

Міністерство освіти і науки України
Ніжинський державний університет імені Миколи Гоголя
Факультет природничо-географічних і точних наук
Кафедра хімії та фармації

Освітньо-професійна програма:

Хімія, медична та фармацевтична хімія

Спеціальність: *102 Хімія*

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

На здобуття освітнього ступеня магістр

Синтез та дослідження *in silico* похідних 4-ціано- та 4-трифенілфосфорильованих похідних 5-(8-оксо-1,5,6,8-тетрагідро-2*H*-1,5-метанопіридо[1,2-*a*][1,5]діазоцин-3(4*H*)-іл)-1,3-оксазолу як потенційних інгібіторів глутатіонредуктази *Candida spp.*

студента **Циганкова Сергія Андрійовича**

Наукові керівники: д.х.н., професор **Суховєєв В.В.**, к.б.н., ст.н.с. Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАН України **Семенюта І.В.**

Рецензенти: доцент кафедри хімії, технологій та фармації Національного університету «Чернігівський колегіум» імені Т.Г.Шевченка канд.фарм.наук **Янченко В.О.**; завідувач кафедри життєдіяльності і природокористування відокремленого підрозділу Національного університету біоресурсів і природокористування України «Ніжинський агротехнічний інститут», к.б.н., доцент **Семеніхін А.В.**

Допущено до захисту

Завідувач кафедри хімії та фармації

«14» грудня 2020 р. _____/В.В.Суховєєв/

Ніжин – 2020

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	4
ВСТУП	6
РОЗДІЛ I СТРУКТУРА ТА ФУНКЦІЇ ГЛУТАТІОНРЕДУКТАЗИ	
1.1. Структура і функції глутатіонредуктази	10
1.1.1. Функціонально подібні ферменти щодо глутатіонредуктази	14
1.2. Механізм дії глутатіонредуктази.....	21
1.2.1. GR каталітичний цикл	21
1.2.2. GSH як відновник дисульфідів і відновник GSSG	22
1.2.3. GSH як відновник для пероксидів.....	23
1.2.4. GSH як нуклеофіл	24
1.3. Інгібітори глутатіонредуктази та їх значення у медицині.....	24
РОЗДІЛ II МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	
2.1. Матеріали.....	28
2.2. QSAR моделювання.....	28
2.2.1. Підготовка набору даних.....	28
2.2.2. Методи машинного навчання	28
2.2.3. Розрахунок дескрипторів	29
2.2.4. Перевірка моделей	29
2.3. Хімічний синтез 4-ціано- та 4-трифенілфосфорильованих похідних 5-(8-оксо-1,5,6,8-тетрагідро-2 <i>H</i> -1,5-метанопіридо[1,2- <i>a</i>][1,5]діазоцин- 3(4 <i>H</i>)-іл)-1,3-оксазолу.....	30
2.3.1. Синтез 5-цитизиніл-1,3-оксазол-4-іл(трифеніл)фосфоній перхлоратів 1-7.....	30
2.3.2. Синтез 5-цитизиніл-1,3-оксазол-4-карбонітрилів 8-11	34
2.4. Біологічні дослідження цитизиновмісних 1, 3-оксазолів як інгібіторів глутатіонредуктази.....	35
2.5. Гомологічне моделювання глутатіонредуктази <i>Candida albicans</i>	36

2.6. Молекулярний докінг	36
РОЗДІЛ ІІІ. ДОСЛІДЖЕННЯ ПОТЕНЦІЙНИХ ІНГІБІТОРІВ	
ГЛУТАТІОНРЕДУКТАЗИ <i>Candida albicans</i>	
3.1. Створення QSAR моделей	38
3.2. Прогноз активності нових сполук	41
3.3. Хімічний синтез цитизиновмісних 1,3-оксазолів	44
3.4. Біологічна активність цитизиновмісних 1,3-оксазолів	48
3.5. Створення гомологічної моделі глутатіонредуктази <i>Candida albicans</i>	49
3.5.1. Порівняння первинної структури тіоредоксин глутатіон-редуктази <i>Schistosoma mansoni</i> та глутатіонредуктази <i>Candida albicans</i>	49
3.6. Гомологічне моделювання глутатіонредуктази <i>Candida albicans</i>	50
3.7. Молекулярний докінг	53
ВИСНОВКИ	57
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	59

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

QSAR	Quantitative Structure Activity Relationship (кількісний взаємозв'язок структура активність)
OCHEM	Organic Chemistry molecular model online
PubChem	база даних хімічних молекул, (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)
ChEMBL	база хімічних молекул з біоактивними властивостями, (https://www.ebi.ac.uk/chembl/)
ChemSpider	база даних хімічних сполук і сумішей, (http://www.chemspider.com/)
SWISS-MODEL	веб-сервер з біоінформатики, призначений для гомологічного моделювання 3D-білкових структур, https://swissmodel.expasy.org/
NCBI PROTEIN BLAST	Веб-сервер пошуку регіонів подібності між первинними структурами білків, https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
ERRAT	Веб-сервер для перевірки якості структури білків, https://servicesn.mbi.ucla.edu/ERRAT/
PROCHECK	Веб-сервер для стереохімічної перевірки якості структури білку, https://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/
QMEAN	Qualitative Model Energy Analysis (композиційна функція оцінки, що описує основні геометричні аспекти білкових структур)
GMQE	Global Model Quality Estimation (глобальна оцінка якості моделі)
QSQE	Quaternary Structure Quality Estimate (оцінка якості четвертинної структури)
MIC	Значення мінімальної інгібуючої концентрації
DMSO	диметилсульфоксид
TMS	Тетраметилсилан

ЯМР	Спектроскопія ядерного магнітного резонансу
ASNNs	асоціативні нейронні мережі
kNN	метод k – найближчих сусідів
ШНМ	штучні нейронні мережі
WEKA-RF	метод «випадкового лісу»
RMSE	Root Mean Squared Error (середньоквадратична помилка прогнозу)
MAE	Mean Absolute Error (абсолютна помилка прогнозу)
FAD	Flavin Adenine Dinucleotide (флавінаденіндинуклеотид)
GSSG	Glutathione disulfide, (глутатіондісульфід)
GSH	Glutathione, (глутатіон)
q2	коефіцієнт перехресної перевірки
R ²	коефіцієнт кореляції
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, (нікотинамідаденін-динуклеотидфосфат - відновлена форма)

ВСТУП

Актуальність теми. Глутатіонредуктаза, як фермент групи оксидоредуктаз, каталізує NADPH-залежне відновлення дисульфїду глутатіону (GSSG) до глутатіону (GSH). Ця реакція необхідна для підтримки рівня глутатіону в організмі. Глутатіон відіграє важливу роль як відновник в окисно-відновних процесах та має велике значення для процесів детоксикації та інших клітинних функцій. Відомо, що порушення рівня глутатіону призводить до розвитку “оксидативного стресу” та різних дегенеративних процесів, які супроводжуються порушенням окисно-відновних процесів у клітині. Наразі глутатіонредуктаза є перспективною мішенню, в тому числі і для пошуку протипаразитарних препаратів.

На сьогодні існує ряд інгібіторів глутатіонредуктази, які застосовуються як протималарійні препарати (*Plasmodium falciparum*) [1], для лікування трипаносомозу (*Trypanosoma cruzi*) [2], лейшманіозу (*Leishmania spp.*) [3], шистосомозу (*Schistosoma mansoni*) [4] тощо. Проте зростання лікарської резистентності фунгальних патогенів до існуючих препаратів потребує подальшого пошуку альтернативних мішеней для створення ефективних антифунгальних препаратів [5].

Метою роботи був пошук потенційних інгібіторів глутатіонредуктази як потенційних антикандидозних агентів.

Для досягнення мети необхідно було вирішити наступні **завдання**:

1. Проаналізувати сучасні літературні джерела щодо структурних та функціональних особливостей глутатіонредуктаз.
2. Використовуючи OCHEM веб-платформу передбачити сполуки з антифунгальною активністю серед цитизиновмісних похідних 1,3-оксазолу та провести аналіз структурних особливостей відомих інгібіторів глутатіонредуктази в онлайн базах хімічних сполук PubChem, ChEMBL, ChemSpider.
3. Провести експериментальні дослідження антифунгальної активності сполук з прогнозованою активністю щодо стандартного штаму

Candida albicans та флуконазолу - резистентного штаму клінічного ізоляту *Candida krusei*.

4. Створити гомологічну модель глутатіонредуктази *Candida albicans* на основі первинної структури дослідженого ферменту з використання веб-серверу SWISS-MODEL.
5. Запропонувати молекулярний механізм антифунгальної дії цитизиновмісних 1,3-оксазолів як потенційних інгібіторів глутатіонредуктази *Candida albicans* методом докінгу за використання створеної гомологічної моделі глутатіонредуктази гриба.

Об'єкт дослідження – 4-ціано- та 4-трифеніл-фосфорильовані похідні 5-(8-оксо-1,5,6,8-тетрагідро-2*H*-1,5-метанопіридо[1,2-*a*][1,5]діазоцин-3(4*H*)-іл)-1,3-оксазолу як потенційні інгібітори глутатіонредуктази *Candida spp.*

Предмет дослідження – QSAR моделювання, *in vitro* антифунгальна активність, гомологічна модель глутатіонредуктази *Candida albicans*, молекулярний докінг.

Методи дослідження – хімічний синтез, мікробіологічне тестування (диско-дифузійний метод визначення активності *in vitro*), гомологічне моделювання, молекулярний докінг, статистичні розрахунки.

Наукова новизна одержаних результатів. За допомогою веб-серверу SWISS-MODEL створено нову гомологічну модель глутатіонредуктази *Candida albicans* з високими показниками якості як один із підходів до пошуку та конструювання нових антифунгальних агентів із специфічним молекулярним механізмом протигрибкової дії. Представлено синтез нових біологічно активних цитизиновмісних 1,3-оксазолів. Експериментально продемонстровано нові результати біологічного тестування досліджених сполук із високим антифунгальним потенціалом. Запропоновано альтернативний механізм молекулярної дії досліджених цитизиновмісних 1,3-оксазолів **10** та **11** як інгібіторів глутатіонредуктази *Candida albicans*.

Практичне значення одержаних результатів. Створені прогнозуючі класифікаційні QSAR моделі активності з високими показниками стабільності та збалансованості є опублікованими та загальнодоступними і представляються ефективним інструментом для успішного пошуку та розробки нових протигрибкових засобів з відповідним механізмом молекулярної дії проти штамів гриба *Candida spp.*

Матеріали магістерської роботи можуть бути використані при проведенні факультативних занять з хімії у ліцєях з профільного навчання та спеціалізованих школах з поглибленим вивченням природничих дисциплін.

Особистий внесок дослідника. Магістром проведено огляд наукової літератури, виконано експериментальну частину роботи на базі відділу медико-біологічних досліджень Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України ім. В.П. Кухаря (зав. відділом – кандидат біологічних наук, Метелиця Лариса Олексіївна) та відділу хімії біоактивних азотовмісних гетероциклічних основ (зав. відділом – доктор хімічних наук, професор, Броварець В.С.). Ідея розробки належить науковим керівникам. Обговорення результатів дослідження, формування структури роботи, формулювання висновків проводились спільно з керівниками.

Апробація результатів досліджень. Результати магістерської роботи опубліковані в Збірнику статей за матеріалами VI Міжнародної заочної науково-практичної конференції молодих учених «Фундаментальні та прикладні дослідження в сучасній хімії» (Ніжин, 2019).

Публікації. За матеріалами магістерського дослідження опубліковано статтю “1,3-Oxazole derivatives of cytosine as potential inhibitors of glutathione reductase of *Candida spp.*: QSAR modeling, docking analysis and experimental study of new anti-*Candida* agents” в журналі “Computational Biology and Chemistry” видавництва ELSEVIER, що входить до наукометричних баз.

Структура та об’єм магістерської роботи. Магістерська складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, експериментальної частини, що включає виклад отриманих результатів та їх обговорення,

висновків і списку використаних джерел, до складу якого входить 183 найменувань.

Магістерська робота налічує 76 сторінок друкованого тексту, проілюстрована 5 таблицями і 30 рисунками.

РОЗДІЛ І. ГЛЮТАТІОНРЕДУКТАЗА GSR: СТРУКТУРА ТА ФУНКЦІЇ

1.1. Структура і функції глутатіонредуктази

Глутатіонредуктази (GR) або глутатіон дисульфід-редуктази (GRS) – окисно-відновний флавофермент родини піридин-нуклеотид-дисульфід-оксидоредуктази, яка також охоплює близькі ферменти трипанотіонредуктазу, дигідроліпоаміддегідрогеназу тощо [6–8], який у людини кодується GSR геном. Його відновлена форма (GSH \equiv γ -L-глутаміл-L-цистеїнілгліцин)– нуклеофіл для перетворення електрофілів у фізіологічних умовах (рис. 1.1) [9].

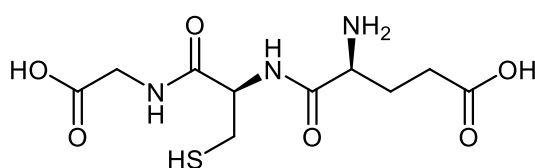


Рис. 1.1. Відновлена форма GSH – γ -L-глутаміл-L-цистеїнілгліцин.

Глутатіонредуктазу вперше виділено з дріжджів у 1955 р. [10] та підтверджено, що NADPH є донором електронів у GR каталітичному циклі. У 1965 р. доведено наявність FAD та групи тіолів та запропоновано механізм їх дії [11, 12]. Початкову структуру GR виділено у 1977 р. із еритроцитів та описано її структуру [13]. Повну амінокислотну послідовність було отримано в 1981 р. [14]. На сьогодні GR є одним з найбільш вивчених ферментів та є еталонним білком для вивчення окисно-відновного каталізу.

На рис. 1.2 показано структуру глутатіонредуктази. GR-ізоформи про- і еукаріот утворюють стабільні гомодимери (рис. 1.2, *a*) [13–17]. Кожна субодиниця містить центр зв'язування FAD, утворений згином Россмана. Ізоалоксазинове кільце FAD розділяє виокремлені центри зв'язування субстрату для NADPH і GSSG (рис. 1.2, *b*). NADPH-зв'язуючий центр кожної субодиниці також утворений типовою россманівською складкою і, можливо, утворюється із генної дуплікації предка, який кодує значну частину центру зв'язування FAD [18]. Кожен GSSG-зв'язуючий центр утворений обома субодиницями (рис. 1.2, *c*), і тому фермент функціонує як гомодимер [13]. Структура, як і центри зв'язування субстрату, так і загальна амінокислотна послідовність GR-ізоформ, не

змінювалася протягом еволюції. Основні відмінності спостерігаються в структурі субодиниць. Наприклад, субодиниці кристалізованої людської GR зв'язані дисульфідним зв'язком цистеїну [8, 14, 19], на відміну від GR-ізоформ дріжджів [16], *Plasmodium falciparum* [1, 6] і *E. coli* [15]. Залишки цистеїну – Cys₃ на N-кінці GR людини або залишок Cys₂₃₉ GR дріжджів – піддаються дії розчинника і можуть виконувати регулюючу функцію [14, 16, 20]. Іншим, потенційним, центром зв'язування для регуляторних молекул є порожнина на межі поділу димерів [1, 6, 17].

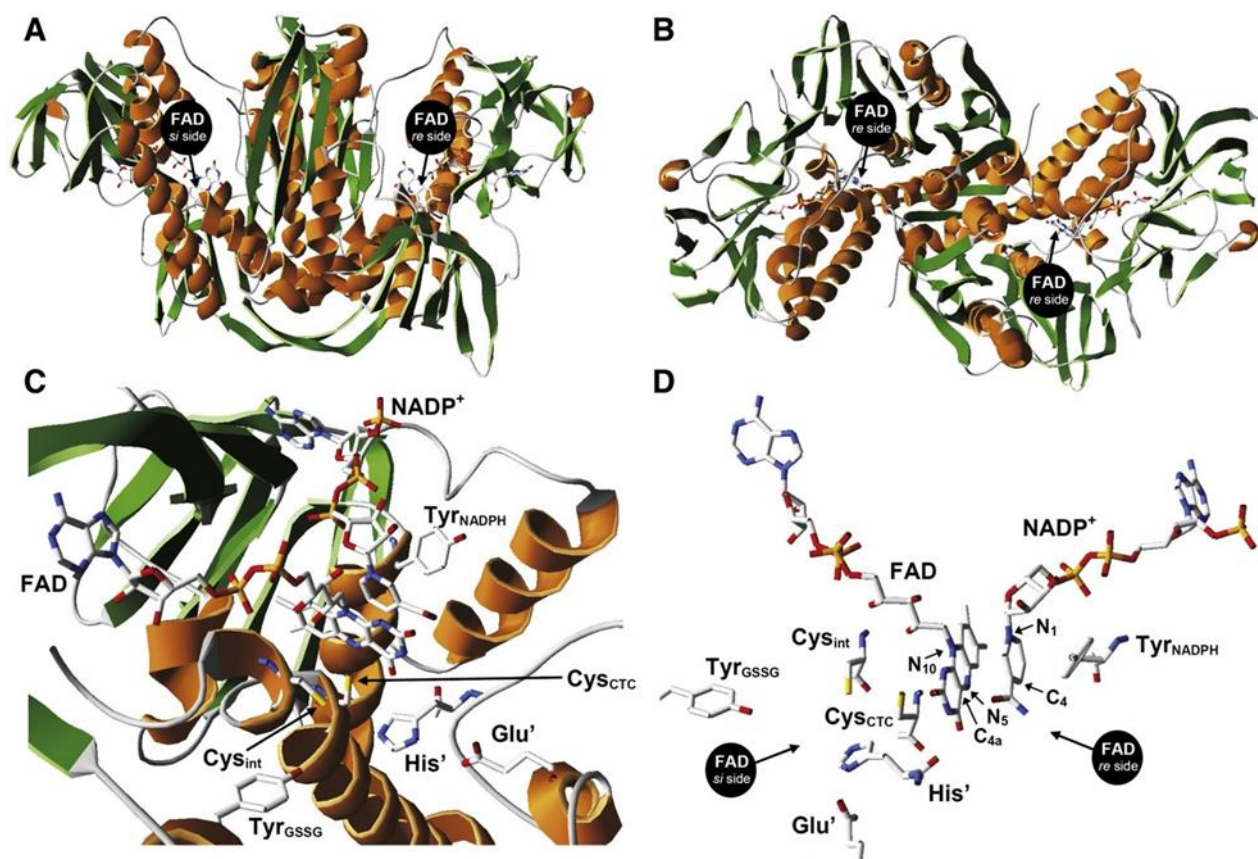


Рис. 1.2. Структура GR.

a) Вигляд спереду гомодимерної GR з однією молекулою FAD, що зв'язана на субодиницю. Обидві субодиниці не є симетричними; b) Вигляд зверху із щілиною на зворотному боці FAD, де зв'язується NADPH; c) Збільшення активного центру GR. Молекула NADP⁺ зв'язана на зворотному боці. Виділено залишки, важливі для зв'язування субстрату та каталізу; d) Вигляд збоку активного центру, що демонструє просторове розділення обох ділянок, які зв'язують субстрат. Виділені атоми NADP⁺ та FAD [15].

Глутатіон-залежні ферменти суттєво прискорюють хімічні реакції в метаболічних перетвореннях, а саме [21]:

- каталізують відновлення глутатіонсульфіду (GSSG) до сульфгідрильної форми глутатіону (GSH), яка відіграє важливу роль при окисному стресі та підтримує відновлення клітини [22–24] (рис. 1.3);

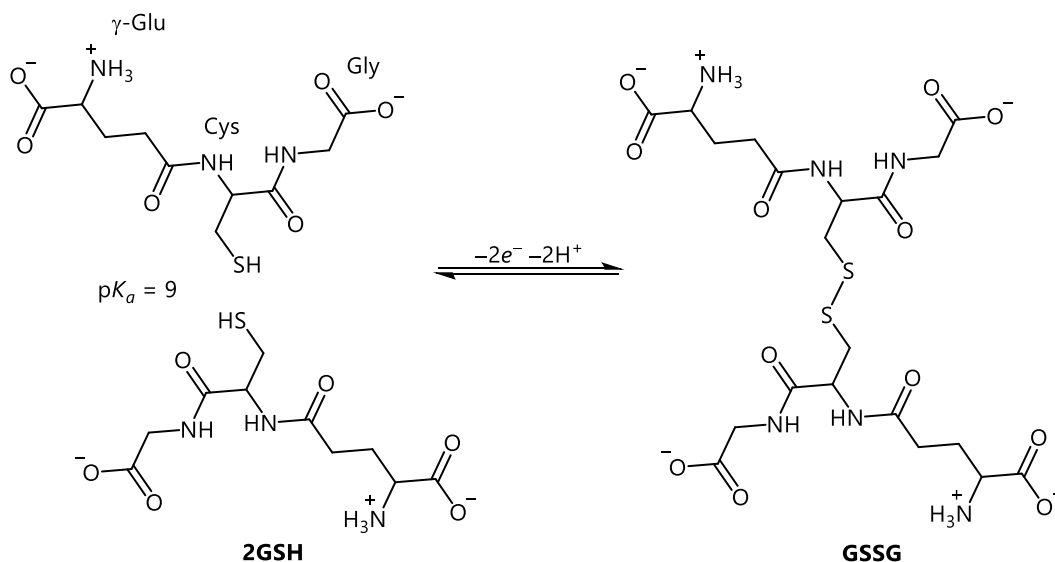


Рис. 1.3. Відновлення GSSG до GSH та окиснення GSH до GSSG.

