циклічних біоізостерів похідних пуринової системи згідно з винаходом можуть бути солі фармацевтично прийнятних металів, таких як літій, натрій, калій, кальцій, барій, срібло, а також солі фармацевтично прийнятних кислот, таких як гідрохлориди, сульфати, ацетати, гідроброміди, фосфати, сукцина-

ти, малеати, фумарати, цитрати, глюконати, метилсульфонати, п-толуолсульфонати. Фармацевтично прийнятні солі можна отримувати при взаємодії циклічних біоізостерів похідних пуринової системи з відповідними кислотами або основами.

Фармацевтична композиція згідно з винаходом може як активний інгредієнт містити композицію з декількох сполук згідно з винаходом, наприклад солей лужних та/або лужноземельних металів, наприклад композицію натрієвої і калієвої солей, натрієвої та літєвої та інших, які добре поєднуються між собою і, в залежності від їхньої біологічної активності, можуть, наприклад, збільшувати тривалість дії лікарського препарату в організмі.

Фармацевтична композиція на основі сполук згідно з винаходом може являти собою розчин активного інгредієнта у фармацевтично прийнятному рідкому носії або розчиннику, наприклад у воді, фізіологічному розчині, буферних розчинах, або сумісного з інгредієнтами, які збільшують їх розчинність.

Фармацевтична композиція може являти собою тонкодисперсний порошок активного інгредієнта, придатний для застосування в розчинах для ін'єкцій, в аплікаціях, у приготуванні різних лікарських форм.

Оральне введення є зазвичай переважним шляхом для введення лікарських засобів в організм, оскільки цей шлях є найбільш зручним і прийнятним для пацієнта. Композиції згідно з винаходом можуть бути виконані у вигляді засобів для орального введення, наприклад таблеток, гранул, кульок, порошків, капсул, ампул, суспензій, емульсій. При цьому фармацевтична композиція може додатково містити засоби підвищення біодоступності, наприклад мікрокристалічну целюлозу, що дозволяє зменшити вміст біологічно активного інгредієнта в разовій дозі лікарського засобу, або, крім того, може бути виконана у вигляді спонтанно диспергованого концентрату, який змішуваний з дистильованою водою або фізіологічним розчином кухонної солі створює водні мікроемульсії, фазовостабільні, з підвищеною здатністю проникнення і розповсюдження.

Краще, особливо при лікуванні гострих станів, щоб фармацевтична композиція мала швидку і поступово наступаючу дію і добру біологічну сумісність компонентів композиції і середовища.

Швидкого поглинання активного інгредієнта можна досягти парентеральною ін'єкцією, що для клінічних умов є традиційним, але що є неприйнятним при самолікуванні. В цьому випадку ефективним є доставка лікарського засобу в організм ректально, за допомогою супозиторіїв, клізм, м'яких желатинових капсул, свічок, наприклад у вигляді твердих дозованих форм з придатною конфігурацією, які або плавляться при температурі тіла, або розчиняються або диспергуються в порожнині слизової секреції. Циклічні біоізостери похідних пуринової системи згідно з винаходом добре поєднуються з відомими компонентами та інгредієнтами, застосовуваними для виготовлення лікарських препаратів.

Фахівцям в галузі медицини відомо, що для поліпшення адсорбції біологічно активних речовин,

які мають недостатню розчинність у воді або в будь-яких вибіркових середовищах, активний інгредієнт фармацевтичної композиції у формі високонасиченого розчину, в твердій формі може бути інкапсульований в одній або більше пластинчастій мембрані, що містить ліпіди, наприклад в ліпосомах, які дозволяють доставляти активний інгредієнт у специфічну зону.

Згідно з винаходом у фармацевтичній композиції похідні фталгідразинів та їхні солі можуть міститися в ліпосомальній формі, наприклад у багатофазній ліпосомній системі доставки ліків, яка є стабільною і яку можна легко розбавляти водою, варіюючи стан фармацевтичної композиції від стану розбавленої рідини до желатинового стану, що є важливим для похідних сполук, які у початковому стані погано розчиняються в середовищі шлунково-кишкового тракту, а також розширює можливості застосування більш високих доз активного інгредієнта при введенні орально.

Крім того, у фармацевтичній композиції згідно з винаходом фармацевтично прийнятний носій може являти собою композицію, що містить фармакологічно активні добавки. При цьому, згідно з винаходом фармакологічно активні добавки можуть бути вибрані з групи, що включає стабілізатори, диспергатори, ароматизатори, емульгатори, провідники, засоби підвищення біодоступності, одним з яких може бути засіб для підвищення розчинності важкорозчинних сполук, наприклад розчинник диметилсульфоксид (ДМСО).

При багатьох захворюваннях доцільно використовувати різні способи місцевого впливу на патологічний процес, особливо при наявності протипоказань до загальної терапії, наприклад при значному порушенні життєво важливих органів. Одним зі способів місцевого впливу є застосування зовнішніх лікарських засобів.

Відомо, що, виходячи з чутливості шкіри, вірогідності її подразнення і трансдермальної абсорбційної здатності (гігроскопічності шкіри), рН фармацевтичного препарату для зовнішнього застосування краще підтримувати в межах 4-8, ще краще - в межах 5-7. Коли рН надто малий (3 і менше), його висока кислотність викликає сильне подразнення шкіри. Коли рН надто великий (9 і більше), трансдермальне всмоктування активного інгредієнта зникається, подразнення шкіри посилюється.

Для посилення трансдермального поглинання (всмоктування) активного інгредієнта до фармацевтичного препарату можна додавати так звані підсилювачі поглинання, наприклад органічні основи, наприклад триетаноламін, кротамітон, складні ефіри жирних кислот із середньою довжиною ланцюга, 1-ментол, бензиловий спирт і подібні до них речовини. Органічна основа полегшує вивільнення активного інгредієнта з основи, оскільки робить його більш водорозчинним завдяки утворенню солей. Органічна основа діє як регулятор рН лікарського препарату.

Для регулювання рН лікарського засобу також використовують лужні сполуки (гідроокис калію і натрію, триетаноламін, дізопропаноламін, моноетаноламін та інші).

Розчини металевих солей сполук згідно з винаходом мають рН 7-8, розчини гідрохлоридів, ацетатів, фосфатів, гідробромідів, нітратів, сульфатів та інших органічних солей сполук згідно з винаходом мають рН 4-7, що створює хороші перспективи створення лікарських засобів для зовнішнього застосування.

При цьому фармацевтична композиція для зовнішнього застосування може являти собою гелемульсію, що містить як активний інгредієнт біоізомер похідного пуринової системи згідно з винаходом, гідрофільний полімер, маслянисту речовину, неіонний поверхнево-активний агент, лужну сполуку або органічну основу як регулятор рН середовища і воду. При цьому біоізостери похідних пуринової системи згідно з винаходом є хімічно сумісними з цими інгредієнтами.

Фармацевтична композиція згідно з винаходом може бути виконана у вигляді, наприклад, зникаючої емульсії, що включає вищий спирт, вуглеводень, складний ефір жирної кислоти, багатоатомний спирт або луг, антисептик, воду та інші інгредієнти.

Можливі фармацевтичні композиції на основі сполук згідно з винаходом, наприклад у вигляді гелів, із застосуванням як гелеутворювачів похідних целюлози, наприклад оксиетилцелюлози, оксипропілцелюлози, карбоксиметилцелюлози та інших похідних, що містять крохмаль, желатин, синтетичні полімери, наприклад полівінілпіролідон, поліетиленгліколь, змочувальні агенти, наприклад багатоатомні спирти, такі як гліцерин, 1,3-бутиленгліколь, пропіленгліколь, дипропіленгліколь та інші.

Фармацевтична композиція на основі біоізомерів похідних пуринової системи згідно з винаходом може являти собою гідрофільну мазь або гігроскопічну мазеву емульсію, що містять білий вазелін, рідкий парафін, поверхнево-активну речовину, якими можуть служити, наприклад, складні ефіри сорбітану та жирних кислот (сорбітанмоностеарат і ефіри), складні ефіри гліцерину та жирних кислот (гліцерилмоностеарат, дигліцерилмоностеарат та інші), складні ефіри поліоксидетиленсорбітану та жирних кислот (поліоксидетиленмоностеарат та інші), складні ефіри поліетиленгліколю та жирних кислот, поліетиленову гідрогенізовану рицинову олію, суміш цих речовин та інші компоненти, наприклад вищі спирти, такі як вуглеводень, наприклад парафін, церезин, цетиловий спирт (цетанол), стеариловий спирт, олеїловий спирт, бегеніловий спирт, ефіри жирної кислоти, наприклад стеаринової, олеїнової, багатоатомний спирт, олію та жири рослинного походження, наприклад оливкову, олію жожоба, рицинову олію, тваринні жири (яловичий та свинячий лій та інші жири), гірський віск, бджолиний віск, а також антисептик, наприклад метилпарабен, пропілпарабен, і воду.