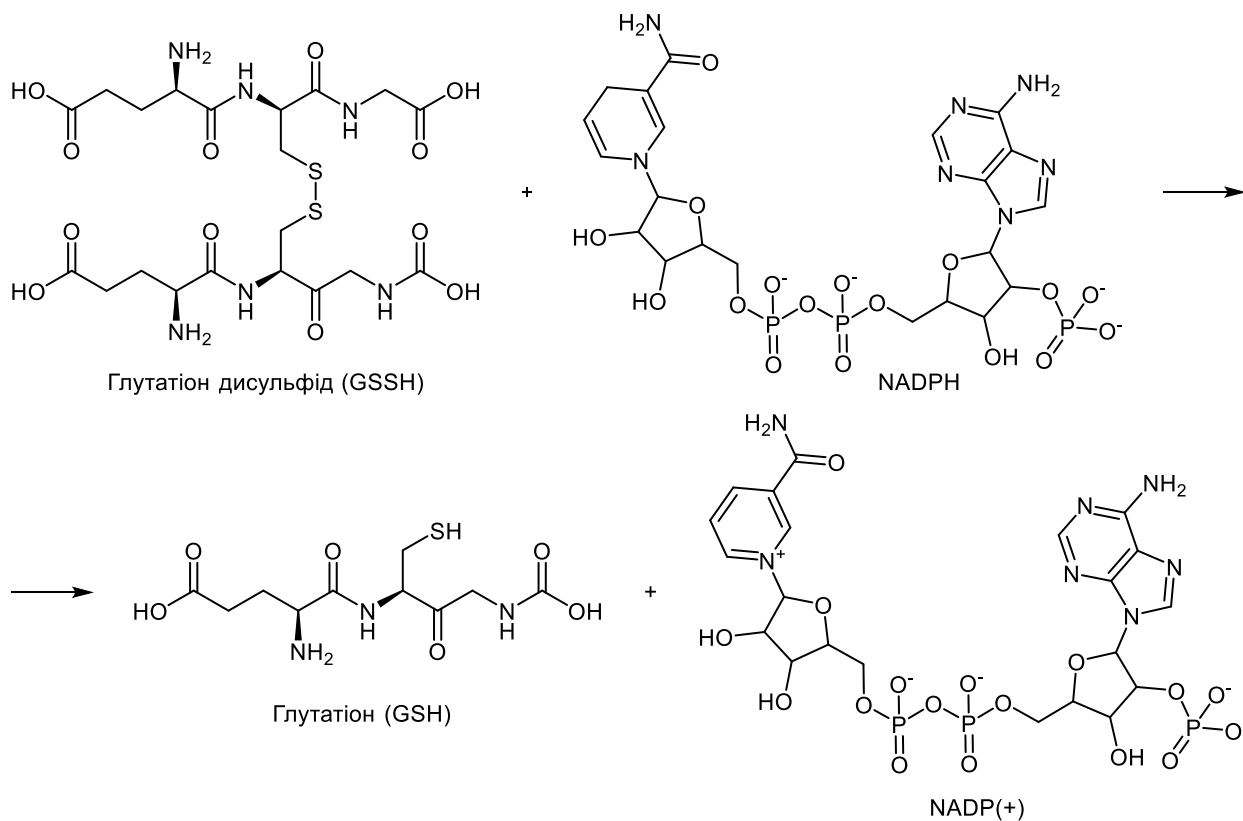


Рис. 1.4. Схема взаємодії GSSH та NADPH

- функціонує як димероксидсульфідна оксидоредуктаза із застосуванням FAD та NADPH та знижує один молярний еквівалент GSSG до двох мольних еквівалентів GSH за схемою (рис. 1.4).

Глутатіонредуктаза зберігається між усіма царствами:

- бактерії, дріжджі та тварини містять один ген глутатіонредуктази;
- у рослинних геномах закодовано два гени GR.

Дрозофіла та трипаносоми взагалі не містять GR. Зниження глутатіону у них здійснюється системами, що містять тіоредоксин або трипанотіон [25, 26].

Глутатіон відіграє ключову роль у підтримці функцій та запобіганні окисного стресу в клітинах людини. Він може діяти як захисник від гідроксильних радикалів, синглетного кисню та різних електрофілів. Глутатіон відновлює окиснену форму ферменту глутатіонпероксидазу, що, в свою чергу, відновлює гідроген пероксид (H_2O_2). Крім того, відіграє ключову роль у метаболізмі та зниженні ксенобіотиків, діє як кофактор у певних детоксикаційних ферментах, бере участь у транспорті та відновлює такі антиоксиданти, як вітаміни E і C, до їх активних форм. Співвідношення GSSG/GSH у клітині, є ключовим фактором підтримання окисно-відновного балансу клітини, тобто клітина підтримує високий рівень відновленого глутатіону та низький рівень окисненого дисульфиду глутатіону (рис. 1.5). [23].

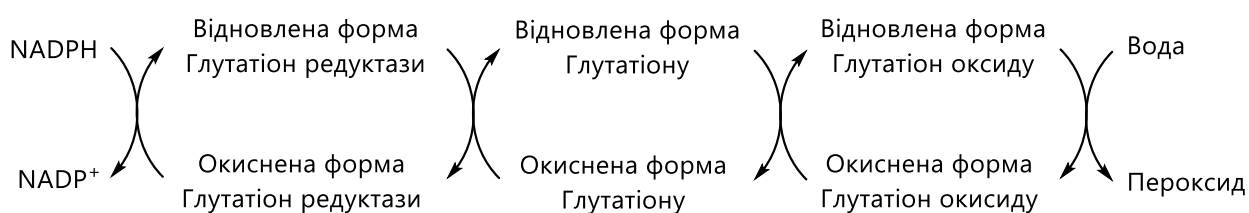


Рис. 1.5. Загальна схема відновлення GSSG до GSH

Знижена глутатіонредуктаза, глутатіонпероксидаза та глутатіон взаємодіють, щоб відновити гідроген пероксид до води для захисту клітини від окисного пошкодження.

Функціонально GR являє собою оксидоредуктазу NADPH: GSSG (EC 1.8.1.7). Фермент містить три субстрата ($NADPH$, H^+ і GSSG) і два продукти

(GSH і GSSG). Хоча протоном, як субстратом нехтують. Фермент зв'язує клітинний NADPH з тіолом/дисульфідом (рис. 1.6).

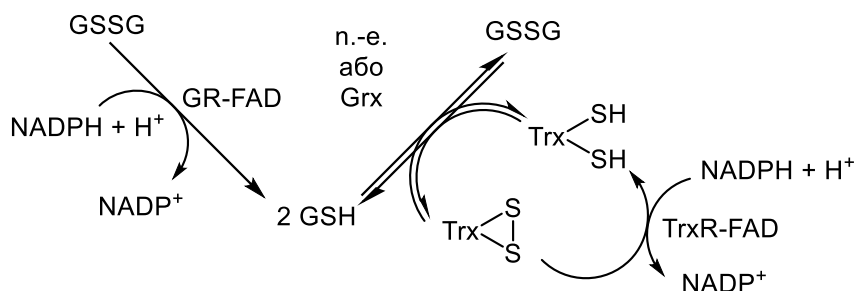


Рис. 1.6. NADPH-залежна регенерація GSH за допомогою GR та/або Trx і TrxR.

Отже, GR підтримує внутрішньоклітинне середовище завдяки високому GSH і низькому рівню GSSG. При чому, різні GR-ізоформи знайдено не лише в цитоплазмі, але і в мітохондріях і в хлоропластах [27–32]. Ці білки часто кодуються альтернативними стартовими кодонами одного і того ж гена, що призводить до наявності або відсутності N-кінцевої послідовності [27, 31–33]. Баланс між ізоформами, наприклад у дріжджів, можливо регулюється ефективністю ініціації трансляції і тому залежить від послідовності мРНК, яка прикриває стартовий кодон [27].

Глютатіонредуктаза еритроцитів людини є гомодимером, що складається з 52Kd мономерів, кожен з яких містить 3 домени. GR демонструє одношарову двошарову топологію, де антипаралельний бета-лист значною мірою піддається впливу розчинника на одній стороні, в той час як на іншому боці знаходяться NADPH-зв'язуючий, FAD-зв'язуючий і димеризаційний центри [34]. Кожен мономер містить 478 залишків і одну молекулу FAD. GR-термостабільний білок, зберігає свої властивості до 65 °C [35, 36].

1.1.1. Функціонально подібні ферменти щодо глютатіонредуктази

Тіоредоксин редуктаза

Тіоредоксин редуктаза (TrxRs) – фермент родини флавопротеїнів піридин-нуклеотид-дисульфід-оксидоредуктаз, яка включає ліпоаміддегідрогеназу, глютатіонредуктазу та меркурій-іонредуктазу. До цієї родини входять гомодимерні білки, в яких кожен мономер включає FAD-групу, центр

зв'язування NADPH та активний центр, що містить окисно-відновно-активний дисульфід. TrxR використовує NADPH для перетворення окисненого Trx у відновлений Trx та для відновлення окиснених форм аскорбату у відновлений аскорбат. Електрони переносяться від NADPH через FAD до дисульфиду TrxR з активним центром (рис. 1.7) [37]. Відновлений Trx забезпечує розщеплення H_2O_2 до води; рибонуклеотидредуктази, яка відновлює рибонуклеотиди до дезоксирибонуклеотидів для синтезу ДНК; впливає на фактори транскрипції, що призводять до їх підвищеного зв'язування з ДНК.

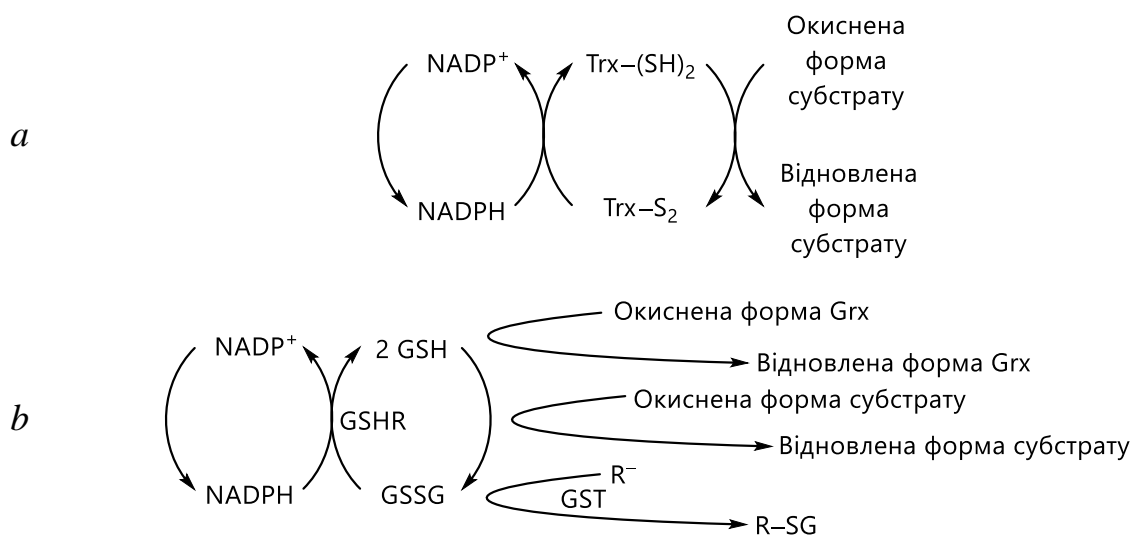


Рис. 1.7. Порівняння систем TrxR/Trx та глутатіонредуктази/глутатіону

Назва TrxR походить за її здатність зменшувати окиснені тіоредоксини (Trxs), які мають $-Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys$ -каталітичний центр, що зазнає оборотного окиснення двох залишків Cys. Окисно-відновна активність цієї каталітичної ділянки і виявляє біологічну активність Trx [38, 39]. Авторами [40, 41] доведено, що Trxs ссавців функціонують як фактори росту клітин та інгібують апоптоз. Оскільки TrxR є єдиним класом ферментів, які зменшують окиснений Trx, можливо, зміни в активності TrxR можуть регулювати інші види діяльності Trx. Окрім Trxs, для TrxR продемонстровано інші ендogenous субстрати, включаючи ліпоєву кислоту [42], гідропероксиди ліпідів [43], цитотоксичний пептид НК-лізин [44], вітамін K_3 [45], дегідроаскорбінову кислоту [46], вільний радикал аскорбілу [47] та білок-супресор пухлини p53 [48] (рис 1.8).

Крім інгібування апоптозу [40, 41], Trx може впливати на регуляцію росту клітин. Наприклад, активність TrxR, у культивованих клітинах, можна підвищити в кілька разів [49]. Трансфекція клітин раку молочної залози MCF-7 варіантом TrxR1, *Grim-12*, призводить до збільшення активності TrxR більш ніж у 3 рази, але стимуляція росту клітин менша на 50% [50].

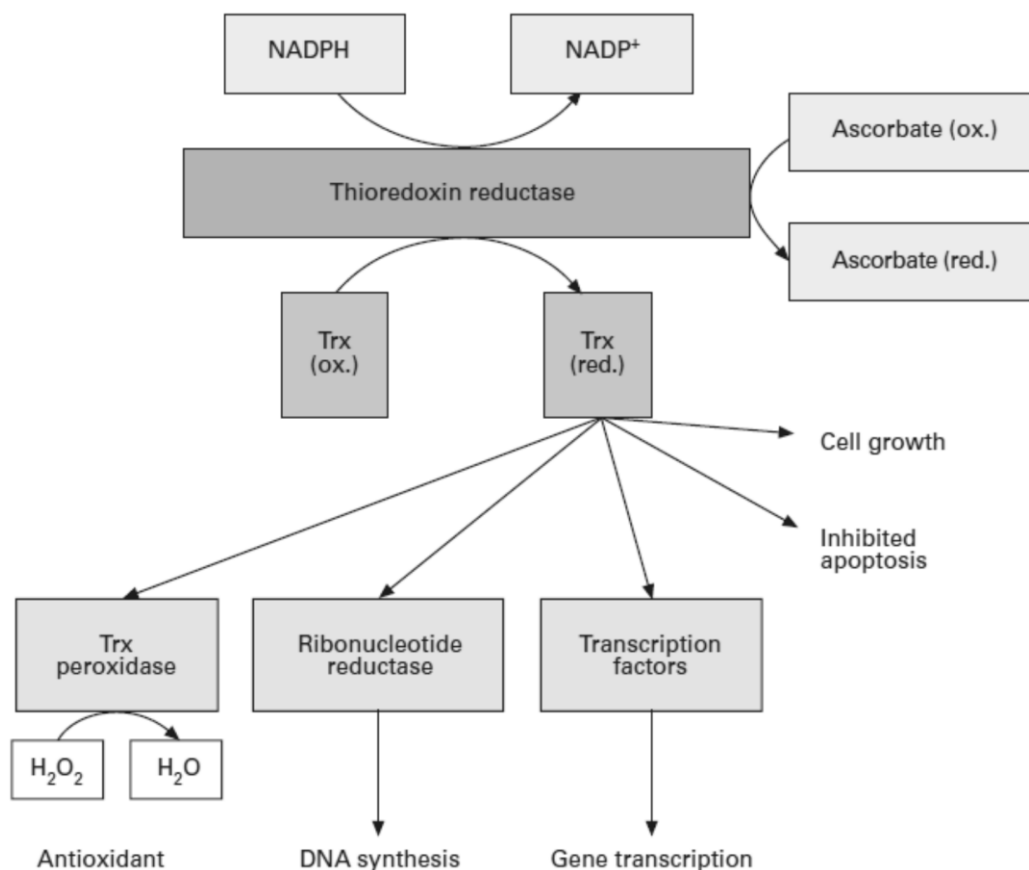


Рис. 1.8. Реакції та функції TrxR в клітині

Авторами [51] описано активність TrxR щодо білка-супресора пухлини та фактора транскрипції p53. Як і в клітинах ссавців, коли дикий тип форми людського гена пухлини-супресора p53 експресуються в дріжджах *Schizosaccharomyces pombe*, то спостерігається пригнічення їх росту [52]. Використовуючи це як модельну систему для скринінгу генів, функція яких необхідна для нормальної діяльності p53, було виявлено мутантний штам дріжджів, що був частково стійким до ефектів експресії p53 з рецесивною мутацією та із високою ідентичністю до TrxR [48].

Підтримання низького рівня активних форм кисню (АФК) є частиною нормального метаболізму O₂ [53, 54]; однак збільшення продукування АФК

або функціональне зниження однієї або декількох захисних систем, що знаходяться в клітині, може призвести до непоправних пошкоджень, тобто окиснення білкових тіолів, що в подальшому може призвести до патологічних процесів, включаючи апоптоз [55, 56]. Показано, що Trx запобігає апоптозу в клітинах, оброблених агентами, які продукують АФК [57, 58]. Вважається, що збільшення експресії генів для TrxR1 та Trx відіграє захисну роль щодо O_2 в легенях ссавців.

Важливим антиоксидантом для захисту клітин від окисного стресу є аскорбінова кислота, яка не синтезується організмом людини. Переробка аскорбату з його окиснених форм (дегідроаскорбінова кислота та вільні радикали аскорбілу) є важливим процесом для підтримки рівня аскорбату *in vivo*. У роботі [46] було показано, що дієта щурів з дефіцитом Se призводить до зниження в печінці рівня аскорбату, глутатіонпероксидази та TrxR, тоді як рівень глутатіону – незмінний. Авторами [59] доведено, що обробка клітин HL-60 бутіонінсульфоксаміном або діетилмалеатом призвела до зменшення клітинного глутатіону приблизно до 10% від показника у контролі, але не вплинула на здатність цих клітин відновлювати дегідроаскорбінову кислоту [47, 60].

Хоча дослідження [40–60] продемонстрували, що активність TrxR може змінюватися під впливом факторів, які пов'язані зі станами хвороби. Найкращі докази того, що TrxR може відігравати роль у захворюваннях людини, надають дослідження раку, СНІДу та аутоімунних захворювань. На основі результатів [61] було висловлено припущення, що рівень TrxR у клітинах пухлини в 10 і більше разів перевищує рівень нормальних тканин [62–67]. Авторами [68, 69] встановлено, що TrxR підвищений при первинній меланомі людини і демонструє кореляцію з інвазивністю. Також повідомлялося [70, 71], що ферментна активність чутлива до вмісту іонів Ca^{2+} [72].

Органічні сполуки золота є інгібіторами очищеного TrxR ссавців і використовуються для лікування деяких аутоімунних захворювань [73, 74]. Введення разової дози ауротіоглюкози мишам призводило до помітного та тривалого пригнічення активності TrxR у всіх досліджених тканинах [75].

Трипанотіон редуктаза

Трипанотіон [76] було виявлено в результаті досліджень африканської трипаносоми *Trypanosoma brucei brucei*. Діалізовані безклітинні екстракти трипаносоми не відновлюють за допомогою NADPH глутатіон дисульфід, якщо екстракт не містить кофактор з низькою молекулярною масою. Авторами [77] доведено, що кофактор містить ферментативно відновну дисульфідну групу і присутній у екстрактах представників *Kinetoplastida*, але відсутній у інших біологічних матеріалах (рис. 1.9).

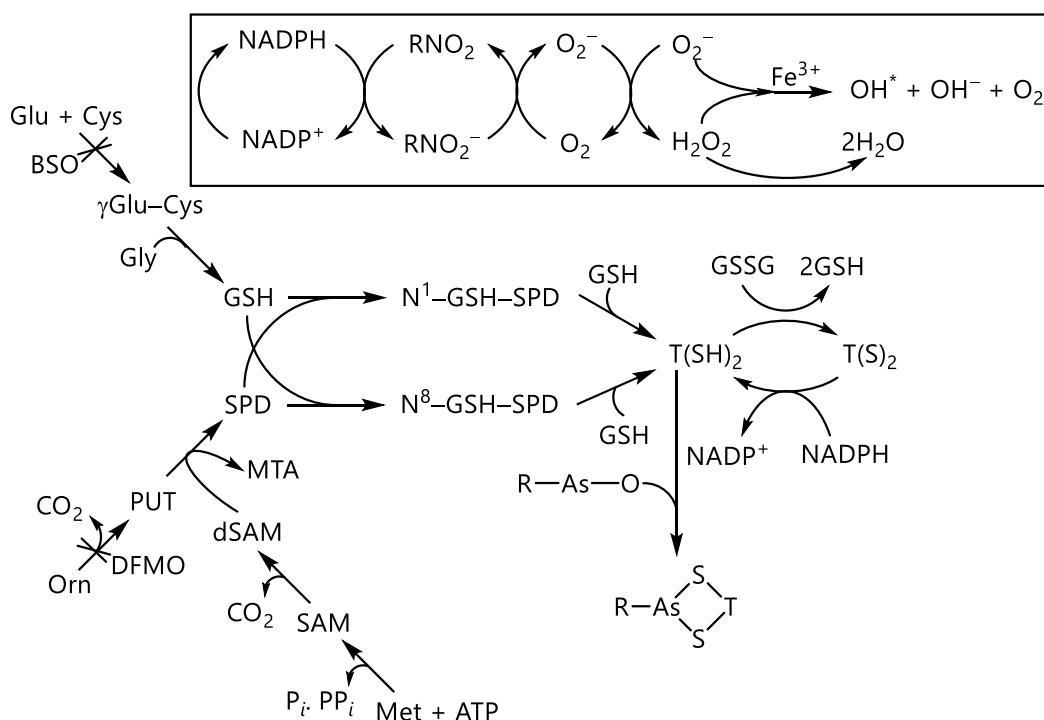


Рис. 1.9. Метаболізм і функції трипанотіону та можливі місця дії трипаноцидних сполук. Вкладення – "цикл окисно-відновного відновлення" нітросполуками (RNO₂) з утворенням H₂O₂ та гідроксильного радикала (OH[•]). Скорочення: BSO – бутіонінсульфоксимін; DFMO – дифторметилорнітин; R-As=O – меларсен оксид; MeT – адукт трипанотіон : меларсен, PUT – путресцин, SPD – спермідин, GSH-SPD – глутатіонілспермідин; SAM – S-аденозилметионін, dSAM – декарбоксильований S-аденозилметионін, MTA - метилтіоаденозин.