Застосування циклічних біоізомерів похідних пуринової системи згідно з винаходом або їх фармакологічно прийнятних солей як активних інгредієнтів фармацевтичної композиції дозволяє створювати фармацевтичні композиції широкого застосування з використанням терапевтичного ефекту, обумовленого виявленими властивостями

$$K = I_{530} / I_{570}$$

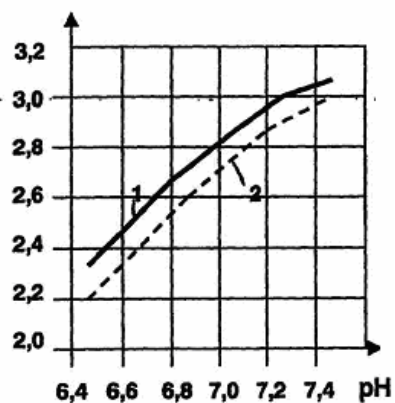


Fig. 1a

$$K = I_{530} / I_{570}$$

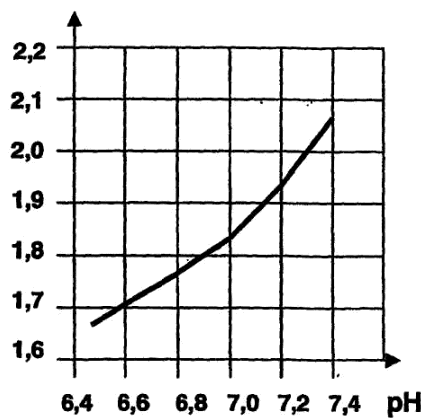


Fig. 1b

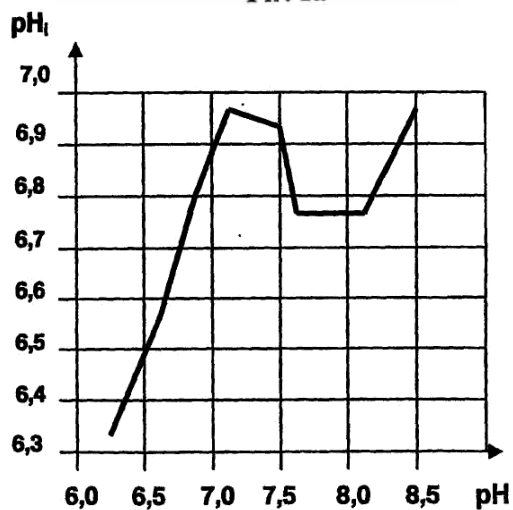


Fig. 2

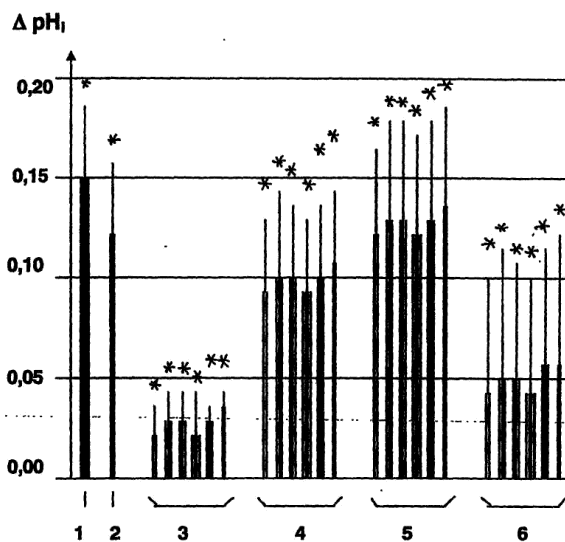


Fig. 3

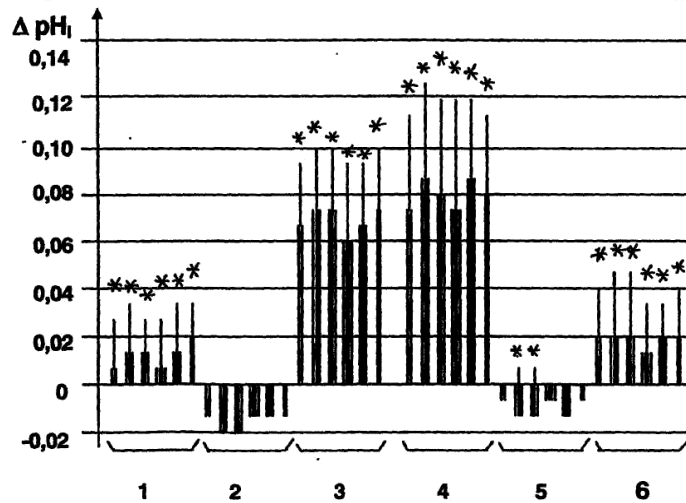
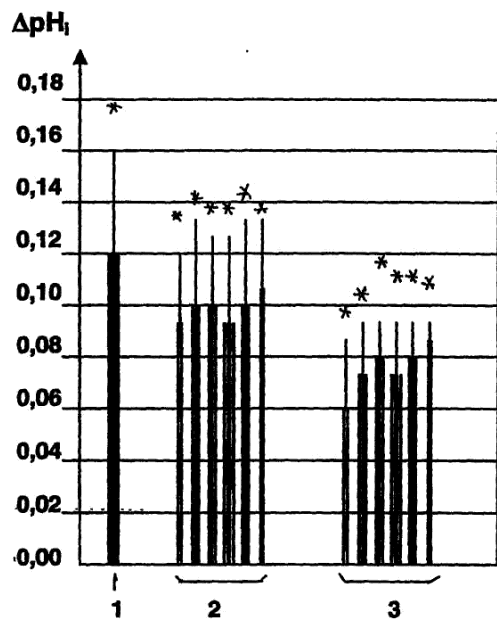
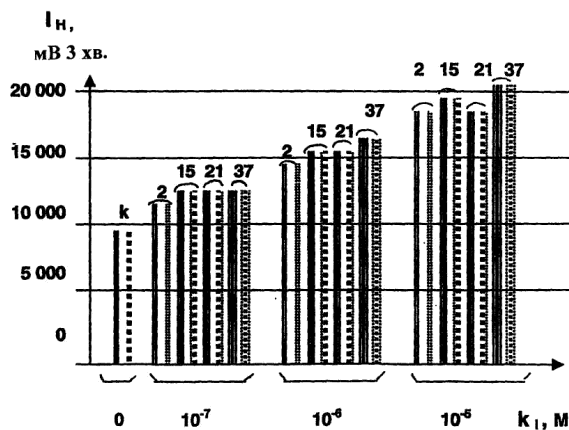