На рис. 1.10 показано структуру дисульфїду трипанотіону (T(S)₂) та його двоелектронно-відновлену форму, дигідротрипанотіона (T(SH)₂). При фізіологічних значеннях рН обидві сполуки являють собою цвіттер-іони із

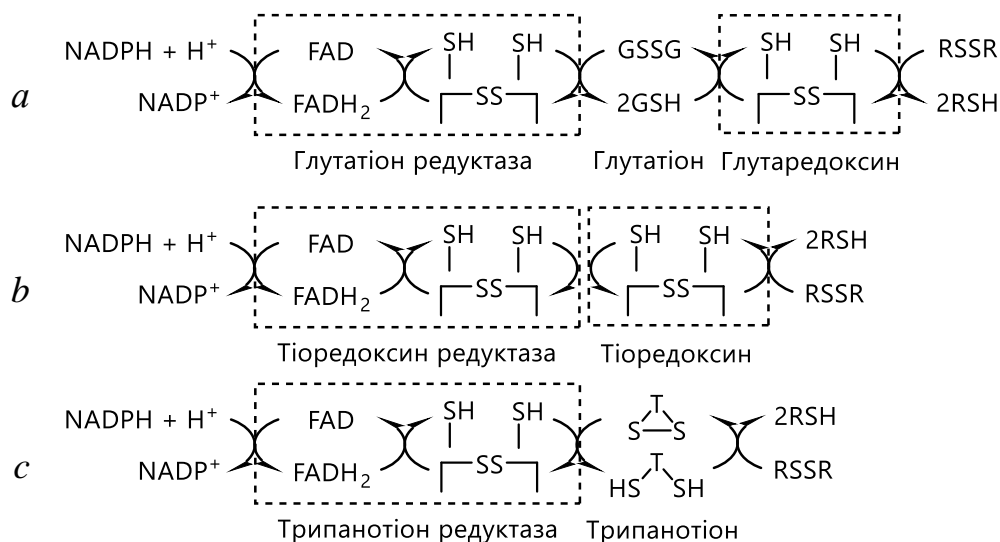


Рис. 1.11. NADPH-залежні системи відновлення дисульфідів: а) глутатіон-редуктаза, глутатіон та глутаредоксин; б) тіоредоксинредуктаза та тіоредоксин; с) трипанотіонредуктаза та трипанотіон. Прямокутниками позначено білки [87].

Численні дослідження [89, 90] показали, що хімічно індуковане окиснення внутрішньоклітинних тіолів згубно впливає на клітинні процеси: вуглеводний обмін, гомеостаз кальцію, полімеризацію тубуліну, мітоз, цілісність мембрани та чутливість до окисників та хімічних пошкоджень тощо [28, 29, 91–95].

Дослідження [96] показали, що GSH відіграє важливу роль у захисті ДНК від пошкоджень радикалами, спричинених іонізуючим випроміненням. Авторами [97] показано, що T[SH]₂ є набагато кращим радіпротектором ДНК ніж GSH або спермідин, імовірно тому, що поліамінна група T[SH]₂ дозволяє більш локальну концентрацію груп SH поблизу ДНК.

Вищі організми містять велику кількість різноманітних глутатіон-S-трансфераз, які каталізують нуклеофільну атаку глутатіону на різноманітні гідрофобні електрофільні ксенобіотики, утворюючи S-кон'юговані продукти, які часто менш токсичні та легше виводяться з організму, ніж вихідні сполуки. Деякі представники цих ферментів можуть брати участь у відновленні окисного пошкодження ДНК та ліпідів мембран [98, 99]. У численних дослідженнях [100–104] виявлено, що глутатіон-S-трансферази стійкі до дії наркотиків, токсичних важких металів, гербіцидів та інсектицидів тощо.

1.2. Механізм дії глутатіонредуктази

1.2.1. GR каталітичний цикл

Загальна схема реакції каталізованої GR має вигляд (рис. 1.12) та описується наступними стадіями:

1. Зв'язування NADPH з окисненим ферментом;
2. Зниження FAD до FADH⁻ аніона NADPH;
3. Знижений FADH⁻ аніон руйнується в комплекс заряду і знижує дисульфід Cys₅₈-Cys₆₃;
4. Окиснений дисульфід глутатіону зв'язується з відновленим ферментом і утворює змішаний дисульфід із Cys₅₈ та вивільняє один відновлений глутатіон;
5. Cys₆₃ атакує змішаний дисульфід на Cys₅₈, щоб вивільнити відновлений глутатіон.

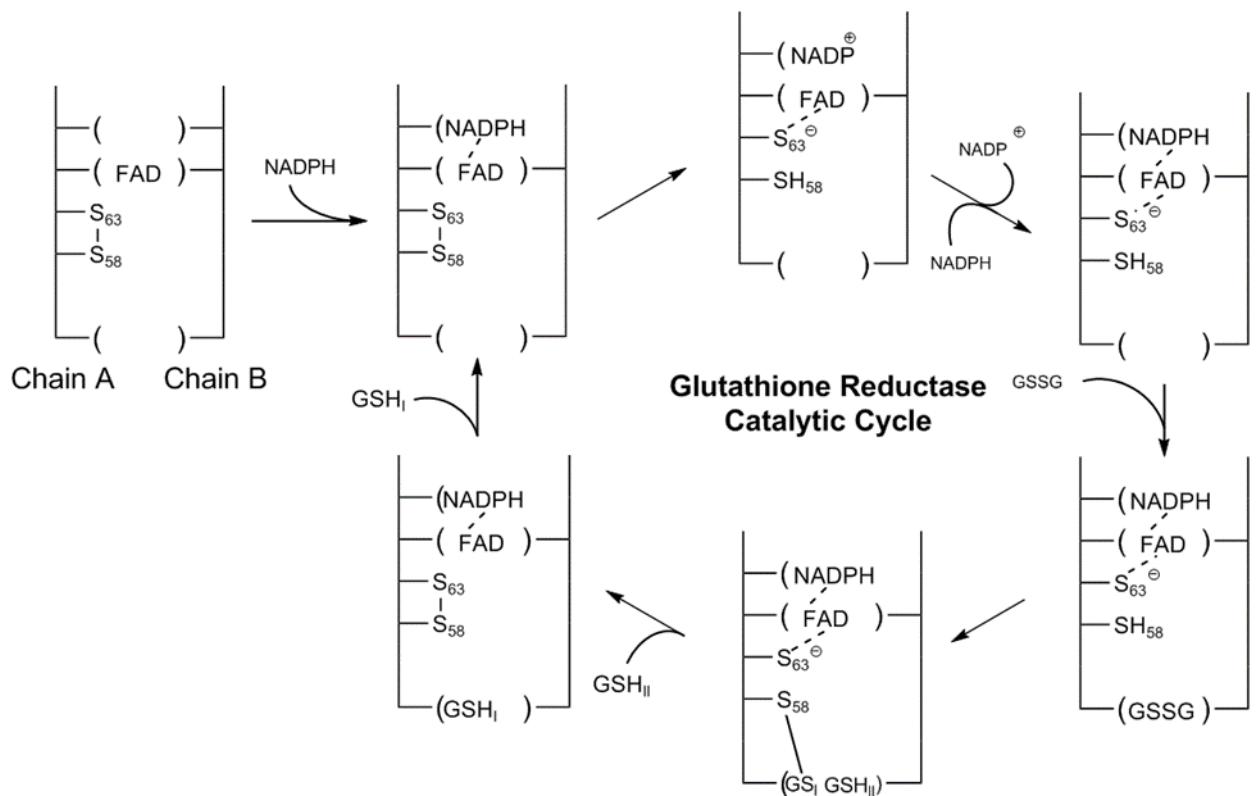


Рис. 1.12. Загальна схема реакції каталізованої GR

Дія GR описується двома напівреакціями: відновна та окисна. У першій реакції NADPH відновлює FAD, який присутній у GSR, для отримання перехідного FADH⁻ аніону. Потім цей аніон швидко розриває дисульфідний

зв'язок Cys₅₈–Cys₆₃, утворюючи короткоживучий комплекс переносу заряду між флавіном і Cys₆₃. Тепер окиснений NADP⁺ дисоціює і згодом замінюється новою молекулою NADPH. Це завершення відновної частини реакції [105, 106].

У окисній частині реакції Cys₆₃ нуклеофільно атакує найближчу сульфідну одиницю в молекулі GSSG (через His₄₆₇), що створює дисульфідний зв'язок (GS–Cys₅₈) та GS⁻ аніон. Окиснений GR (GR_{ox}) містить два залишки цистеїну, які утворюють дисульфідний місток з боку ізоалоксазинового кільця. Дисульфідний зв'язок близький до залишку гістидину, який з'єднаний водневим зв'язком із залишком глутамату (рис. 1.2, *c, d*). Залишок тирозину на зворотній стороні захищає FAD і діє як захисник у NADPH-зв'язуючому центрі [8, 17, 107–111]. Потім His₄₆₇ GSR протоколює GS-аніон, щоб вивільнити першу молекулу GSH. Далі, Cys₆₃ нуклеофільно атакує сульфід Cys₅₈, вивільняючи GS-аніон, який, у свою чергу, приєднує протон розчинника і звільняється від ферменту, створюючи тим самим другий GSH. Отже, для кожного GSSG та NADPH отримують по дві відновлені молекули GSH, які можуть бути антиоксидантами, що відбирають активний кисень у клітині [107, 112–115] (Рис. 1.2).

Враховуючи кінетику багаточисленних стадій, було запропоновано, що одна із протонованих стадій, обмежує швидкість окисної напівреакції і є повільною, у порівнянні з відновною напівреакцією [108, 109, 111, 114, 116].

1.2.2. GSH як відновник дисульфідів і відновник GSSG

Властивості GSH як основного відновника дисульфідів і GSSG та як тіол-модифікуючого агента (рис. 1.13) описано у роботах [117–120]. Показано, що зменшення ненативних і утворення нативних білкових дисульфідних зв'язків у ендоплазматичному ретикулумі залежать від GSH, GSSG і білкових дисульфідних ізомераз (PDI). Продуктом реакції між дисульфідним зв'язком і GSH (або тіолу з GSSG) є глутатіонілована молекули, стабільність якої може змінюватися на кілька порядків (рис. 1.13).

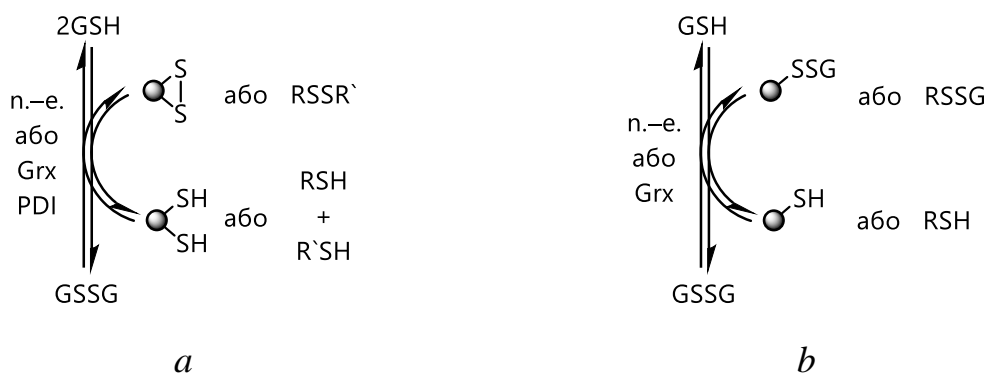


Рис. 1.13. Відновлення або окиснення внутрішньо- або міжмолекулярних дисульфідів або тіолів на 2GSH/GSSG (a). Деглутатіонілювання/глутатіонілювання тіолів за допомогою GSH/GSSG (b).

Зазначена сполука з часом може реагувати з іншою молекулою GSH з утворенням регенованого тіолового продукту і GSSG (рис. 1.13). При цьому тіолдисульфідний обмін відбувається або неферментативно, або ферментативно (за допомогою того ж або іншого ферменту). Як результат GSSG знижує NADPH за допомогою GR або пари TrxR/Trx (рис. 1.6) [117–120].

1.2.3. GSH як відновник для пероксидів

Аналогічно до відновлення дисульфідів GSH також зменшує кількість гідропероксидів (рис. 1.14).

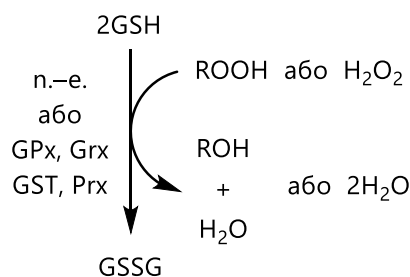


Рис. 1.14. GSH-залежне видалення H₂O₂ та інших гідропероксидів каталізуються різними ферментами, включаючи GPx, Prx, GST та ізоформи Grx

Ці незворотні процеси каталізуються підгрупою глутатіонпероксидаз (GPx) з утворенням GSSG, води і/або спирту [121–123]. Крім того, пероксиредоксини (Prx) можуть використовувати GSH як донор електронів [124–128]. Також, у доповнення до ізоформ GPx і Prx, деякі Grx- і глутатіонтрансферази (GST) можуть самостійно виконувати роль

гідропероксидаз, але константи швидкості цих ферментів, за умови їх визначення, зазвичай значно нижчі, ніж для каталази або канонічних тіол/селенолзалежних гідропероксидаз Prx і GPx [129–133]. Отже, існує велика кількість білків із GSH-залежною гідропероксидазною активністю.

1.2.4. GSH як нуклеофіл

Крім відновлення пероксидів і дисульфідів, домінуючою функцією GST-ізоформ і не пов'язаних з ним MAPEG (мембранозв'язаних білків з протилежними функціями в метаболізмі глутатіону) є каталітичне спряження атома Сульфуру GSH з атомами Карбону, що призводить до утворення великого різномайття електрофільних сполук (рис. 1.15) [134–137]. Ці субстрати не обов'язково повинні мати дисульфідні або пероксидні зв'язки, а реакції кон'югації часто призводять до зменшення токсичності та підвищеної розчинності електрофілів. Речовини, мічені глутатіоном, можуть залучатися у метаболізм і/або виводитися з організму [134, 136].

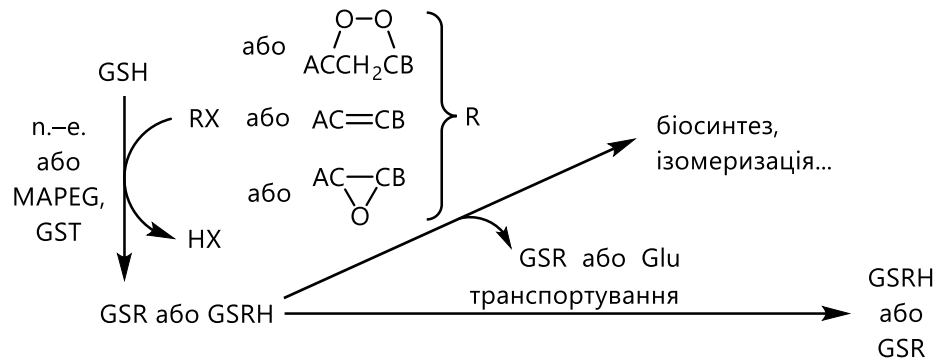


Рис. 1.15. Схема модифікації електрофілів допомогою GST та MAPEG.

1.3. Інгібітори глутатіонредуктази та їх значення у медицині

GSH є ключовим клітинним антиоксидантом і відіграє провідну роль у метаболізмі електрофільних ксенобіотиків. Важливість шляху GSH та ферментів, які впливають на цей баланс, в останні роки набуває все більше уваги. Хоча глутатіонредуктаза є привабливою мішенню для багатьох фармацевтичних препаратів, до цих пір не було створено терапевтичних сполук, пов'язаних з глутатіонредуктазою. Зокрема, GR є перспективною

мішенню для протималарійних препаратів, оскільки GR *Plasmodium falciparum* має значно інший склад білка, ніж у глутатіонредуктази [1]. Створюючи препарати, характерні для *P. falciparum* можливо вибірково викликати окисативний стрес у паразита, не впливаючи при цьому на господаря.

Існує два основні класи сполук, орієнтованих на GR *P. falciparum* [20, 23, 138, 139]:

1. Інгібітори зв'язування або димеризації GSSG: активні електрофіли, такі як сполуки золота та флуорнафтохінони;
2. Препарати, які використовують глутатіонредуктазу для регенерації в окисно-відновних циклах. Наприклад, метиленовий синій та нафтохінон.

Клінічні випробування показали неоднозначні результати щодо лікування малярії нафтохінонами. У клітинах, що зазнають високого рівня окисного стресу, такі як еритроцити, до 10% споживання глюкози може спрямовуватися на пентазофосфатний шлях (ПФШ) для продукування NADPH, необхідного для цієї реакції. У випадку еритроцитів, якщо ПФШ не функціонує, то окисний стрес у клітині призводить до лізису клітин та анемії [140].

Вовчак – аутоімунне порушення, при якому у пацієнтів виробляється підвищена кількість антитіл, що атакують ДНК та інші клітинні компоненти. У дослідженні [141] було виявлено, що один нуклеотидний поліморфізм (SNP) в гені глутатіонредуктази асоціюється з вовчаком. При цьому було показано, що у хворих на вовчак низький рівень глутатіону в Т-клітинах [142]. Автори дослідження вважають, що зниження активності глутатіонредуктази може сприяти збільшенню продукування активного кисню у хворих вовчаком [141].

У мишей глутатіонредуктаза була залучена до окисного сплеску, що є компонентом імунної відповіді [143]. Окисний вибух – це захисний механізм організму для знищення чужорідних клітин. Показано, що нейтрофіли з дефіцитом глутатіонредуктази спричиняють швидкий окисний вибух у

відповідь на дії бактерій, ніж нейтрофіли, які продукують GR на звичайному рівні. Механізм дії глутатіонредуктази, для підтримки окисного вибуху, досі невідомий [143].

Дефіцит глутатіонредуктази – рідкісне порушення, при якому активність GR відсутня у або еритроцитів, або лейкоцитів, або одночасно у еритроцитів та лейкоцитів. У дослідженні [144] описано спостереження цього розладу, який зафіксовано лише у двох випадках на 15000 тестів щодо дефіциту глутатіонредуктази. У цьому ж дослідженні дефіцит GR було пов'язано з катарактою та фавізмом у одного пацієнта і його родиною та з вираженою некон'югованою гіпербілірубінемією у іншого пацієнта [144]. Авторами [145] було встановлено, що окисно-відновна система глутатіону відповідає за захист клітин ока від H_2O_2 , оскільки у них спостерігається недостача каталази, а також, дефіцит глутатіонредуктази спричиняє захворюваності на катаракту.

У деяких пацієнтів спостерігається дефіцит активності глутатіону внаслідок недостатнього надходження рибофлавіну з їжею [146]. Рибофлавін є попередником FAD, відновлена форма якого надає електрони до дисульфідного зв'язку окисненої форми глутатіонредуктази для активації каталітичного циклу ферменту. Дослідження [146] показали, що 17,8% чоловіків та 22,4% жінок страждали від низької активності глутатіонредуктази внаслідок дефіциту рибофлавіну.

При фовізмі – дефекті пентозофосфатного шляху – пацієнтам не вистачає глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, ферменту, який відновлює NADP^+ до NADPH, каталізуючи перетворення глюкозо-6-фосфату в 6-фосфоглюконо- δ -лактон. Хворі з дефіцитом глюкозо-6-фосфатдегідрогенази мають менше NADPH для відновлення окисненого глутатіону. Таким чином, окисненого глутатіону по відношенню до відновленого більше, ніж у пацієнтів, які експресують глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу. Тому хворі на фовізм не в змозі ефективно реагувати на високий рівень активного кисню, що викликає лізис клітин [147].

Активність глутатіонредуктази використовують як показник окисного стресу. Активність можна контролювати за допомогою споживання NADPH з поглинанням при 340 нм або GSH можна якісно встановити реагентом Елмана [148]. Альтернативно активність можна виміряти, використовуючи roGFP (відновно-чутливий зелений флуоресцентний білок) тощо [149].

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Матеріали

Штами *C. albicans* M 885 (ATCC 10231) та клінічний флуконазол-резистентний ізолят *C. krusei* отримано з колекції музею мікробних культур Національної медичної академії післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика. Як позитивний контроль використано препарат "Флуконазол "Дарниця".

Цитизиновімісні 1,3-оксазоли синтезовано у відділі №2 хімії біоактивних азотовмісних гетероциклічних основ Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України ім. В. П. Кухаря, під керівництвом д.х.н., професора В.С. Броварця. Структуру синтезованих сполук доведено за допомогою елементного аналізу, мас-спектроскопії та ^1H ЯМР, ^{13}C ЯМР-спектроскопії.

2.2. QSAR моделювання

Для створення загальнодоступних моделей QSAR та прогнозування протигрибкової активності сполук було використано веб-платформу OCHEM.

2.2.1. Підготовка набору даних.

Дані для нашого аналізу було отримано з декількох публікацій та збережені в базі даних OCHEM [150]. Початковий набір даних з 3173 сполук, активних до штаму *C. albicans*, складався зі сполук різноманітних хімічних класів. Значення мінімальної інгібуючої концентрації (MIC) молекул коливались від 0,00877 до 118000 мкМ. Всі сполуки було розділено на два класи: високоактивні (1460 сполук з $\text{MIC} \leq 50$ мкМ) та низькоактивні (1713 сполуки з $\text{MIC} > 50$ мкМ). Хімічні структури, відповідна протигрибкова активність та літературні джерела всіх даних є у вільному доступі на веб-сайті OCHEM.

2.2.2. Методи машинного навчання.

В роботі було використано чотири методи машинного навчання для створення QSAR моделей: Associative Neural Networks (ASNNs) [151], Graph

Convolution Network (GCN) [152], Extreme Gradient Boosting (XGBoost) [153] and WEKA-RF (Random Forest) [154].

2.2.3. Розрахунок дескрипторів.

Веб-ресурс OCHEM містить безліч програмних пакетів для обчислення великого масиву молекулярних дескрипторів. Нами для дослідження використано пакети CDK 2.0 (Chemistry Development Kit) [155], E-state [156] та AlogPS, [157], які показали себе як найбільш ефективні дескриптори в наших попередніх дослідженнях. AlogPS оцінює ліпофільність та розчинність хімічних сполук, тоді як електротопологічні дескриптори описують їх електронні та топологічні характеристики. Пакет CDK2.0 включає тривимірні дескриптори, що характеризують фізико-хімічні властивості та геометрію молекул, такі як елементний аналіз, заряд, геометрія, стан протонів та інші.

На етапі попередньої обробки нами застосовано некеровану фільтрацію дескрипторів. Перш за все, було видалено із списку дескриптори з менш ніж двома унікальними значеннями або з дисперсією менше 0,01. Далі згруповані дескриптори з попарно непараметричним коефіцієнтом кореляції Пірсона $R > 0,95$. Завершував етап попередньої обробки метод безконтрольного вибору вперед (UFS) [158], який використано для вибору репрезентативного набору дескрипторів для розробки моделі QSAR.

2.2.4. Перевірка моделей.

Нами використано п'ятикратну перехресну перевірку (CV) із варіативним вибором на кожному етапі та зовнішню перевірку для оцінки якості моделей [159]. Перш за все початковий набір із 2782 сполук було випадково розділено на навчальний (2086 сполук) та тестовий (696 сполук) набори. Набір даних 2086 сполук було розділено на 5 підмножин приблизно однакового розміру. Із 5-ти підмножин одна була збережена для перевірки, тоді як решта використана як навчальний набір. Для кожного навчального набору нами застосовано фільтрацію UFS, розроблено модель, з подальшим її застосуванням для

прогнозування молекул з тестового набору. Далі було обчислено статистичні коефіцієнти для комбінованих п'яти наборів перевірки. Ефективність прогнозування остаточної моделі, розробленої із сполуками 2086, також була перевірена за допомогою тестового набору із 696 сполук.

2.3. Хімічний синтез 4-ціано- та 4-трифенілфосфорильованих похідних 5-(8-оксо-1,5,6,8-тетрагідро-2H-1,5-метанопіридо[1,2-а][1,5]діазоцин-3(4H)-іл)-1,3-оксазолу.

Спектри ЯМР ^1H одержано на Varian VXR-300 або Varian Mercury 400 (внутрішній еталон – TMS) у $\text{DMSO-}d_6$. Спектр ЯМР ^{31}P для сполуки **7** встановлено на Bruker AVANCE DRX-500 (85% фосфорної кислоти як зовнішній еталон) в $\text{DMSO-}d_6$. ІЧ-спектри реєстрували на спектрометрі Vertex 70 (KBr). Спектри GC-MS реєстрували в системі LC-MS-HPLC Agilent 1100 Series, обладнаної діодним детектором ґратки Agilent LC\MSD SL. Параметри GC-MS аналізу: колонка Zorbax SB-C18 (1,8 мкм, 4,6-15 мм, PN 821975-932), суміш: розчинник вода-ацетонітрил (95:5), 0,1% водної трифтороцтової кислоти; потік елюентів 3 мл/хв; об'єм введення 1 мкл. Елементний аналіз проведено в Аналітичній лабораторії Інституту біоорганічної та нафтохімії імені В.П. Кухара НАН України ручними методами. Температури плавлення визначено на приладі Фішера–Джонса. Реакції та чистоту продуктів контролювали за допомогою тонкошарової хроматографії на пластинках Silufol UV-254, в якості елюенту використано хлороформ-метанол у співвідношенні 9:1 (об. ч.). Усі реагенти та розчинники придбано в “Sigma-Aldrich”. Хлориди 1-ациламіно-2,2-дихлоретеніл(трифеніл)фосфонію **A** було синтезовано згідно [160], а 1-ациламіно-2,2-дихлороакрилонітрили **C** – згідно [161].

2.3.1. Синтез 5-цитизиніл-1,3-оксазол-4-іл(трифеніл)фосфоній перхлоратів 1-7.

3.1 мл (0.022 моль) Триетиламіну та 2.1 г (0.011 моль) цитизину були додані до розчину 0.01 моль фосфонієвої солі **A** в 40 мл метанолу. Суміш

перемішували при 30–40°C протягом 5 год, а потім додавали 10 мл насиченого водного розчину перхлорату натрію. Утворений осад відфільтровували і перекристалізували з метанолу.

(5-(8-Оксо-1,5,6,8-тетрагідро-2H-1,5-метанопіридо[1,2-а][1,5]діазоцин-3(4H)-yl)-2-феніл-1,3-оксазол-4-іл)трифенілфосфоній перхлорат (1) одержано згідно [162]. Вихід: 87%, безбарвні кристали, $T_{пл}$ 168–171 °С. ЯМР 1H (300 МГц, DMSO- d_6): δ , м.д. = 7.96–7.91 м (3H, $CH_{аром}$), 7.82–7.70 м (14H, $CH_{аром}$), 7.48–7.36 м (4H, $CH_{аром}$), 6.15 д (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 9.0$ Гц), 6.05 д (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 6.9$ Гц), 4.11 д (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 15.3$ Гц), 3.63–3.59 м (2H, $CH_{цитизин}$), 3.24 д (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 13.1$ Гц), 2.98 (1H, $CH_{цитизин}$), 2.85 д (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 13.3$ Гц), 2.61 д (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 12.0$ Гц), 2.31 шс (1H, $CH_{цитизин}$), 1.91-1.76 м (2H, $CH_{цитизин}$). LCMS: $[M - M(ClO_4)]^+$: 596.0. Аналіз $C_{38}H_{33}ClN_3O_6P$ розраховано для (694.13): С, 65.75; Н, 4.79; Cl, 5.11; N, 6.05; P, 4.46. Знайдено: С, 65.75; Н, 4.69; Cl, 5.15; N, 6.25; P, 4.50.

(2-(4-Метоксифеніл)-5-(8-оксо-1,5,6,8-тетрагідро-2H-1,5-метанопіридо[1,2-а][1,5]діазоцин-3(4H)-іл)-1,3-оксазол-4-іл)трифенілфосфоній перхлорат (2) одержано аналогічно сполуці 1. Вихід: 93%, безбарвні кристали, $T_{пл} = 205$ – 208 °С. ЯМР 1H (300 МГц, DMSO- d_6): δ , м.д. = 7.96–7.91 м (3H, $CH_{аром}$), 7.81–7.64 м (14H, $CH_{аром}$), 7.41 дд (2H, $CH_{аром}$, $J = 9.0$ Гц, $J = 6.6$ Гц), 7.00 д (2H, $CH_{аром}$, $J = 9.0$ Гц), 6.15 д (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 9.0$ Гц), 6.07 д (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 6.6$ Гц), 4.14 д (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 15.6$ Гц), 3.82 с (3H, OCH_3), 3.65–3.58 м (2H, $CH_{цитизин}$), 3.17 д (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 12.6$ Гц), 2.97 шс (1H, $CH_{цитизин}$), 2.81 д (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 13.2$ Гц), 2.55 д (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 11.7$ Гц), 2.30 шс (1H, $CH_{цитизин}$), 1.81 дд (2H, $CH_{цитизин}$, $J = 33.0$ Гц, $J = 13.2$ Гц). LCMS: $[M - M(ClO_4)]^+$: 626.0. Аналіз. $C_{39}H_{35}ClN_3O_7P$ розраховано для (724.16): С, 64.69; Н, 4.87; Cl, 4.90; N, 5.80; P, 4.28. Знайдено: С, 64.73; Н, 4.81; Cl, 5.02; N, 5.83; P, 4.35.

(2-(4-Хлорофеніл)-5-(8-оксо-1,5,6,8-тетрагідро-2H-1,5-метанопіридо[1,2-а][1,5]діазоцин-3(4H)-іл)-1,3-оксазол-4-іл)трифенілфосфоній перхлорат (3) одержано аналогічно сполуці 1. Вихід: 90%, безбарвні кристали, $T_{пл} = 193$ – 195 °С. ЯМР 1H (300 МГц, DMSO- d_6): δ , м.д. = 7.96–7.91 м (3H, $CH_{аром}$), 7.82–

7.70 м (14H, CH_{аром}), 7.50 д (2H, CH_{аром}, $J = 8.7$ Гц), 7.39 дд (1H, CH_{цитизин}, $J = 9.0$ Гц, $J = 6.9$ Гц), 6.13 д (1H, CH_{цитизин}, $J = 8.4$ Гц), 6.05 д (1H, CH_{цитизин}, $J = 6.9$ Гц), 4.14 д (1H, CH_{цитизин}, $J = 15.6$ Гц), 3.64–3.56 м (2H, CH_{цитизин}), 3.23 д (1H, CH_{цитизин}, $J = 13.5$ Гц), 2.98 шс (1H, CH_{цитизин}), 2.85 д (1H, CH_{цитизин}, $J = 12.6$ Гц), 2.61 д (1H, CH_{цитизин}, $J = 11.7$ Гц), 2.31 шс (1H, CH_{цитизин}), 1.83 дд (2H, CH_{цитизин}, $J = 27.9$ Гц, $J = 12.6$ Гц). LCMS: [M – M(ClO₄)]⁺: 630.0. Аналіз. C₃₈H₃₂Cl₂N₃O₆P розраховано для (728.57): C, 62.65; H, 4.43; Cl, 9.73; N, 5.77; P, 4.25. Знайдено: C, 62.75; H, 4.47; Cl, 9.84; N, 5.70; P, 4.29.

(2-(4-Флуорофеніл)-5-(8-оксо-1,5,6,8-тетрагідро-2H-1,5-метанопіридо [1,2-а][1,5]діазоцин-3(4H)-іл)-1,3-оксазол-4-іл)трифенілфосфоній перхлорат (4) одержано аналогічно сполуці **1**. Вихід: 85%, безбарвні кристали, $T_{пл} = 210 - 212$ °С. ЯМР ¹H (300 МГц, DMSO-d₆): $\delta = 7.96-7.91$ м (3H, CH_{аром}), 7.82–7.70 м (14H, CH_{аром}), 7.40 дд (1H, CH_{цитизин}, $J = 9.0$ Гц, $J = 6.9$ Гц), 7.28 т (2H, CH_{аром}, $J = 9.0$ Гц), 6.14 д (1H, CH_{цитизин}, $J = 9.9$ Гц), 6.06 д (1H, CH_{цитизин}, $J = 6.9$ Гц), 4.15 д (1H, CH_{цитизин}, $J = 15.9$ Гц), 3.64–3.57 м (2H, CH_{цитизин}), 3.19 шс (1H, CH_{цитизин}), 2.98 шс (1H, CH_{цитизин}), 2.86 д (1H, CH_{цитизин}, $J = 12.3$ Гц), 2.58 д (1H, CH_{цитизин}, $J = 11.7$ Гц), 2.31 с (1H, CH_{цитизин}), 1.83 дд (2H, CH_{цитизин}, $J = 28.7$ Гц, $J = 12.6$ Гц). LCMS: [M – M(ClO₄)]⁺: 614.2. Аналіз. C₃₈H₃₂ClFN₃O₆P розраховано для (712.12): C, 64.09; H, 4.53; Cl, 4.98; N, 5.90; P, 4.35. Знайдено: C, 64.02; H, 4.47; Cl, 5.00; N, 5.93; P, 4.40.

(2-(4-Бромфеніл)-5-(8-оксо-1,5,6,8-тетрагідро-2H-1,5-метанопіридо [1,2-а][1,5]діазоцин-3(4H)-іл)-1,3-оксазол-4-іл)трифенілфосфоній перхлорат (5) одержано аналогічно сполуці **1**. Вихід: 88%, безбарвні кристали, $T_{пл} = 187-189$ °С. ЯМР ¹H (300 МГц, DMSO-d₆): δ , м.д. = 7.96–7.91 м (3H, CH_{аром}), 7.82–7.70 м (12H, CH_{аром}), 7.65 с (4H, CH_{аром}), 7.39 дд (1H, CH_{аром}, $J = 9.2$ Гц, $J = 6.9$ Гц), 6.14 д (1H, CH_{цитизин}, $J = 9.0$ Гц), 6.06 д (1H, CH_{цитизин}, $J = 5.7$ Гц), 4.13 д (1H, CH_{цитизин}, $J = 15.6$ Гц), 3.65–3.56 м (2H, CH_{цитизин}), 3.21 с (1H, CH_{цитизин}), 2.98 с (1H, CH_{цитизин}), 2.86 д (1H, CH_{цитизин}, $J = 12.9$ Гц), 2.60 д (1H, CH_{цитизин}, $J = 11.4$ Гц), 2.31 шс (1H, CH_{цитизин}), 1.90-1.76 м (2H, CH_{цитизин}). LCMS: [M – M(ClO₄)]⁺:

675.0. Аналіз. $C_{38}H_{32}BrClN_3O_6P$ розраховано для (773.03): C, 59.04; H, 4.17; Cl, 4.59; N, 5.44; P, 4.10. Знайдено: C, 59.10; H, 4.32; Cl, 4.60; N, 5.37; P, 4.18.

(2-(4-Метилфеніл)-5-(8-оксо-1,5,6,8-тетрагідро-2H-1,5-метанопіридо [1,2-а][1,5]діазоцин-3(4H)-іл)-1,3-оксазол-4-іл)трифенілфосфоній перхлорат (6) одержано аналогічно сполуці **1**. Вихід: 94%, безбарвні кристали, $T_{пл} = 177 - 179$ °C. ЯМР 1H (300 МГц, DMSO- d_6): δ м.д. = 7.95–7.91 м (3H, $CH_{аром}$), 7.82–7.69 м (12H, $CH_{аром}$), 7.61 д (2H, $CH_{аром}$, $J = 8.1$ Гц), 7.38 дд (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 9.0$ Гц, $J = 6.9$ Гц), 7.26 д (2H, $CH_{аром}$, $J = 8.1$ Гц), 6.13 д (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 9.3$ Гц), 6.06 д (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 6.3$ Гц), 4.11 д (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 15.6$ Гц), 3.64–3.57 м (2H, $CH_{цитизин}$), 3.15 с (1H, $CH_{цитизин}$), 2.97 шс (1H, $CH_{цитизин}$), 2.83 д (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 12.6$ Гц), 2.58 д (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 12.6$ Гц), 2.38 с (3H, CH_3), 2.30 шс (1H, $CH_{цитизин}$), 1.90-1.75 м (1H, $CH_{цитизин}$). LCMS: $[M - M(ClO_4)]^+$: 610.0. Аналіз. $C_{39}H_{35}ClN_3O_6P$ розраховано для (708.16): C, 66.15; H, 4.98; Cl, 5.01; N, 5.93; P, 4.37. Знайдено: C, 66.19; H, 5.00; Cl, 5.00; N, 5.85; P, 4.40.

(2-(2,4-Дихлорофеніл)-5-(8-оксо-1,5,6,8-тетрагідро-2H-1,5-метанопіридо [1,2-а][1,5]діазоцин-3(4H)-іл)-1,3-оксазол-4-іл)трифенілфосфоній перхлорат (7) одержано аналогічно сполуці **1**. Вихід: 63%, безбарвні кристали, $T_{пл} = 222 - 225$ °C. ІЧ (KBr): $\nu = 3064, 1657, 1612, 1586, 1547, 1436, 1090, 1025, 723, 693, 621, 521$ cm^{-1} . ЯМР ^{31}P (202 МГц, DMSO- d_6): $\delta = 13.11$ с (1P, PPh_3). ЯМР 1H (300 МГц, DMSO- d_6): $\delta = 7.93-7.91$ м (3H, $CH_{аром}$), 7.83-7.39 м (16H, $CH_{аром}$), 6.22 д (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 9.0$ Гц), 6.05 д (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 6.9$ Гц), 4.06 д (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 15.9$ Гц), 3.65-3.58 м (2H, $CH_{цитизин}$), 3.24 д (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 6.0$ Гц), 2.99-2.90 м (2H, $CH_{цитизин}$), 2.64 д (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 12.6$ Гц), 2.33 шс (1H, $CH_{цитизин}$), 1.89-1.76 м (2H, $CH_{цитизин}$). LCMS: $[M - M(ClO_4)]^+$: 664.2. Аналіз. $C_{38}H_{31}Cl_3N_3O_6P$ розраховано для (763.02): C, 59.82; H, 4.10; Cl, 13.94; N, 5.51; P, 4.06. Знайдено: C, 59.90; H, 4.02; Cl, 13.98; N, 5.44; P, 4.26.

2.3.2. Синтез 5-цитизиніл-1,3-оксазол-4-карбонітрилів 8-11.

3,5 мл (0,025 моль) Триетиламіну та 2,28 г (0,012 моль) цитизину додавали до розчину 0,01 моль 1-ациламіно-2,2-дихлороакрилонітрилу **С** в 50 мл ТГФ.

Суміш перемішували при 20-25 °С протягом 12 годин. Осад триетиламіну гідрохлориду відфільтровували. Розчинник видаляли у вакуумі, а залишок обробляли водою. Утворений осад відфільтровували і перекристалізували з етанолу.

2-(1-Нафтил)-5-(8-оксо-1,5,6,8-тетрагідро-2H-1,5-метанопіридо[1,2-а][1,5]діазоцин-3(4H)-іл)-1,3-оксазол-4-карбонітрил (8) одержано згідно [162]. Вихід: 89%, безбарвні кристали, $T_{пл} = 223-225$ °С. ЯМР 1H (400 МГц, DMSO- d_6): $\delta = 9.01$ д (1H, $CH_{аром}$, $J = 8.4$ Гц), 8.07 д (1H, $CH_{аром}$, $J = 8.0$ Гц), 8.02 т (2H, $CH_{аром}$, $J = 6.8$ Гц), 7.67 т (1H, $CH_{аром}$, $J = 8.0$ Гц), 7.60 т (2H, $CH_{аром}$, $J = 8.0$ Гц), 7.35 дд (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 9.0$ Гц, $J = 7.2$ Гц), 6.30 д (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 6.4$ Гц), 6.17 дд (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 9.0$ Гц, $J = 0.8$ Гц), 4.21 д (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 12.8$ Гц), 4.12 д (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 15.6$ Гц), 4.00 д (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 12.8$ Гц), 3.77 дд (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 16.0$ Гц, $J = 6.0$ Гц), 3.64 дд (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 12.4$ Гц, $J = 2.0$ Гц), 3.57 д (1H, $CH_{цитизин}$, $J = 12.8$ Гц), 3.35 шс (1H, $CH_{цитизин}$), 2.65 шс (1H, $CH_{цитизин}$), 2.08–2.01 м (2H, $CH_{цитизин}$). LCMS: $[M]^+$: 409.0. Аналіз. $C_{24}H_{22}N_4O_2$. Розраховано для (409.27): С, 73.51; Н, 4.94; N, 13.72. Знайдено: С, 73.49; Н, 4.91; N, 13.67.

2-(2-Флуорофеніл)-5-(8-оксо-1,5,6,8-тетрагідро-2H-1,5-метанопіридо[1,2-а][1,5]діазоцин-3(4H)-іл)-1,3-оксазол-4-карбонітрил (9) одержано аналогічно сполуці **8**. Вихід: 88%, безбарвні кристали, $T_{пл} = 178-180$ °С. ІЧ (KBr): $\nu = 3035, 2231, 1651, 1612, 1574, 1541, 1492, 1452, 1209, 1139, 807, 781$ cm^{-1} . ЯМР 1H (400 МГц, DMSO- d_6): $\delta = 7.80-7.79$ м (1H, $CH_{цитизин}$), 7.51 с (1H, $CH_{аром}$), 7.39-7.26 м (3H, $CH_{аром}$), 6.28-6.27 м (1H, $CH_{cytisine}$), 6.20-6.17 м (1H, $CH_{cytisine}$), 4.17-4.03 м (2H, $CH_{цитизин}$), 3.98-3.96 м (1H, $CH_{цитизин}$), 3.86-3.80 м (1H, $CH_{цитизин}$), 3.65-3.57 м (2H, $CH_{цитизин}$), 3.33 с (1H, $CH_{цитизин}$), 2.69 с (1H, $CH_{цитизин}$), 2.10-1.91 м (2H, $CH_{цитизин}$). LCMS: $[M]^+$: 377.0. Аналіз. $C_{21}H_{17}FN_4O_2$ розраховано для (376.39): С, 67.01; Н, 4.55; F, 5.05; N, 14.89. Знайдено: С, 67.11; Н, 4.49; F, 5.01; N, 14.83.

2-Ізопропіл-5-(8-оксо-1,5,6,8-тетрагідро-2H-1,5-метанопіридо[1,2-а][1,5]діазоцин-3(4H)-іл)-1,3-оксазол-4-карбонітрил (10) одержано аналогічно сполуці **8**. Вихід: 62%, безбарвні кристали, $T_{пл} = 71-73$ °С. ІЧ (KBr): $\nu = 2207,$

1649, 1628, 1580, 1542, 1449, 1137, 798 cm⁻¹. ЯМР ¹H (300 МГц, DMSO-d₆): δ = 7.32 t (1H, CH_{цитизин}, J = 7.65 Гц), 6.25-6.10 м (2H, CH_{цитизин}), 3.97-3.64 м (3H, CH_{цитизин}), 3.50-3.46 м (1H, CH_{цитизин}), 3.32-3.23 м (2H, CH_{цитизин}), 2.47-2.41 м (2H, CH_{цитизин}), 2.01-1.93 м (2H, CH_{цитизин}), 1.17-1.07 м (6H, 2CH₃). LCMS: [M]⁺: 325.0. Аналіз. C₁₈H₂₀N₄O₂. Розраховано для (324.39): C, 66.65; H, 6.21; N, 17.27. Знайдено: C, 66.55; H, 6.11; N, 17.23.

2-Метил-5-(8-оксо-1,5,6,8-тетрагідро-2H-1,5-метанопіридо[1,2-a][1,5]діазоцин-3(4H)-іл)-1,3-оксазол-4-карбонітрил (**11**) одержано аналогічно сполуці **8**. Вихід: 77%, безбарвні кристали, T_{пл} = 118 – 121 °С. ЯМР ¹H (300 МГц, DMSO-d₆): δ = 7.31 дд (1H, CH_{аром}, J = 8.9 Гц, J = 6.9 Гц), 6.21–6.17 м (2H, CH_{аром}), 4.00-3.89 м (2H, CH_{цитизин}), 3.78–3.70 м (2H, CH_{цитизин}), 3.48-3.38 м (2H, CH_{цитизин}), 3.25 с (1H, CH_{цитизин}), 2.61 шс (1H, CH_{цитизин}), 2.20 с (3H, CH₃), 2.05–1.90 м (2H, CH_{цитизин}). LCMS: [M]⁺: 297.2. Аналіз. C₁₆H₁₆N₄O₂. Розраховано для (296.33): C, 64.85; H, 5.44; N, 18.91. Знайдено: C, 64.95; H, 5.51; N, 18.89.

2.4. Біологічні дослідження цитизиновмісних 1, 3-оксазолів як інгібіторів глутатіонредуктази *C. albicans*

Антикандидозну активність досліджуваних сполук оцінено диско-дифузійним методом [163] на поживному середовищі Сабуро (рН 6,0-6,8). Штами *C. albicans* М 885 (АТСС 10231) та клінічний стійкий до флуконазолу ізолят штаму *C. krusei* були отримані з колекції музею мікробних культур Національної медичної академії післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика. Як еталон для контролю оптичної густини суспензії грибової культури використано стандарт 0,5 McFarland. Інокулят використано в концентрації 1 • 10⁵ КУО/мл (колонієутворюючі одиниці). Усі нерозчинні у воді сполуки розчиняли в 0,1% водному розчині диметилсульфоксиду (ДМСО) та досліджували при концентрації 0,05 мкМ. Інокульовані чашки Петрі інкубували в аеробних умовах при 37°С протягом 24 годин. Протигрибкову активність досліджуваних сполук встановлено за діаметрами зон інгібування росту грибів навколо стандартних дисків з досліджуваними сполуками (у мм).