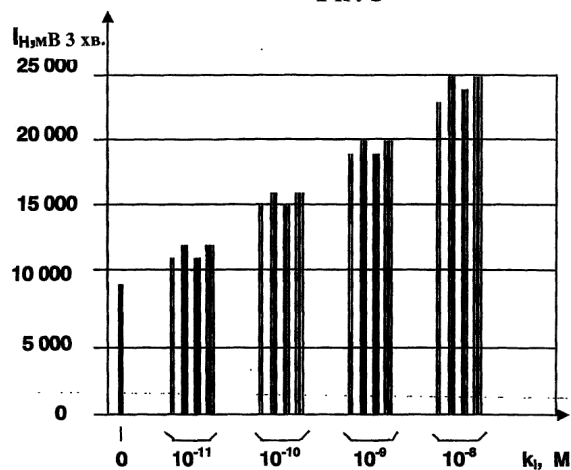
Fig. 4



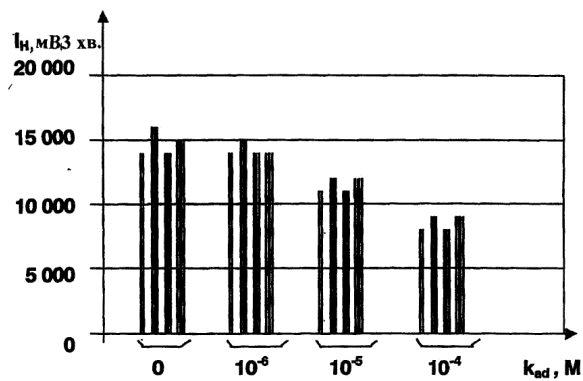
Фиг. 5



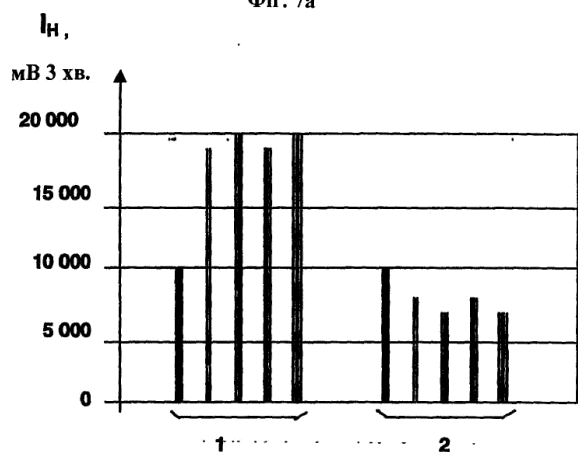
Фиг. 6



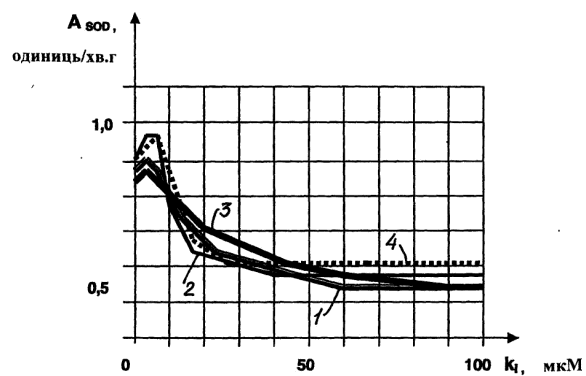
Фиг. 7a



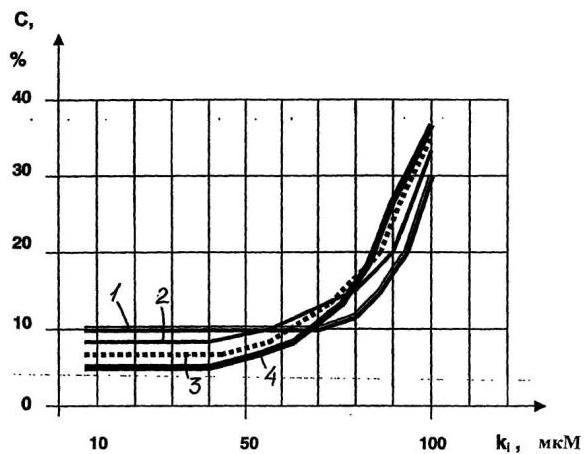
Фиг. 7б



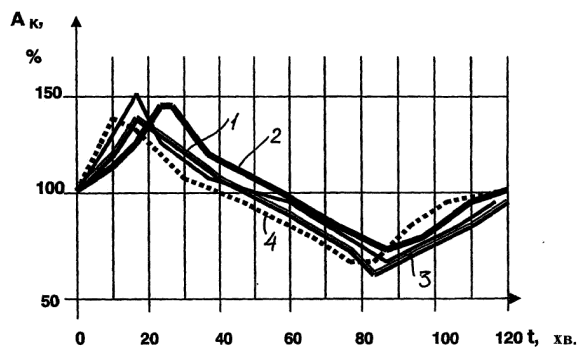
Фиг. 8



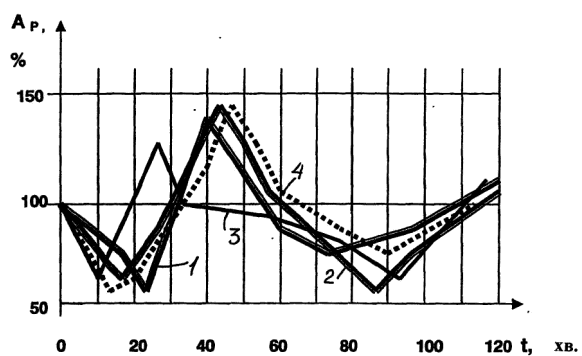
Фиг. 9



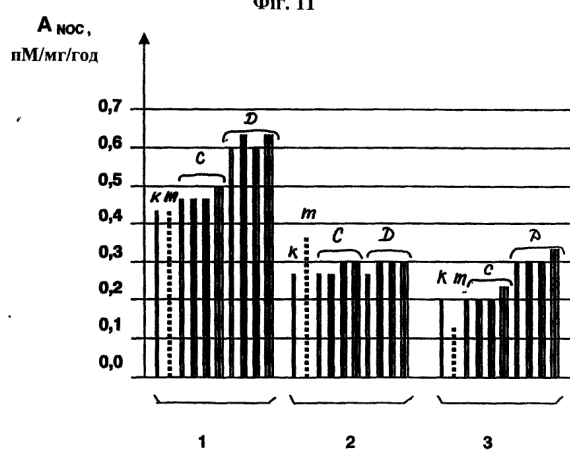
Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13