2.5. Гомологічне моделювання глутатіонредуктази *C. albicans*

У роботі використано амінокислотні послідовності глутатіонредуктази *C. albicans* (штам SC5314 / ATCC MYA-2876) (UniProt: Q59NQ5) [164] та тіоредоксин глутатіонредуктаза *Schistosoma mansoni* (UniProt: Q962Y6 [165]. Порівняння амінокислотних послідовностей ферментів проведено за допомогою веб-серверу NCBI BLAST [166] із застосуванням матриці BLOSUM-62.

Гомологічне моделювання амінокислотної послідовності глутатіонредуктази *C. albicans* здійснено ресурсами веб-серверу SWISSMODEL [167]. Спочатку проведено попередній пошук еволюційно пов'язаних послідовностей за допомогою бібліотеки шаблонів SWISS-MODEL. Пошук та аналіз структур гомологічних до глутатіонредуктази *C. albicans* здійснено за допомогою методів BLAST [168] та HHblits [169]. Шаблони для побудови гомологічної моделі відібрано на основі загального рейтингу створених шаблонів. Перевірка якості гомологічної моделі глутатіонредуктази *C. albicans* проведено за допомогою внутрішніх методів перевірки веб-серверу SWISSMODEL [170] та онлайн-ресурсів ERRAT та PROCHECK. Програма ERRAT [171] аналізує статистику незв'язаних взаємодій між різними типами атомів та відображає значення функції помилки в порівнянні з положенням 9-залишкового ковзаючого вікна, обчислене шляхом порівняння зі статистикою високоточних структур. Програма PROCHECK використана для стереохімічної перевірки якості структури білку шляхом аналізу геометрії залишків за залишками та загальної геометрії структури [172].

2.6. Молекулярний докінг

Для молекулярного докінгу використано створену та перевірену гомологічну модель глутатіонредуктази *C. albicans*. Для підготовки докінг-сумісних структур білку та лігандів, а також “grid box” використано програму AutoDock Tools (ADT) (ver.1.5.6) [173]. Структуру А-субодиниці глутатіонредуктази відокремлено та збережено у вигляді pdb-файлу за допомогою програми Accelrys DS (версія 4.0) [174]. До всіх атомів білку

додавали атоми Гідрогену за допомогою ADT, після цього всі атоми білку були перенумеровані, включаючи нові атоми Гідрогену. Часткові заряди атомів білку були розраховані та додані методом Gasteiger, а таким чином підготовлену структуру білку було збережено у форматі PDBQT.

Структури та конформації досліджуваних лігандів створено програмою ChemAxon Marvin Sketch 5.3.735 [175] та збережено у форматі Mol2. Оптимізацію лігандів та мінімізацію енергії здійснено програмою Avogadro v1.1.1 [176], використовуючи "Auto Optimization Tool" (силове поле MMFF94s) [177]. Часткові заряди та торсіонні кути лігандів змінено програмою ADT та збережені у форматі PDBQT.

Підготовлену структуру білку та оптимізовані ліганди використано для проведення молекулярного докінгу програмою AutoDock Vina 1.1.2 [178]. Для підготовки карти "grid map" і створення боксу "grid box" використано підпрограму AutoGrid. Навколо центрів докінгу формували ґратку "grid" розміром 30*30*30 точок з кроком "grid spacing" в 1Å. Для візуалізації та вивчення ліганд-білкових взаємодій використано пакет програмного забезпечення Accelrys DS 4.0. Молекулярний докінг одного ліганду в активний центр відбувався близько 5 хвилин. Всі процедури виконано на комп'ютері під керуванням ОС Windows 10 v.1809 з процесором AMD Ryzen-7 2700X (3,70 ГГц) та 8 Гб оперативної пам'яті.

РОЗДІЛ III. ДОСЛІДЖЕННЯ ПОТЕНЦІЙНИХ ІНГІБІТОРІВ

ГЛУТАТІОНРЕДУКТАЗИ *C. albicans*

3.1. Створення QSAR моделей

Оскільки дані були зібрані з різних джерел, нами прийнято рішення розробити класифікаційні моделі, які мінімізують їх варіацію через різницю в лабораторних протоколах, що використовуються в різних дослідженнях. Класифікаційні моделі побудовані згідно протоколу, описаному в розділі 2.1. Результати узагальнені в табл. 3.1, а характеристики окремих моделей показані на рис. 3.1–3.5.

Таблиця 3.1.

Статистичні коефіцієнти розраховані для класифікаційних моделей.

№	Методи	Specificity (%)		Sensitivity (%)		Balanced Accuracy (%)	
		Training	Test	Training	Test	Training	Test
1	ASNN	80	84	80	84	79.7± 0.9	84.0 ± 1.0
2	WEKA-RF	85	86	78	80	79.5± 0.8	82.0 ± 1.0
3	GNN	78	84	81	78	79.6± 0.8	80.0 ± 1.0
4	XGBOOST	81	81	81	83	80.7± 0.8	82.0 ± 1.0
5	Consensus	84	86	80	82	80.6± 0.8	83.0 ± 1.0

*Навчальний та тестовий набори включали в себе 2086 та 696 молекул відповідно. Результати перехресної перевірки повідомляються для навчального набору. Консенсусна модель була побудована шляхом усереднення результатів усіх окремих моделей.

Model name: M1_AntimycoticActivity_ASNN_[ALogPS, CDK2, EState]-339224 [rename] , published in 1,3-oxazole derivatives of cytosine as potential inhibitors of glutathione reductase of *Candida* spp.: QSAR modeling, docking analysis and experimental study of new anti-*Candida* agents
Public ID is 797

Predicted property: **AntimycoticActivity** modeled in CLASS

Training method: ASNN

Data Set	#	Accuracy	Balanced Accuracy	MCC	AUC
Training set: Data_CAlbicans_Set_2 (training)	2300 records	80.1% ± 0.8	79.7% ± 0.8	0.6 ± 0.02	0.863 ± 0.008
Test set: Data_CAlbicans_Set_2 (test) [x]	765 records	84% ± 1.0	84% ± 1.0	0.68 ± 0.03	0.88 ± 0.01

Show ROC curves

Real\Predicted→	high	low	Hit rate
high	780	260	0.75
low	197	1063	0.84
Precision	0.8	0.8	
Training (Original)			

Real\Predicted→	high	low	Hit rate
high	286	69	0.81
low	53	357	0.87
Precision	0.84	0.84	
Test (Original)			

Рис.3.1. Статистичні коефіцієнти розраховані для класифікаційних моделей ASNN.

Model name: M2_AntimycoticActivity_WEKA-RF_[ALogPS, CDK2, EState]-339230 [rename] , published in 1,3-oxazole derivatives of cytosine as potential inhibitors of glutathione reductase of *Candida* spp.: QSAR modeling, docking analysis and experimental study of new anti-*Candida* agents
Public ID is 798

Predicted property: **AntimycoticActivity** modeled in CLASS

Training method: WEKA-RF

Data Set	#	Accuracy	Balanced Accuracy	MCC	AUC
Training set: Data_CAlbicans_Set_2 (training)	2300 records	80.5% ± 0.8	79.5% ± 0.8	0.61 ± 0.02	0.795 ± 0.008
Test set: Data_CAlbicans_Set_2 (test) [x]	765 records	82% ± 1.0	82% ± 1.0	0.65 ± 0.03	0.82 ± 0.01

Show ROC curves

Real\Predicted→	high	low	Hit rate
high	720	320	0.69
low	128	1132	0.898
Precision	0.85	0.78	
Training (Original)			

Real\Predicted→	high	low	Hit rate
high	266	89	0.75
low	45	365	0.89
Precision	0.86	0.8	
Test (Original)			

Рис.3.2. Статистичні коефіцієнти розраховані для класифікаційних моделей WEKA-RF.

Model name: M3_AntimycoticActivity_DC:GRAPH_CONV_1/1 - 342293 [rename] , published in 1,3-oxazole derivatives of cytosine as potential inhibitors of glutathione reductase of Candida spp.: QSAR modeling, docking analysis and experimental study of new anti-Candida agents
Public ID is 802

Predicted property: **AntimycoticActivity** modeled in CLASS

Training method: DEEPCHEM

Data Set	#	Accuracy	Balanced Accuracy	MCC	AUC
● Training set: Data_CAlbicans_Set_2 (training)	2340 records	79.8% ± 0.8	79.6% ± 0.8	0.59 ± 0.02	0.865 ± 0.008
● Test set: Data_CAlbicans_Set_2 (test) [x]	776 records	80% ± 1.0	80% ± 1.0	0.61 ± 0.03	0.9 ± 0.01

Show ROC curves

Real↓/Predicted→	high	low	Hit rate
high	825	245	0.77
low	227	1043	0.82
Precision	0.78	0.81	
Training (Original)			

Real↓/Predicted→	high	low	Hit rate
high	259	102	0.72
low	50	365	0.88
Precision	0.84	0.78	
Test (Original)			

Рис.3.3. Статистичні коефіцієнти розраховані для класифікаційних моделей GNN.

Model name: M4_AntimycoticActivity_XGBOOST_[ALogPS, CDK2, EState]-339390 [rename] , published in 1,3-oxazole derivatives of cytosine as potential inhibitors of glutathione reductase of Candida spp.: QSAR modeling, docking analysis and experimental study of new anti-Candida agents
Public ID is 800

Predicted property: **AntimycoticActivity** modeled in CLASS

Training method: XGBOOST

Data Set	#	Accuracy	Balanced Accuracy	MCC	AUC
● Training set: Data_CAlbicans_Set_2 (training)	2300 records	81.1% ± 0.8	80.7% ± 0.8	0.62 ± 0.02	0.879 ± 0.007
● Test set: Data_CAlbicans_Set_2 (test) [x]	765 records	82% ± 1.0	82% ± 1.0	0.64 ± 0.03	0.88 ± 0.01

Show ROC curves

Real↓/Predicted→	high	low	Hit rate
high	793	247	0.76
low	187	1073	0.852
Precision	0.81	0.81	
Training (Original)			

Real↓/Predicted→	high	low	Hit rate
high	283	72	0.8
low	65	345	0.84
Precision	0.81	0.83	
Test (Original)			

Рис. 3.4. Статистичні коефіцієнти розраховані для класифікаційних моделей XGBOOST.

Model name: M5_Consensus AntimycoticActivity - 342295 [rename] , published in 1,3-oxazole derivatives of cytosine as potential inhibitors of glutathione reductase of Candida spp.: QSAR modeling, docking analysis and experimental study of new anti-Candida agents
Public ID is 803

Predicted property: **AntimycoticActivity** modeled in CLASS

Training method: Consensus

Data Set	#	Accuracy	Balanced Accuracy	MCC	AUC
● Training set: Data_CAibicans_Set_2 (training)	2300 records	81.4% ± 0.8	80.6% ± 0.8	0.62 ± 0.02	0.9 ± 0.006
● Test set: Data_CAibicans_Set_2 (test) [X]	765 records	84% ± 1.0	83% ± 1.0	0.67 ± 0.03	0.91 ± 0.01

Show ROC curves

Real↓/Predicted→	high	low	Hit rate
high	754	286	0.72
low	142	1118	0.887
Precision	0.84	0.8	
Training (Original)			

Real↓/Predicted→	high	low	Hit rate
high	274	81	0.77
low	44	366	0.89
Precision	0.86	0.82	
Test (Original)			

Рис. 3.5. Статистичні коефіцієнти для консенсусної моделі, розраховані на основі попередніх моделей.

У табл. 3.1 узагальнено статистичні параметри, отримані для класифікаційних моделей. Усі класифікаційні моделі мали однакові показники щодо чутливості, специфічності та збалансованої точності (ЗТ). Збалансована точність навчальних наборів знаходилась у межах 79,5-80,7% (табл. 3.1). Сполуки в тестових наборах прогнозували з подібною точністю 80-84%.

Рис. 3.1–3.4 вказують на ефективність роботи окремих моделей. Консенсусна модель була побудована як середнє значення з чотирьох моделей. Консенсусна модель (рис. 3.5) розрахувала найвищі показники. Ця модель була застосована для виявлення найбільш перспективних антифунгальних засобів у віртуальному наборі даних.

3.2. Прогноз активності нових сполук.

На наступному етапі було сформовано віртуальну базу даних з 29 біологічно активних сполук з різними замісниками (табл. 3.2).

Таблиця 3.2.

Статистичні коефіцієнти розраховані з використанням консенсусної регресійної моделі для 29 сполук.

Сполука	SMILES	Pred. activity	CONSENSUS-STD	AD
1	2	3	4	5
1	<chem>O=C1C=CC=C2[C@@H]3C[C@H](CN(C3)C3=C(N=C(O3)C3=CC=CC=C3)[P+](C3=CC=CC=C3)(C3=CC=CC=C3)C3=CC=CC=C3)CN12</chem>	high	0.26	TRUE
2	<chem>COC1=CC=C(C=C1)C1=NC(=C(O1)N1C[C@H]2C[C@H](C1)C1=CC=CC(=O)N1C2)[P+](C1=CC=CC=C1)(C1=CC=CC=C1)C1=CC=CC=C1</chem>	high	0.28	TRUE
3	<chem>ClC1=CC=C(C=C1)C1=NC(=C(O1)N1C[C@H]2C[C@H](C1)C1=CC=CC(=O)N1C2)[P+](C1=CC=CC=C1)(C1=CC=CC=C1)C1=CC=CC=C1</chem>	high	0.29	TRUE
4	<chem>FC1=CC=C(C=C1)C1=NC(=C(O1)N1C[C@H]2C[C@H](C1)C1=CC=CC(=O)N1C2)[P+](C1=CC=CC=C1)(C1=CC=CC=C1)C1=CC=CC=C1</chem>	high	0.3	TRUE
5	<chem>BrC1=CC=C(C=C1)C1=NC(=C(O1)N1C[C@H]2C[C@H](C1)C1=CC=CC(=O)N1C2)[P+](C1=CC=CC=C1)(C1=CC=CC=C1)C1=CC=CC=C1</chem>	high	0.28	TRUE
6	<chem>CC1=CC=C(C=C1)C1=NC(=C(O1)N1C[C@H]2C[C@H](C1)C1=CC=CC(=O)N1C2)[P+](C1=CC=CC=C1)(C1=CC=CC=C1)C1=CC=CC=C1</chem>	high	0.3	TRUE
7	<chem>ClC1=CC(Cl)=C(C=C1)C1=NC(=C(O1)N1CC2CC(C1)C1=CC=CC(=O)N1C2)[P+](C1=CC=CC=C1)(C1=CC=CC=C1)C1=CC=CC=C1</chem>	high	0.39	TRUE
8	<chem>BrC1=CC=C(O1)C1=NC(C#N)=C(O1)N1CC2CC(C1)C1=CC=CC(=O)N1C2</chem>	low	0.33	TRUE
9	<chem>O=C1C=CC=C2C3CC(CN(C3)C3=C(N=C(O3)C3CC3C3=CC=CC=C3)C#N)CN12</chem>	low	0.36	TRUE
10	<chem>O=C1C=CC=C2C3CC(CN(C3)C3=C(N=C(O3)C3=C4C=CC=CC4=CC=C3)C#N)CN12</chem>	low	0.44	FALSE

Продовження табл. 3.2.

1	2	3	4	5
11	<chem>FC1=C(C=CC=C1)C1=NC(C#N)=C(O1)N1CC2CC(C1)C1=CC=CC(=O)N1C2</chem>	low	0.1	FALSE
12	<chem>O=C1C=CC=C2C3CC(CN(C3)C3=C(N=C(O3))\C=C\C3=CC=CC=C3)C#N)CN12</chem>	low	0.13	TRUE
13	<chem>CC(C)C1=NC(C#N)=C(O1)N1C[C@H]2C[C@H](C1)C1=CC=CC(=O)N1C2</chem>	high	0.49	FALSE
14	<chem>CC1=NC(C#N)=C(O1)N1C[C@H]2C[C@H](C1)C1=CC=CC(=O)N1C2</chem>	high	0.49	FALSE
15	<chem>C1C1=CC=CC=C1C1=NC(C#N)=C(O1)N1C[C@H]2C[C@H](C1)C1=CC=CC(=O)N1C2</chem>	low	0.3	TRUE
16	<chem>CC1=CC=C(\C=C\C2=NC(C#N)=C(O2)N2C[C@H]3C[C@H](C2)C2=CC=CC(=O)N2C3)C=C1</chem>	low	0.39	TRUE
17	<chem>C1C1=CC=C(\C=C\C2=NC(C#N)=C(O2)N2C[C@H]3C[C@H](C2)C2=CC=CC(=O)N2C3)C(C1)=C1</chem>	low	0.35	TRUE
18	<chem>[O-][N+](=O)C1=CC=C(C=C1)C1=NC(C#N)=C(O1)N1C[C@H]2C[C@H](C1)C1=CC=CC(=O)N1C2</chem>	low	0.39	TRUE
19	<chem>[O-][N+](=O)C1=CC(=CC=C1Cl)C1=NC(C#N)=C(O1)N1C[C@H]2C[C@H](C1)C1=CC=CC(=O)N1C2</chem>	low	0.33	TRUE
20	<chem>[O-][N+](=O)C1=CC=CC=C1C1=NC(C#N)=C(O1)N1C[C@H]2C[C@H](C1)C1=CC=CC(=O)N1C2</chem>	low	0.39	TRUE
21	<chem>CCOC1=CC=C(C=C1)C1=NC(C#N)=C(O1)N1C[C@H]2C[C@H](C1)C1=CC=CC(=O)N1C2</chem>	low	0.11	TRUE
22	<chem>C=CCOC1=CC=C(C=C1)C1=NC(C#N)=C(O1)N1C[C@H]2C[C@H](C1)C1=CC=CC(=O)N1C2</chem>	low	0.33	TRUE
23	<chem>CCOC1=CC(=CC=C1)C1=NC(C#N)=C(O1)N1C[C@H]2C[C@H](C1)C1=CC=CC(=O)N1C2</chem>	low	0.19	TRUE
24	<chem>C1C1=CC(=CC=C1)C1=NC(C#N)=C(O1)N1C[C@H]2C[C@H](C1)C1=CC=CC(=O)N1C2</chem>	low	0.29	TRUE

Продовження табл. 3.2.

1	2	3	4	5
25	<chem>CCOC1=CC=CC=C1C1=NC(C#N)=C(O1)N1C[C@H]2C[C@H](C1)C1=CC=CC(=O)N1C2</chem>	low	0.45	TRUE
26	<chem>CCOC1=CC=CC=C1C1=NC(C#N)=C(O1)N1C[C@H]2C[C@H](C1)C1=CC=CC(=O)N1C2</chem>	low	0.41	TRUE
27	<chem>CCCC1=NC(C#N)=C(O1)N1C[C@H]2C[C@@H](C1)C1=CC=CC(=O)N1C2</chem>	low	0.23	TRUE
28	<chem>[O-][N+](=O)C1=CC(=CC=C1)C1=NC(C#N)=C(O1)N1C[C@H]2C[C@H](C1)C1=CC=CC(=O)N1C2</chem>	low	0.37	TRUE
29	<chem>[O-][N+](=O)C1=CC(C2=NC(C#N)=C(O2)N2C[C@H]3C[C@H](C2)C2=CC=CC(=O)N2C3)=C(C1)C=C1</chem>	low	0.32	TRUE

* Остаточний набір сполук представлений жирним шрифтом. CONSENSUS-STD - стандартне відхилення прогнозів, отримане з ансамблю моделей.

Усі сполуки перевірено за допомогою консенсусної моделі (див. табл. 3.1). Слід зазначити, що 18 речовин, передбачених як неактивні, було виключено з набору. Решту – відібрано для подальшої оцінки. Сполуки перевірялись на можливість хімічного синтезу та його доцільність, а також на відсутність потенційної токсичності (мутагенність, канцерогенез, подразнення та дія на репродуктивну функцію) за допомогою програмного забезпечення DataWarrior [179]. У результаті цього аналізу було відібрано 11 сполук для подальших досліджень: хімічного синтезу та біологічних випробувань (див. табл. 3.3).

3.3. Хімічний синтез цитизиновмісних 1,3-оксазолів.

Взаємодія 1-ациламіно-2,2-дихлоретеніл(трифеніл)фосфоній хлоридів **A** з цитизином **B** призводить до утворення 5-цитизиніл-1,3-оксазол-4-ілфосфоній хлоридів, які перетворюють у відповідні перхлорати **1-6** та **7** (нові сполуки) (рис. 3.6). Синтез проводили перемішуванням реакційної суміші в метанолі при 30–40 °C протягом 5 год.

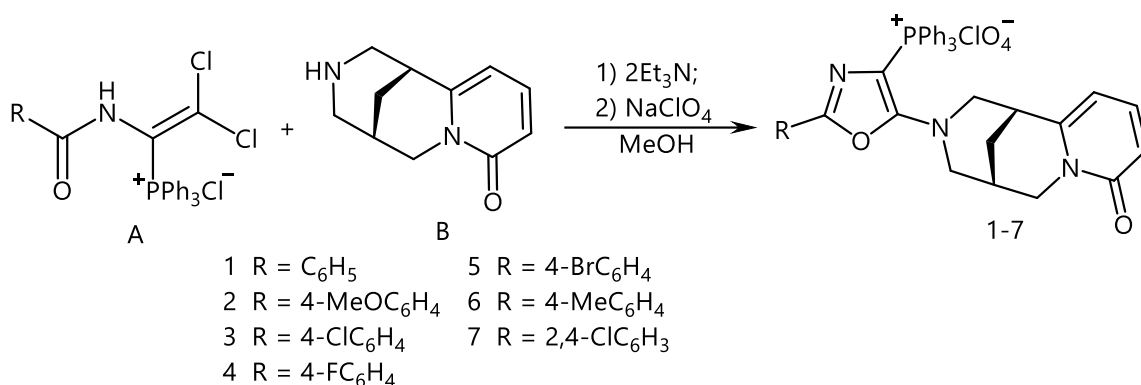


Рис. 3.6. Синтез 5-цитизиніл-1,3-оксазол-4-іл(трифеніл)фосфоній перхлоратів **1-7**.

1-Ациламіно-2,2-дихлоракилонітрили **C** використовували для синтезу 5-цитизиніл-1,3-оксазол-4-карбонітрилів **8-11** (рис. 3.7). Реакцію проводили в ТГФ у присутності триетиламіну при 20-25°C.

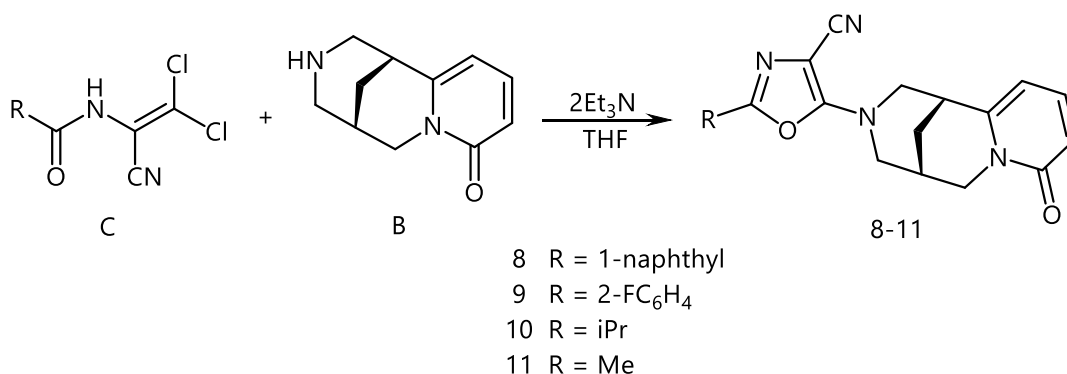


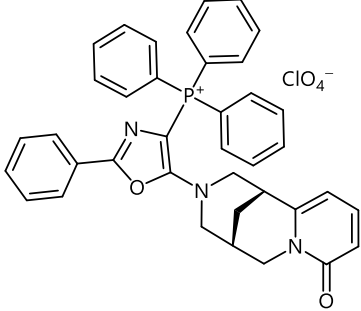
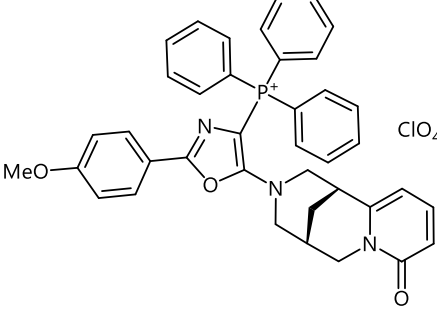
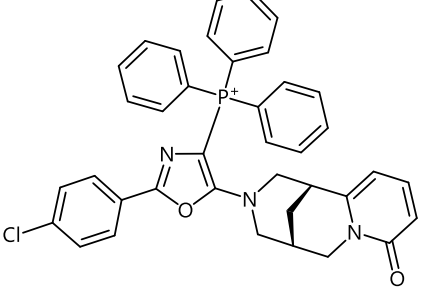
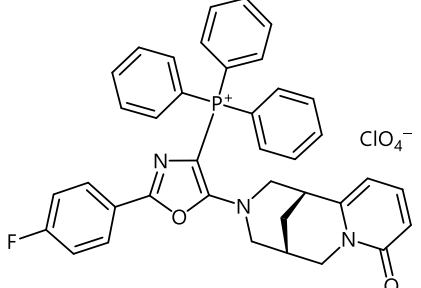
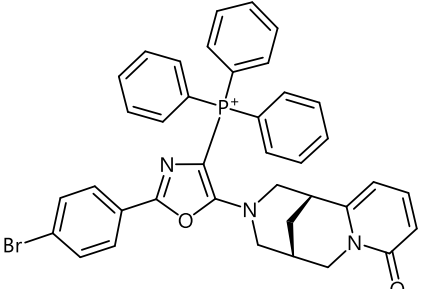
Рис. 3.7. Синтез 5-цитизиніл-1,3-оксазол-4-карбонітрилів **8-11**.

Сполуки **1-11** (табл. 3.3) є безбарвними кристалічними речовинами, які легко розчиняються в ацетонітрилі та ДМФА і погано розчиняються у воді, дихлорметані та бензені. Склад і структуру отриманих сполук підтверджується за допомогою елементного аналізу, ЯМР та ІЧ-спектроскопії та даних хромато-мас-спектрометрії. Спектри ЯМР ¹H сполук **1-11** містять сигнали протонів цитизинової частини в очікуваних положеннях.

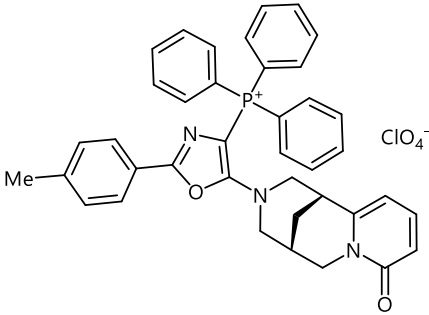
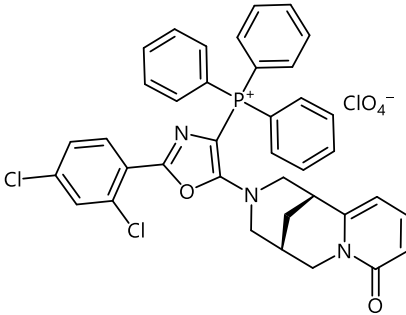
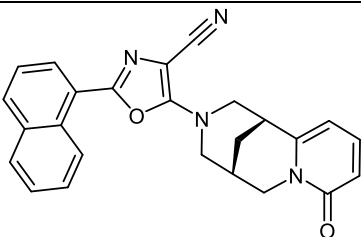
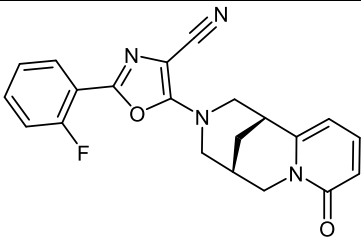
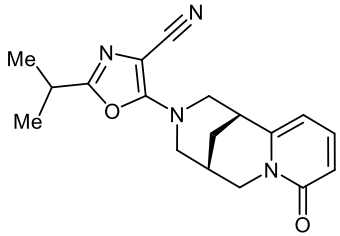
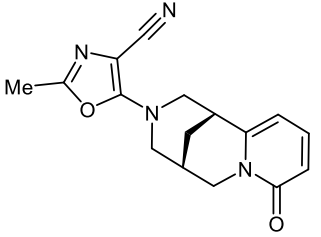
ІЧ-спектри сполук **7, 9** та **10** містять сильні смуги поглинання в діапазоні 1649–1541 см⁻¹, характерні для 5-аміно-1,3-оксазольного кільця та цитизинової групи С=О. Крім того, спектри фосфонієвої солі **7** містять сильну смугу при 1090 см⁻¹ перхлорат-аніона; спектри сполук **8-11** містили сильні смуги поглинання нітрильної групи 2207-2231 см⁻¹.

Таблиця 3.3.

Хімічні структури синтезованих потенційно біологічно активних сполук.

Сполука №	Хімічна структура	M_r	Хімічна назва
1		694.13	(5-(8-Oxo-1,5,6,8-tetrahydro-2H-1,5-methanopyrido[1,2-a][1,5]diazocin-3(4H)-yl)-2-phenyl-1,3-oxazol-4-yl)triphenylphosphonium perchlorate
2		724.16	(2-(4-Methoxyphenyl)-5-(8-oxo-1,5,6,8-tetrahydro-2H-1,5-methanopyrido[1,2-a][1,5]diazocin-3(4H)-yl)-1,3-oxazol-4-yl)triphenylphosphonium perchlorate
3		728.57	(2-(4-Chlorophenyl)-5-(8-oxo-1,5,6,8-tetrahydro-2H-1,5-methanopyrido[1,2-a][1,5]diazocin-3(4H)-yl)-1,3-oxazol-4-yl)triphenylphosphonium perchlorate
4		712.12	(2-(4-Fluorophenyl)-5-(8-oxo-1,5,6,8-tetrahydro-2H-1,5-methanopyrido[1,2-a][1,5]diazocin-3(4H)-yl)-1,3-oxazol-4-yl)triphenylphosphonium perchlorate
5		773.03	(2-(4-Bromophenyl)-5-(8-oxo-1,5,6,8-tetrahydro-2H-1,5-methanopyrido[1,2-a][1,5]diazocin-3(4H)-yl)-1,3-oxazol-4-yl)triphenylphosphonium perchlorate

Продовження табл. 3.3.

1	2	3	4
6		708.16	(2-(4-Methylphenyl)-5-(8-oxo-1,5,6,8-tetrahydro-2H-1,5-methanopyrido[1,2-a][1,5]diazocin-3(4H)-yl)-1,3-oxazol-4-yl)triphenylphosphonium perchlorate
7		763.02	(2-(2,4-Dichlorophenyl)-5-(8-oxo-1,5,6,8-tetrahydro-2H-1,5-methanopyrido[1,2-a][1,5]diazocin-3(4H)-yl)-1,3-oxazol-4-yl)triphenylphosphonium perchlorate
8		409.27	2-(1-Naphthyl)-5-(8-oxo-1,5,6,8-tetrahydro-2H-1,5-methanopyrido[1,2-a][1,5]diazocin-3(4H)-yl)-1,3-oxazole-4-carbonitrile
9		376.39	2-(2-Fluorophenyl)-5-(8-oxo-1,5,6,8-tetrahydro-2H-1,5-methanopyrido[1,2-a][1,5]diazocin-3(4H)-yl)-1,3-oxazole-4-carbonitrile
10		324.39	2-Isopropyl-5-(8-oxo-1,5,6,8-tetrahydro-2H-1,5-methanopyrido[1,2-a][1,5]diazocin-3(4H)-yl)-1,3-oxazole-4-carbonitrile
11		296.33	2-Methyl-5-(8-oxo-1,5,6,8-tetrahydro-2H-1,5-methanopyrido[1,2-a][1,5]diazocin-3(4H)-yl)-1,3-oxazole-4-carbonitrile

ІЧ-спектри сполук **7**, **9** та **10** містять сильні смуги поглинання в діапазоні 1649–1541 cm^{-1} , характерні для 5-аміно-1,3-оксазольного кільця та

цитизинової групи C=O. Крім того, спектри фосфонієвої солі **7** містять сильну смугу при 1090 см^{-1} перхлорат-аніона; спектри сполук **8-11** містили сильні смуги поглинання нітрильної групи $2207\text{-}2231\text{ см}^{-1}$.

3.4. Біологічна активність цитизиновмісних 1,3-оксазолів.

Результати біологічних випробувань, наведені в табл. 3.4, підтвердили прогнозовану антифунгальну активність синтезованих сполук щодо клінічного ізоляту штаму *Candida krusei* (стійкого до флуконазолу) та стандартного штаму *C. albicans* (ATCC 10231).

Таблиця 3.4.

Антифунгальна активність синтезованих цитизиновмісних 1,3-оксазолів з прогнозованою активністю.

Сполука	Діаметр зони інгібування, мм	
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Candida krusei</i> (clinical isolate)
1	14.3±0.6	14.4±0.4
2	n/a*	11.2±0.4
3	15.7±0.6	15.5±0.2
4	10.2±0.3	15.4±0.5
5	13.3±0.4	15.5±0.6
6	12.6±0.5	11.3±0.6
7	14.4±0.5	13.3±0.3
8	n/a	n/a
9	n/a	n/a
10	35.6±0.7	40.6±0.3
11	30.3±0.7	32.4±0.4
Fluconazole	26.3±0.3	n/a

Сполуки **10** та **11** показали найвищу активність щодо обох штамів грибів із діаметром зони інгібування від 30,3 до 35,6 мм та від 32,4 до 40,6 мм

відповідно. Всі інші цитизиновні похідні 1,3-оксазолу, передбачені як активні (**1, 3-7**), утворювали зони інгібування діаметром 10,2-15,7 мм.

3.5. Створення гомологічної моделі глутатіонредуктази *C.albicans*

Як потенційну мішень для проведення молекулярного докінгу найбільш активних цитизиновмісних 1,3-оксазолів **10** та **11** було обрано фермент глутатіонредуктаза [180]. Аналіз бази даних ChEMBL на предмет залежності структура-активність показав, що значна кількість цитизиновмісних сполук є інгібіторами тіоредоксин глутатіонредуктази *Schistosoma mansoni* (ChEMBL bioassay ID: 1614161) [181, 182], а первинна структура тіоредоксин глутатіонредуктази *Schistosoma mansoni* дуже подібна до структури глутатіонредуктази *C.albicans*.

3.5.1. Порівняння первинної структури тіоредоксин глутатіонредуктази *Schistosoma mansoni* та глутатіонредуктази *C.albicans*.

Для підтвердження цієї гіпотези було проведено порівняння первинної та вторинної структур ферментів глутатіонредуктази *C. albicans* та тіоредоксин глутатіонредуктази *Schistosoma mansoni*. Порівняння первинної структури ферментів проводили за допомогою онлайн ресурсу NCBI Protein BLAST [166]. Для цього використано первинну структуру глутатіонредуктази *C. albicans* (UniProt: Q59NQ5) [164] та тіоредоксин глутатіонредуктази *S. mansoni* (UniProt: Q962Y6) [165] у FASTA форматі (рис. 3.8).

Отримані результати (рис. 3.8) вказують на значну схожість первинної структури ферментів *Schistosoma mansoni* та *C. albicans* - 34% ідентичності послідовностей, 54% подібності послідовностей та низьку кількість проміжків (10%). Але відсутність кристалічної структури глутатіонредуктази *C. albicans* в доступних PDB-банках не дозволяє більш детально вивчити взаємодію цитизиновмісних сполук з глутатіонредуктазою *C. albicans*. Тому нами було використано гомологічне моделювання глутатіонредуктази *C. albicans* за допомогою веб-сервера SWISSMODEL.

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
243 bits(621)	1e-77	Composition-based stats.	170/502(34%)	274/502(54%)	52/502(10%)
Query 108	YDLIVIGGGSGGLAAGKEAAKYGAKTAVLDYVEPTPIGTTWGLGGTCVNVGCIPKKLMHQ				167
Sbjct 38	FDYLVIGGGSGGVASARRAAKYGAKVLLIE-----SNFKKFGGTCVNVGCVPKKVMWY				90
Query 168	AGLLSHALEDAEHFGWSLDRSKISH---NWSTMVEGVQSHIGSLNHWGYKVALRDNQVTYL				224
Sbjct 91	TADLAHKKHDLYAYGLDKEPDSIKYGFDFWAKLKHKRDAYVTRLNGIYENNLKREKVDYA				150
Query 225	NAKGRLI-SPHEVQIT-----DKNQKVSTITGNKIILATGERPKYP-EI				266
Sbjct 151	YGFAKFINSERGEVEVTLSGDQELPFLDEGKTYKKGEKL-VFSADKTLIATGGTAIVPPSV				209
Query 267	PGAVEYGITSDDLFLSPYFPKTLVIGASYVALECAAGFLASLGGDVTVMVR-SILLRGFD				325
Sbjct 210	PGA-ELGTTSDGFFALEKQPKKVAIVGAGYIGVELSGVFSLSGSETHFFIRGDTVLRSD				268
Query 326	QQMAEKVGDY-MENHGKFAKLCVPDEIKQLKVVDTENKPGLLLKVGHYTDGKKFEEEF				384
Sbjct 269	EVIQNTVTDYYIDNLGINIHK-----QSTITKIEGSKDGKKVV--HLKDGTSVE--V				316
Query 385	ETVIFAVGREPQLSKVLCETVGKLDKNGRVCTDDEQTTVSNVYAIGDINAGKPQLTPV				444
Sbjct 317	DELIWTVGRK-SLIDIGLDKVDVKINDKQQIWADEYQVTNPNKIFSLGDV-VGKVELTPV				374
Query 445	AIQAGRYLARRLFAG--ATELTDYSNVATTVFTPLEYGACGLSEEDAIEKYGDKDIEVY				501
Sbjct 375	AIAAGRRLSNRLFSGPEFAKDKLDYNNIPSVIFSHPEAGSIGLSTKEAIEKYGEENLKIY				434
Query 502	HSNFKPLEWTV--HREDNVCYMKLVCRKSDNMRVGLHVLGPNAGEITQGYAVAIKMGA				559
Sbjct 435	QSKFTAMYAMDDQKDKSPTVYKIICAGPEE-KVVLHIVGDSSAEILQGFVVAIKMGA				493
Query 560	TKADFDRITIGIHPTCSETFTTL		581		
Sbjct 494	TKKDFDNCVAIHPTSAEELVTM		515		

Рис. 3.8. Результати порівняння первинної структури тіоредоксин глутатіонредуктази *Schistosoma mansoni* (581) та глутатіонредуктази *C. albicans* (515).

Template	Sequence Identity	Biounit Oligo State	Description
2hqm.1	66.52	homo-dimer	Glutathione reductase Crystal Structure of Glutathione Reductase Glr1 from the Yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
2hqm.1	69.00	homo-dimer	Glutathione reductase Crystal Structure of Glutathione Reductase Glr1 from the Yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
5vdn.1	51.77	homo-dimer	Glutathione oxidoreductase 1.55 Angstrom Resolution Crystal Structure of Glutathione Reductase from <i>Yersinia pestis</i> in Comp
6b4o.1	47.31	homo-dimer	Glutathione reductase 1.73 Angstrom Resolution Crystal Structure of Glutathione Reductase from <i>Enterococcus faecalis</i>
5u1o.1	50.88	homo-dimer	Glutathione reductase 2.3 Angstrom Resolution Crystal Structure of Glutathione Reductase from <i>Vibrio parahaemolyticus</i>

Рис. 3.9. Шаблони, відібрані для побудови гомологічних моделей.

3.6. Гомологічне моделювання глутатіонредуктази *C. albicans*

Попередній пошук амінокислотних послідовностей, пов'язаних з глутатіонредуктазою *C. albicans*, проведено за допомогою бібліотеки

шаблонів SWISS-MODEL. Для цього було створено 9525 шаблонів, з яких відібрано 5 шаблонів (рис. 3.9) з ідентичністю послідовності вище 47% та побудовано 5 моделей на основі цих шаблонів.

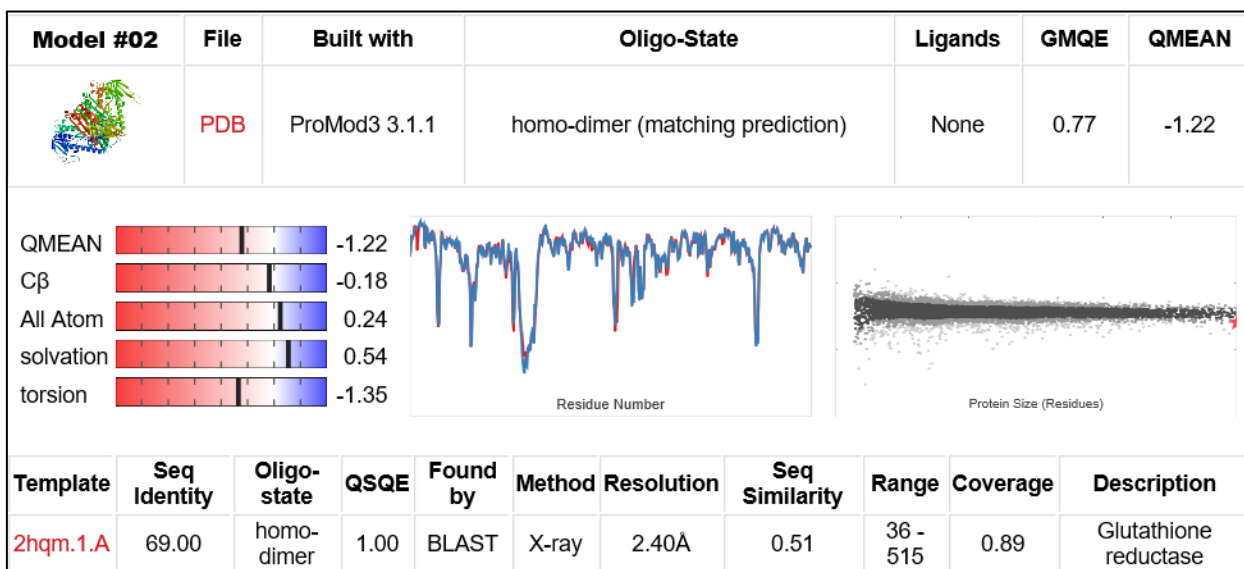


Рис. 3.10. Загальні характеристики та параметри якості створеної моделі.

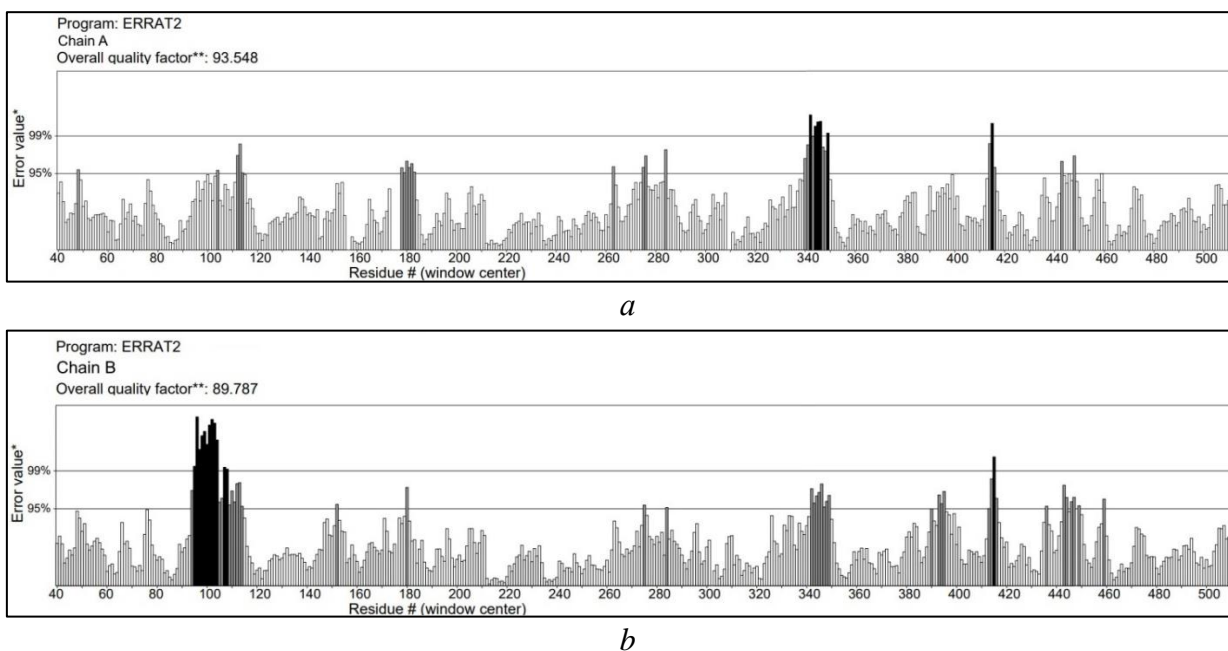


Рис. 3.11. 3D-профіль гомологічної моделі, підтвердженої сервером ERRAT:
a) субодиниці; *b*) субодиниці Б

На основі значень ідентичності послідовності, оцінок перевірки якості моделей GMQE, QMEAN, QSQE та роздільної здатності, обрано найбільш якісну та оптимальну модель #02, створену на основі шаблону 2hqm.1 (Рис. 3.10). Оптимальність цієї моделі ґрунтується на значеннях роздільної здатності (2,40Å) та якісних характеристиках QMEAN (-1,22), GMQE (0,77), GSQE (1,00).

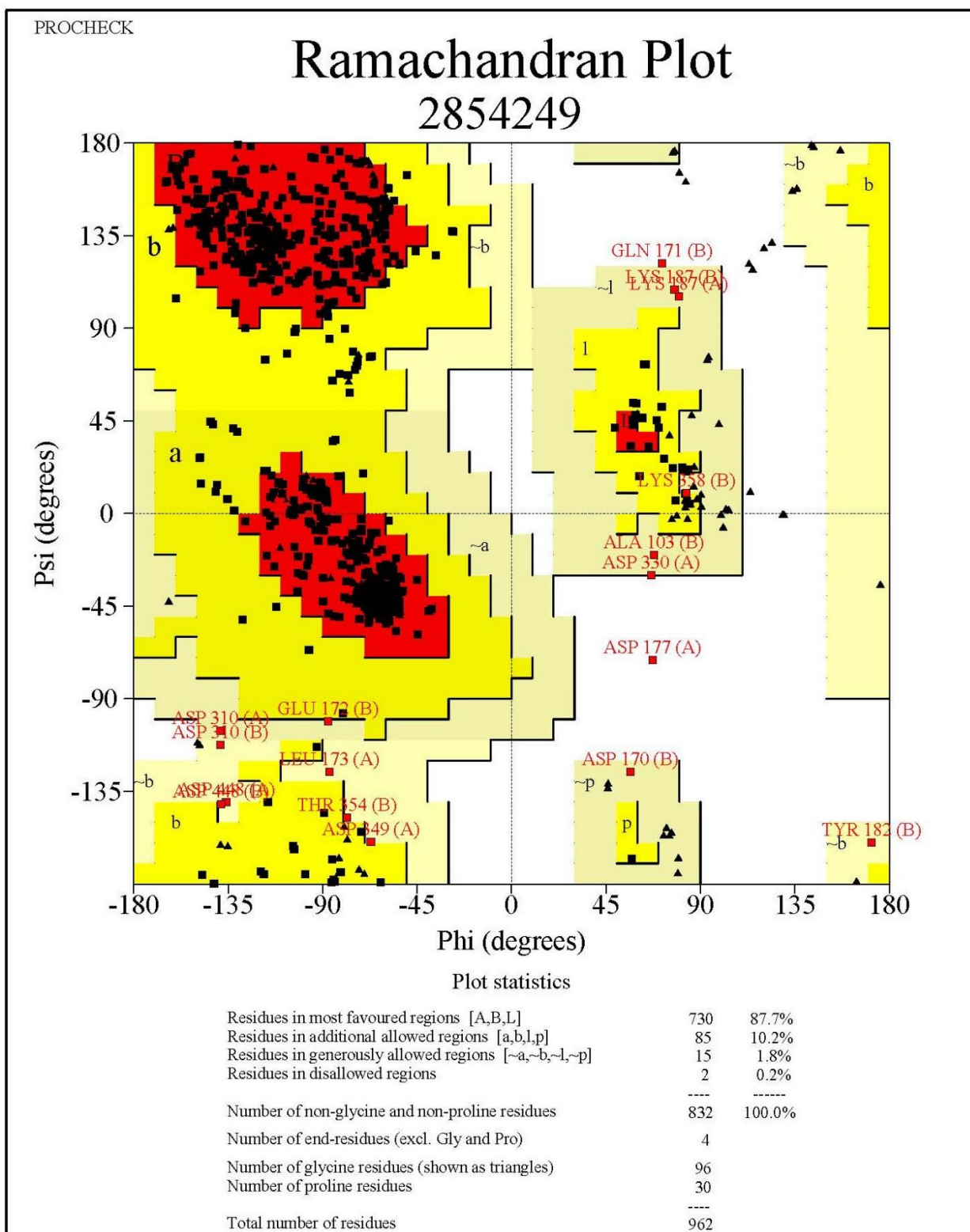


Рис. 3.12. Графік Рамачандрана перевірки стереохімічної якості моделі глутатіонредуктази *C.albicans*, створений сервером перевірки PROCHECK.

На наступному етапі проводили оцінку якості моделі **2** за допомогою онлайн-ресурсів ERRAT та PROCHECK. Аналіз результатів (ERRAT-веб-сервер) показав високу якість моделі. Загальний коефіцієнт якості для субодиниці А становить 93,548, а для субодиниці В - 97,953 (рис. 3.11).

Аналіз даних “Ramachandran plot” (веб-сервер PROCHECK) підтвердив високу якість структури 3D-моделі глутатіонредуктази *C.albicans* (рис. 3.12).

Аналіз діаграми Рамачандрана (рис. 3.12) свідчить, що 87,7% амінокислотних залишків було розподілено у найбільш сприятливих, 10,2% – у додатково дозволених, 1,8% – у вільно дозволених, 0,2% – у недозволених областях. Таким чином, створена 3D-структура глутатіонредуктази *C. albicans* є якісною і може бути використана для молекулярного докінгу.

3.7. Молекулярний докінг

Оскільки сайт зв'язування цитизиновмісних 1,3-оксазолів наразі не ідентифіковано, то було проведено молекулярний докінг-аналіз лігандів **10** та **11** в активні центри GSSG, FAD та сайт зв'язування NADPH глутатіонредуктази *C. albicans* (Табл. 3.5). Перевірку якості молекулярного докінгу проведено за допомогою редокінгу лігандів GSSG, FAD та NADPH у відповідні активні сайти. Редокінг проведено після рандомізації конформації та відповідної орієнтації цих лігандів. Утворені ліганд-білкові комплекси демонструють $\Delta G = -5,3, -9,6, -7,9$ ккал/моль (табл. 5) та значення $RMSD \leq 2\text{Å}$ для всіх атомів лігандів [183].

Таблиця 3.5.

Розрахована енергія вільного зв'язування (ΔG) лігандів **10, 11, GSSG, NADPH** та **FAD** в активних центрах глутатіонредуктази *C.albicans*.

Ліганди	Estimated free binding energy ΔG , (kcal/mol)		
	GR активний сайт	NADPH-зв'язуючий сайт	FAD активний сайт
10	-5.2	-6.9	-8.5
11	-4.9	-6.7	-8.4
GSSG	-5.3	–	–
NADPH	–	-7.9	–
FAD	–	–	-9.6

З табл. 5 видно, що зв'язування лігандів **10** та **11** у FAD-активному сайті відбувається з більшою енергією ($\Delta G = -8,5, -8,4$ ккал/моль), ніж у сайті зв'язування NADPH ($\Delta G = -6,9, -6,7$ ккал/моль) та GSSG ($\Delta G = -5,2, -4,9$ ккал/моль). Таким чином, утворення ліганд-білкових комплексів сполуками **10** та **11** у FAD-активному сайті є більш енергетично вигідним. Молекулярний докінг сполук **10** та **11** у FAD зв'язуючи сайт глутатіонредуктази *C.albicans* представлено на рис. 3.13–3.14.

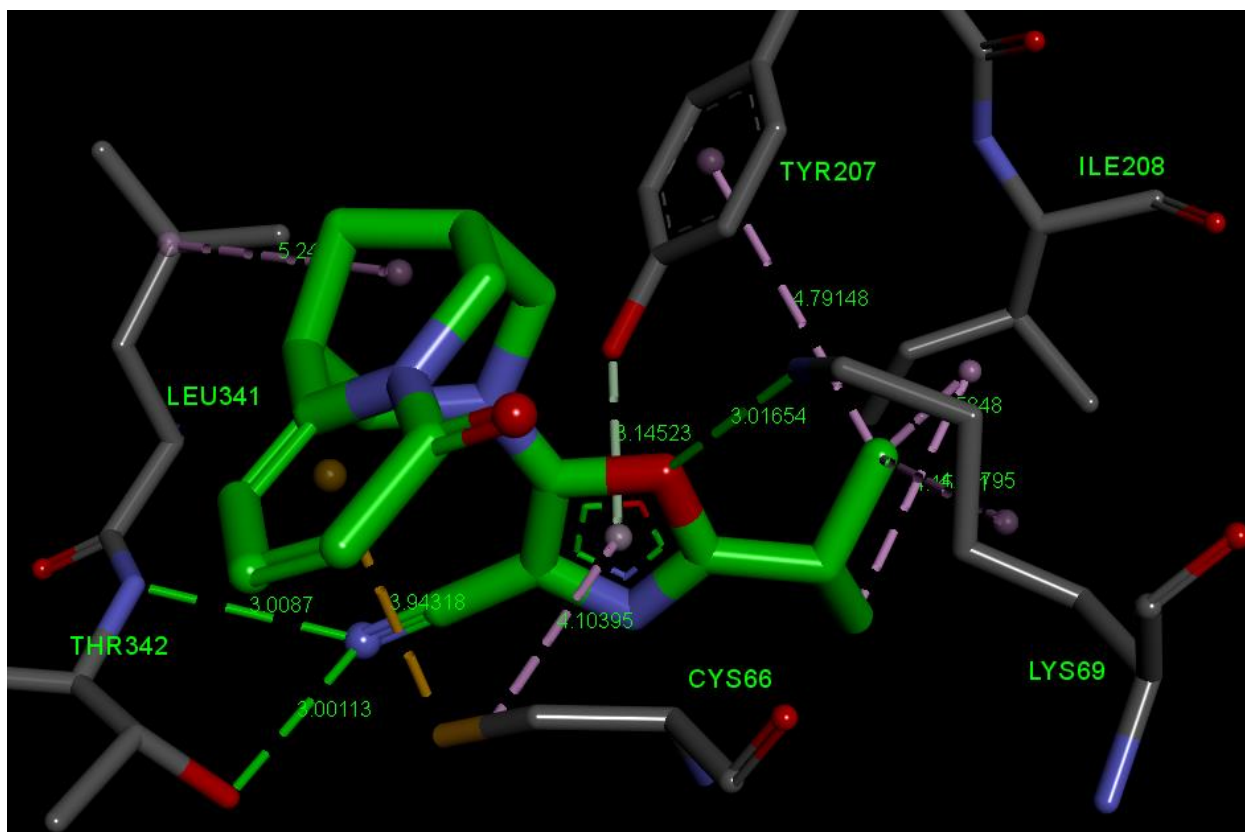


Рис. 3.13. Молекулярний докінг сполуки **10** в FAD зв'язуючий сайт глутатіонредуктази *C.albicans*.

Аналіз рис. 3.13 свідчить про утворення лігандом **10** двох водневих зв'язків ($3,008\text{Å}$, $3,001\text{Å}$) між карбонітрильною групою та амінокислотою THR342 та двох водневих зв'язків ($3,01\text{Å}$, $3,14\text{Å}$) між оксазольним кільцем та LYS69, TYR207. Гідрофобні взаємодії (π -сірка та π -алкіл) з довжиною $3,94\text{Å}$, $4,10\text{Å}$ утворюються між цитизиновою групою і оксазольним кільцем ліганду з амінокислотним залишком CYS66. Крім того, цитизиновий фрагмент реалізує алкільну взаємодію ($5,25\text{Å}$) з LEU341. Між алкільним ланцюгом ліганду та

амінокислотами ILE208, LYS69, TYR207 реалізуються алкільні взаємодії з довжинами 3,96Å, 4,15Å, 4,31Å, 4,80Å відповідно.

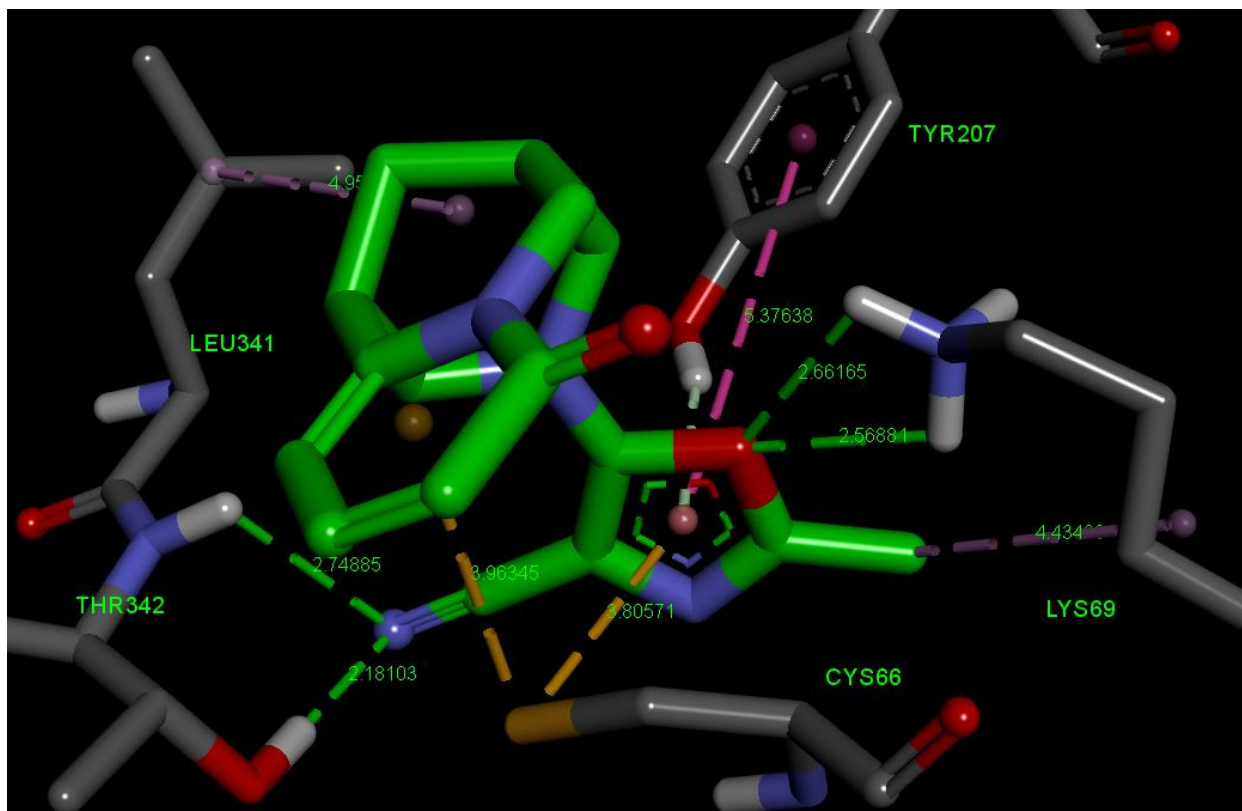


Рис. 3.14. Молекулярний докінг сполуки **11** в FAD зв'язуючий сайт глутатіонредуктази *C. albicans*.

Ліганд **11** (рис. 3.14) утворює два водневі зв'язки (2,18Å, 2,75Å) між карбонітрильною групою та амінокислотою THR342, а також три водневі зв'язки (2,24Å, 2,56Å, 2,66Å) між оксазольним кільцем та амінокислотними залишками LYS69, TYR207. Необхідно відмітити ряд гідрофобних взаємодій: дві π - π взаємодії (3,81Å, 3,96Å) між цитизиновою групою і оксазольним кільцем з амінокислотою CYS66, дві алкільні взаємодії (4,43Å, 4,95Å) між цитизиновою групою, метильною групою оксазолу та амінокислотами LEU34, LYS69. Крім того, утворюється π - π взаємодія (5,38Å) між оксазольним кільцем та амінокислотним залишком TYR207.

Таким чином, біологічно активні цитизиновмісні 1,3-оксазоли **10** і **11** представлені в нашій роботі як ефективні протикандидозні засоби. Набір прогнозуючих моделей було розроблено на основі різних методів машинного навчання з використанням веб-платформи OCHEM. Створені класифікаційні

моделі активності похідних цитизину дозволили ідентифікувати ряд сполук з високим рівнем антикандидозної активності. Побудовані класифікаційні QSAR моделі продемонстрували високу стабільність, надійність та прогнозуючу здатність. Встановлено, що консенсусне прогнозування для моделей, що використовує усі статистично значимі моделі навчальних наборів, гарантує кращий баланс між точністю прогнозування та охопленням хімічного простору, ніж окремі моделі. Розроблені моделі є загальнодоступними і можуть бути використані для пошуку нових протигрибкових засобів проти штамів *C. albicans*, у тому числі проти стійких до штамів *Candida spp.* Одинадцять сполук, які передбачені як активні, були протестовані проти штамів *Candida spp.* Результати показали, що сполуки **10** та **11** мають високу антифунгальну активність проти штаму *C. albicans* ATCC 10231 та флуконазол-резистентного штаму *C. krusei*.

В результаті молекулярного докінгу показано, що найбільш енергетично вигідним є утворення ліганд-білкових комплексів лігандами **10**, **11** у каталітичному центрі FAD глутатіонредуктази *C. albicans*. Комплексоутворення забезпечується такими структурними фрагментами, як цитизин, карбонітрил та оксазол. Висока стабільність ліганд-білкових комплексів підтверджується високою енергією зв'язування (ΔG) в діапазоні від $-8,5$ до $-8,4$ ккал/моль. Амінокислотні залишки CYS66, LYS69, TYR207, ILE208, LEU341, THR342 виконують ключову роль у зв'язуванні цих сполук у FAD-активному центрі глутатіонредуктази *C. albicans*.

Таким чином, аналіз отриманих *in silico* та *in vitro* результатів показав, що похідні 1,3-оксазолу **10**, **11**, які містять у структурі цитизиновий фрагмент, представляють нову платформу для подальших досліджень потенційних інгібіторів глутатіонредуктази *Candida spp.* з високою антифунгальною активністю.

ВИСНОВКИ

1. Проведено огляд літературних джерел щодо структури і функції глутатіонредуктази, механізму її дії та функцій в різних живих організмах дозволив сформулювати сучасні підходи та принципи до раціонального пошуку нових інгібіторів глутатіонредуктази, як ефективних антикандидозних агентів. Проаналізовано структури наявних та досліджених інгібіторів глутатіонредуктази з метою виявлення закономірностей структура-активність для пошуку нових біологічно активних сполук в ряду цитизиновмісних 1,3-оксазолів.
2. Використовуючи веб-платформу OCHEM створено класифікаційні прогноуючі QSAR моделі з високою стабільністю та прогноуючою здатністю. Зроблено прогноз для цитизиновмісних 1,3-оксазолів та ідентифіковано 11 молекул як потенційних антифунгальних агентів. За аналізом відомих структур біологічно активних цитизиновмісних сполук виявлено ряд інгібіторів тіоредоксин глутатіонредуктази *Schistosoma mansoni*.
3. Синтезовано ряд похідних 4-ціано- та 4-трифенілфосфорильованих похідних 5-(8-оксо-1,5,6,8-тетрагідро-2*H*-1,5-метанопіридо[1,2-*a*][1,5]діазоцин-3(4*H*)-іл)-1,3-оксазолу з високою прогнозованою антифунгальною активністю. Склад і структуру отриманих сполук підтверджено за допомогою елементного аналізу, ЯМР та ІЧ-спектроскопії та даних хромато-мас-спектрометрії.
4. Здійснені біологічні *in vitro* дослідження синтезованих сполук проти стандартного штаму *Candida albicans* та флуконазол резистентного штаму *Candida krusei*. Продемонстровано, що сполуки **10** та **11** мають найвищу антифунгальну активність.
5. За допомогою веб-серверу SWISS-MODEL створено гомологічну модель глутатіонредуктази *Candida albicans* з високими показниками якості.
6. Представлено потенційний механізм антифунгальної дії досліджуваних сполук за допомогою молекулярного докінгу. Досліджено основні активні

центри глутатіонредуктази *C. albicans*. Показано, що потенційним центром зв'язування цитизиновмісних 1,3-оксазолів є FAD-активний сайт, що підтверджується розрахованою найвищою енергією зв'язування (ΔG) лігандів **10** та **11** в зазначеному центрі глутатіонредуктази *C. albicans*.

7. Досліджені цитизиновмісні 1,3-оксазоли **10**, **11** представляються актуальними об'єктами для подальших досліджень потенційних інгібіторів глутатіонредуктази *Candida spp.* як ефективних антифунгальних агентів.
8. Матеріали магістерської роботи можуть бути використані при проведенні факультативних занять з хімії у ліцєях з профільного навчання та спеціалізованих школах з поглибленим вивченням природничих дисциплін.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Sarma G.N., Savvides S.N., Becker K., Schirmer M., Schirmer R.H., Karplus P.A. Glutathione Reductase of the Malarial Parasite *Plasmodium falciparum*: Crystal Structure and Inhibitor Development. *Journal of Molecular Biology*. 2003. Vol. 328, Issue 4. P. 893-907
2. Bonse S., Richards J. M., Ross S. A., Lowe G., Krauth-Siegel R. L. (2,2':6',2''-Terpyridine)platinum(II) Complexes Are Irreversible Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Trypanothione Reductase But Not of Human Glutathione Reductase. *J. Med. Chem.* 2000. Vol. 43. Issue 25. P. 4812–4821
3. Turcano L, Torrente E, Missineo A, Andreini M, Gramiccia M, et al. Identification and binding mode of a novel *Leishmania* Trypanothione reductase inhibitor from high throughput screening. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2018. Vol. 12(11): e0006969.
4. Kuntz A. N, Davioud-Charvet E, Sayed AA, Califf LL, Dessolin J, et al. Thioredoxin Glutathione Reductase from *Schistosoma mansoni*: An Essential Parasite Enzyme and a Key Drug Target. *PLOS Medicine*. 2007. Vol. 4. Issue 6. e206. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040264>
5. Dominique Sanglard, Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Current Opinion in Microbiology*. 2002. Vol. 5. Issue 4. P. 379-385
6. Krauth-Siegel R.L., Bauer H., Schirmer R.H. Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: old and new drug targets in trypanosomes and malaria-causing plasmodia. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 2005. Vol. 44. P. 690–715.
7. Williams C.H., Arscott L.D., Muller S., Lennon B.W., Ludwig M.L., Wang P.F., Veine D.M., Becker K., Schirmer R.H. Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved. *Eur. J. Biochem.* 2000. Vol. 267. P. 6110–6117.
8. Pai E.F., Schulz G.E. The catalytic mechanism of glutathione reductase as derived from X-ray diffraction analyses of reaction intermediates. *J. Biol. Chem.* 1983. Vol. 258. P. 1752–1757.

9. Glutathione reductase. *Вікіпедія* : веб-сайт, URL : https://en.wikipedia.org/wiki/Glutathione_reductase (дата звернення: 14.11.2020).
10. Racker E. Glutathione reductase from bakers' yeast and beef liver. *J. Biol. Chem.* 1955. Vol. 217. Issue 2. P. 855–65.
11. Massey V., Williams C.H. On the reaction mechanism of yeast glutathione reductase. *J. Biol. Chem.* 1965. Vol. 240. Issue 11. P. 4470–80.
12. Mapson L.W., Isherwood F.A. Glutathione reductase from germinated peas. *Biochem. J.* 1963. Vol. 86. P. 173–191.
13. Schulz G.E., Schirmer R.H., Sachsenheimer W., Pai E.F. The structure of the flavoenzyme glutathione reductase. *Nature.* 1978. Vol. 273 (5658). P. 120–124.
14. Thieme R., Pai E.F., Schirmer R.H., Schulz G.E. Three-dimensional structure of glutathione reductase at 2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 1981. Vol. 152. P. 763–782.
15. Mittl P.R., Schulz G.E. Structure of glutathione reductase from *Escherichia coli* at 1.86 Å resolution: comparison with the enzyme from human erythrocytes. *Protein Sci.* 1994. Vol. 3 P. 799–809.
16. Yu J., Zhou C.Z. Crystal structure of glutathione reductase Glr1 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proteins.* 2007. Vol. 68. P. 972–979.
17. Karplus P.A., Schulz G.E. Refined structure of glutathione reductase at 1.54 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 1987. Vol. 195. P. 701–729.
18. Schulz G.E. Gene duplication in glutathione reductase. *J. Mol. Biol.* 1980. Vol. 138. P. 335–347.
19. Savvides S.N., Karplus P.A. Kinetics and crystallographic analysis of human glutathione reductase in complex with a xanthene inhibitor, *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. P. 8101–8107.
20. Deponte M., Urig S., Arscott L.D., Fritz-Wolf K., Reau R., Herold-Mende C., Koncarevic S., Meyer M., Davioud-Charvet E., Ballou D.P., Williams C. H. Jr., Becker K. Mechanistic studies on a novel, highly potent gold-phosphole inhibitor of human glutathione reductase. *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280. P. 20628–20637.

21. Simoni R.D., Hill R.L., Vaughan M. The discovery of glutathione by F. Gowland Hopkins and the beginning of biochemistry at Cambridge University. *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. e13.
22. Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* 1988. Vol. 263 (33). P. 17205–8.
23. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. Vol. 1830 (5). P. 3217–3266.
24. Mannervik B. The enzymes of glutathione metabolism: an overview. *Biochem. Soc. Trans.* 1987. Vol. 15 (4). P. 717–8.
25. Kanzok S.M., Fechner A., Bauer H., Ulschmid J.K., Müller H.M., Botella-Munoz J., Schneuwly S., Schirmer R., Becker K. Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*. *Science.* 2001. Vol. 291 (5504). P. 643–646.
26. Krauth-Siegel R.L., Comini M.A. (). Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2008. Vol. 1780 (11). P. 1236–48.
27. Outten C.E., Culotta V.C. Alternative start sites in the *Saccharomyces cerevisiae* GLR1 gene are responsible for mitochondrial and cytosolic isoforms of glutathione reductase. *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. P. 7785–7791.
28. Mbemba F., Houbion A., Raes M., Remacle J. Subcellular localization and modification with ageing of glutathione, glutathione peroxidase and glutathione reductase activities in human fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 1985. Vol. 838. P. 211–220.
29. Taniguchi M., Hara T., Honda H. Similarities between rat liver mitochondrial and cytosolic glutathione reductases and their apoenzyme accumulation in riboflavin deficiency. *Biochem. Int.* 1986. Vol. 13. P. 447–454.
30. Creissen G., Reynolds H., Xue, P Y. Mullineaux, Simultaneous targeting of pea glutathione reductase and of a bacterial fusion protein to chloroplasts and mitochondria in transgenic tobacco. *Plant J.* 1995. Vol. 8. P. 167–175.

31. Kehr S., Sturm N., Rahlfs S., Przyborski J.M., Becker K. Compartmentation of redox metabolism in malaria parasites, *PLoS Pathog.* 2010. Vol. 6. e1001242.
32. Kelner M.J., Montoya M.A. Structural organization of the human glutathione reductase gene: determination of correct cDNA sequence and identification of a mitochondrial leader sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. Vol. 269. P. 366–368.
33. Tamura T., McMicken H.W., Smith C.V., Hansen T.N. Mitochondrial targeting of glutathione reductase requires a leader sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. Vol. 222. P. 659–663.
34. Grisham, Reginald H. Garrett, Charles M. Biochemistry (3rd ed.). Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole. 2005. ISBN 0534490336.
35. Masella R., Di Benedetto R., Vari R., Filesi C., Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.* 2005. Vol. 16 (10). P. 577–586.
36. Dym O., Eisenberg D. Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Sci.* 2001. Vol. 10 (9). P. 1712–28.
37. Williams Jr., C. H. in Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes (Muller, F., ed.), 1995. pp. 121–211, CRC Press, Boca Raton
38. Freemerman A. J., Gallegos A. and Powis G. NF-kappaB transactivation is increased but not involved in the proliferative effects of thioredoxin overexpression in MCF-7 breast cancer cells. 1999. *Cancer Res.* Vol. 59. P. 4090–4094
39. Oblong J. E., Berggren M., Gasdaska P. Y., Powis G. J. Site-directed mutagenesis of active site cysteines in human thioredoxin produces competitive inhibitors of human thioredoxin reductase and elimination of mitogenic properties of thioredoxin. *Biol. Chem.* 1994. Vol. 269. P. 11714–11720
40. Baker A., Payne C. M., Briehl M. M., Powis G. Thioredoxin, a gene found overexpressed in human cancer, inhibits apoptosis in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 1997. Vol. 57. P. 5162–5167

41. Gasdaska J. R., Berggren M., Powis G. Cell growth stimulation by the redox protein thioredoxin occurs by a novel helper mechanism. *Cell Growth Differ.* 1995. Vol. 6. P. 1643–1650
42. Arner E. S. J., Nordberg J., Holmgren A. Efficient reduction of lipoamide and lipoic acid by mammalian thioredoxin reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. Vol. 225. P. 268–274
43. Bjornstedt M., Hamberg M., Kumar S., Xue J., Holmgren A. Human thioredoxin reductase directly reduces lipid hydroperoxides by NADPH and selenocystine strongly stimulates the reaction via catalytically generated selenols. *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 270. P. 11761–11764.
44. Andersson M., Holmgren A. and Spyrou G. NK-lysin, a disulfide-containing effector peptide of T-lymphocytes, is reduced and inactivated by human thioredoxin reductase. Implication for a protective mechanism against NK-lysin cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. P. 10116–10120
45. Holmgren A. Reduction of disulfides by thioredoxin. Exceptional reactivity of insulin and suggested functions of thioredoxin in mechanism of hormone action. *J. Biol. Chem.* 1979. Vol. 254. P. 9113–9119
46. May J. M., Mendiratta S., Hill K. E., Burk R. F. Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 22607–22610
47. May J. M., Cobb C. E., Mendiratta S., Hill K. E., Burk R. F. Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. P. 23039–23045
48. Casso D., Beach D. A mutation in a thioredoxin reductase homolog suppresses p53-induced growth inhibition in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genet.* 1996. Vol. 273. P. 252, 518–529
49. Gallegos A., Berggren M., Gasdaska J. R. and Powis G. Mechanisms of the regulation of thioredoxin reductase activity in cancer cells by the chemopreventive agent selenium. *Cancer Res.* 1997. Vol. 57. P. 4965–4970

50. Hofman E. R., Boyanapalli M., Lindner D. J., Weihua X., Hassel B. A., Jagus R., Gutierrez P. L., Kalvakolanu D. V. Thioredoxin reductase mediates cell death effects of the combination of beta interferon and retinoic acid. *Mol. Cell. Biol.* 1998. Vol. 18. P. 6493–6504
51. Lane D. P. P53 and human cancers. *Br. Med. Bull.* 1994. Vol. 50. P. 582–599.
52. Bischoff J. R., Casso D. and Beach D. Human p53 inhibits growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell. Biol.* 1999. Vol. 12. P. 1405–1411.
53. Chance B., Sies H. and Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 1979. Vol. 59. P. 527–605
54. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 1989. Vol. 58. P. 79–110
55. Zhivotovsky B., Orrenius S., Brustugun O. T. and Doskland S. O. Nature (London). 1998 391, 449–450
56. Yang J., Liu X., Bhalla K., Naekyung Kim C., Ibrado A., Cai J., Peng T., Jones D. P. and Wang X. Prevention of Apoptosis by Bcl-2: Release of Cytochrome c from Mitochondria Blocked. *Science.* 1997. Vol. 175. P. 1129–1132
57. Spector A., Yan G.-Z., Huang R.-R. C., McDermott M. J., Gascoyne P. R. C. and Pigiet V. The effect of H₂O₂ upon thioredoxin-enriched lens epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 1988. Vol. 263. P. 4984–4990
58. Das K. C., Guo X. and White C. W. Induction of thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in lungs of newborn primates by oxygen. *Am. J. Physiol.* 1999. Vol. 276. P. L530–L539
59. Guaiquil V. H., Farber C. M., Golde D. W. and Vera J. C. Efficient transport and accumulation of vitamin C in HL-60 cells depleted of glutathione. *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 9915–9921.
60. Buettner G. R. and Jurkiewicz B. A. Ascorbate free radical as a marker of oxidative stress: an EPR study. *Free Radical Biol. Med.* 1993. Vol. 14. P. 49–55
61. Liu S. Y., Stadtman T. C. Heparin-binding properties of selenium-containing thioredoxin reductase from HeLa cells and human lung adenocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997. Vol. 94. P. 6138–6141

62. Tamura T., Stadtman T. C. Mammalian thioredoxin reductases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996. Vol. 93. P. 1006–1011.
63. Oblong J. E., Gasdaska P. Y., Sherrill K. and Powis G. Purification of human thioredoxin reductase: properties and characterization by absorption and circular dichroism spectroscopy. *Biochemistry*. 1993. Vol. 32. P. 7271–7277.
64. Holmgren A. Bovine thioredoxin system. Purification of thioredoxin reductase from calf liver and thymus and studies of its function in disulfide reduction. *J. Biol. Chem.* 1977. Vol. 252. P. 4600–4606
65. Tsang M. L.-S., Weatherbee J. A. Thioredoxin, glutaredoxin, and thioredoxin reductase from cultured HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1981. Vol. 78. P. 7478–7482.
66. Chen C. C., McCall B. L. and Moore E. C. Purification of Thioredoxin Reductase from the Novikoff Rat Tumor. *Prep. Biochem.* 1977. Vol. 7. P. 165–177
67. Luthman M., Holmgren A. Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterization. *Biochemistry*. 1982. Vol. 21. P. 6628–6633.
68. Schallreuter K. U., Janner M., Mensing H., Breitbart E. W. and Berger J. Int. Thioredoxin reductase activity at the surface of human primary cutaneous melanomas and their surrounding skin. *J. Cancer*. 1991. Vol. 48. P. 15–19.
69. Fuchs J. Validity of the 'Bioassay' for Thioredoxin-Reductase Activity. *Arch. Dermatol.* 1988. Vol. 124. P. 849–850.
70. Schallreuter K. U., Pittelkow M. R. and Wood J. M. Free radical reduction by thioredoxin reductase at the surface of normal and vitiliginous human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 1986. Vol. 87. P. 728–732.
71. Schallreuter K. U., Wood J. M. Calcium regulates thioredoxin reductase in human metastatic melanoma. *Biochim. Biophys. Acta.* 1989. Vol. 997. P. 242–247
72. Oblong J. E., Powis G. A comment on the absence of calcium regulation of human thioredoxin reductase. *FEBS Lett.* 1993. Vol. 334. P. 1–2.
73. Hill K. E., McCollum G. W., Boeglin M. E., Burk R. F. Thioredoxin reductase activity is decreased by selenium deficiency. *Biochem Biophys Res Commun.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997. Vol. 234. P. 293–295.

74. Gromer S., Arscott L. D., Williams Jr., C. H., Schirmer R. H. and Becker K. Human placenta thioredoxin reductase. Isolation of the selenoenzyme, steady state kinetics, and inhibition by therapeutic gold compounds. *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. P. 20096–20101.
75. Smith A. D., Guidry C. A., Morris V. C. and Levander O. A. Aurothioglucose inhibits murine thioredoxin reductase activity in vivo. *J. Nutr.* 1999. Vol. 129. P. 194–198.
76. Aboagye-Kwarteng T., Smith K., Fairlamb A. H. Molecular characterization of the trypanothione reductase gene from *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei*: comparison with other flavoprotein disulphide oxidoreductases with respect to substrate specificity and catalytic mechanism. *Mol. Microbiol.* 1992. Vol. 6(21). P. 3089–3099.
77. Fairlamb A. H., Cerami A. Identification of a novel, thiol-containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1985. Vol. 14. P. 187-198.
78. Carnegie P. R. Structure and properties of a homologue of glutathione. *Biochem. J.* 1963. Vol. 89. P. 471-478
79. Tabor H., Tabor C. W. Isolation, characterization, and turnover of glutathionylspermidine from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 1975. Vol. 250. P. 2648-54
80. Shim H., Fairlamb A. H. Levels of polyamines, glutathione and glutathione-spermidine conjugates during growth of the insect trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. *J. Gen. Microbiol.* 1988. Vol.134. P. 807-817.
81. Newton G. L., Javor B. Y-Glutamylcysteine and thiosulfate are the major low-molecular-weight thiols in *Halobacteria*. *J. Bacteriol.* 1985. Vol. 161. P. 438-441.
82. Fahey R. C., Newton G. L. Occurrence of low molecular weight thiols in biological systems. *See Ref.* 1983. Vol. 130a. P. 251-260.
83. Fuchs J. A. Glutaredoxin. *See Ref.* 1989. Vol. 48, Part B. P. 551-570.
84. Holmgren A. Thioredoxin. *Annu. Rev. Biochem.* 1985. Vol. 54. P. 237-271.

85. Holmgren A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *1. Bioi. Chem.* 1989. Vol. 264. P.13963-13966.
86. Holmgren A., Branden C.-I., Jomvall H., Sjoberg, B. M., eds. Thioredoxin and Glutaredoxin Systems: Structure and Function. New York: Raven. 1986.
87. Mannervick B., Carlberg I., Larson K. Glutathione: general review of mechanism of action. *See Ref.* 1989. Vol. 48. Part A. P. 475-516.
88. Stubbe J. Ribonucleotide reductases: amazing and confusing. *J. Bioi. Chem.* 1990. Vol. 265. P. 5329-5332.
89. Inoue M. Glutathione; dynamic aspects of protein mixed disulfide formation. *See Ref.* 1989. Vol. 48. Part B. P. 613-644
90. Ziegler D. M. Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiolsdisulfides in metabolic regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 1985. Vol. 54. P. 305-329.
91. Fahey R. C., Newton G. L., Arrick B., Overdank-Bogart T., Aley S. B. Entamoeba histolytica: a eukaryote without glutathione metabolism. *Science.* 1984. Vol. 224. P. 70-72.
92. Griffith O. W., Meister A. Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985. Vol. 82. P. 4668-4672.
93. Kurosawa K., Hayashi N Sato N., Kamada T., Tagawa K. Transport of glutathione across the mitochondrial membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990. Vol. 167. P. 367-72.
94. Mlirtensson J., Lai J. C. K., Meister A. High-affinity transport of glutathione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. Vol. 87. P. 7185-7189.
95. Jain A., Martensson J., Stole E., Auld P. A. M., Meister A. Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. Vol. 88. P. 1913-1917.
96. Ross D. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents: mechanisms of free-radical induced toxicity and glutathione-dependent protection. *Pharmacol. Ther.* 1988. Vol. 37. P. 231-249.

97. Awad S., Henderson G. B., Cerami A., Held K. D. Effects of trypanothione on the biological activity of irradiated transforming DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* 1992. Vol. 62(4). P. 401-407.
98. Ketterer B., Meyer D. J., Clark A. O. Soluble glutathione transferase isozymes. *See Ref.* 1988. Vol. 182. p. 73-135.
99. Morrow C. S., Cowan K. H. Glutathione S-transferases and drug resistance. *Cancer Cells.* 1990. Vol. 2. P. 15-22.
100. Hayes J. D., Wolf C. R. Role of glutathione transferase in drug resistance. In *Glutathione Conjugation: Mechanisms and Biological Significance*, ed. H. Sies, B. Ketterer, London: Academic. 1988. p. 315-355.
101. Hinson J. A., Kadlubar F. F. Glutathione conjugation: mechanisms and biological significance. In *Glutathione and Glutathione Transferases in the Detoxification of Drug and Carcinogen Metabolites*, ed. H. Sies, B. Ketterer, London: Academic. 1988. p. 235-280.
102. Lamoureux G. L., Rusness D. G. The role of glutathione and glutathione-S-transferases in pesticide metabolism, selectivity, and mode of action in plants and insects. *See Ref.* 1989. Vol. 48. Part B. P. 153-196.
103. Lee T. C., Wei M. L., Chang W. J., in parasites: a review. *Acta Leiden.* Vol. 57. P. 107-114.
104. Waxman D. J. Glutathione S-transferases: role in alkylating agent resistance and possible target for modulation chemotherapy-a review. *Cancer Res.* 1990. Vol. 50. P. 6449-6454.
105. Huber P.W., Brandt K.G. Kinetic studies of the mechanism of pyridine nucleotide dependent reduction of yeast glutathione reductase. *Biochemistry.* 1980. Vol. 19. P. 4569-4575.
106. Bulger J.E., Brandt K.G. Yeast glutathione reductase. II. Interaction of oxidized and 2-electron reduced enzyme with reduced and oxidized nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *J. Biol. Chem.* 1971. Vol. 246. P. 5578-5587.

107. Karplus P.A., Schulz G.E. Substrate binding and catalysis by glutathione reductase as derived from refined enzyme: substrate crystal structures at 2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 1989. Vol. 210. P. 163–180.
108. Krauth-Siegel R.L., Arscott L.D., Schonleben-Janas A., Schirmer R.H., Williams C.H. Jr. Role of active site tyrosine residues in catalysis by human glutathione reductase. *Biochemistry.* 1998. Vol. 37. P. 13968–13977.
109. Berry A., Scrutton N.S., Perham R.N. Switching kinetic mechanism and putative proton donor by directed mutagenesis of glutathione reductase. *Biochemistry.* 1989. Vol. 28. P. 1264–1269.
110. Arscott L.D., Thorpe C., Williams C.H. Jr. Glutathione reductase from yeast. Differential reactivity of the nascent thiols in two-electron reduced enzyme and properties of a monoalkylated derivative. *Biochemistry.* 1981. Vol. 20. P. 1513–1520.
111. Rietveld P., Arscott L.D., Berry A., Scrutton N.S., Deonarain M.P., Perham R.N., Williams C.H. Jr. Reductive and oxidative half-reactions of glutathione reductase from *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 1994. Vol. 33 () 13888–13895.
112. Veine D.M., Arscott L.D., Williams C.H. Jr. Redox potentials for yeast, *Escherichia coli* and human glutathione reductase relative to the NAD⁺/NADH redox couple: enzyme forms active in catalysis. *Biochemistry.* 1998. Vol. 37. P. 15575–15582.
113. Wong K.K., Blanchard J.S. Human erythrocyte glutathione reductase: pH dependence of kinetic parameters. *Biochemistry.* 1989. Vol. 28. P. 3586–3590.
114. Wong K.K., Vanoni M.A., Blanchard J.S. Glutathione reductase: solvent equilibrium and kinetic isotope effects. *Biochemistry.* 1988. Vol. 27. P. 7091–7096.
115. Arscott L.D., Veine D.M., Williams C.H. Jr., Mixed disulfide with glutathione as an intermediate in the reaction catalyzed by glutathione reductase from yeast and as a major form of the enzyme in the cell. *Biochemistry.* 2000. Vol. 39. P. 4711–4721.

116. Deonarain M.P., Berry A., Scrutton N.S., Perham R.N. Alternative proton donors/acceptors in the catalytic mechanism of the glutathione reductase of *Escherichia coli*: the role of histidine-439 and tyrosine-99. *Biochemistry*. 1989. Vol. 28. P. 9602–9607.
117. Mieyal J.J., Gallogly M.M., Qanungo S., Sabens E.A., Shelton M.D. Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation, *Antioxid. Redox Signal*. 2008. Vol. 10. P. 1941–1988.
118. Lillig, C.H. Berndt C., Holmgren A. Glutaredoxin systems. *Biochim. Biophys. Acta*. 2008. Vol. 1780. P. 1304–1317.
119. Holmgren A., Aslund F. Glutaredoxin. *Methods Enzymol*. 1995. Vol. 252. P. 283–292.
120. Eckers E., Bien M., Stroobant V., Herrmann J.M., Deponte M. Biochemical characterization of dithiol glutaredoxin 8 from *Saccharomyces cerevisiae*: the catalytic redox mechanism redux. *Biochemistry*. 2009. Vol. 48. P. 1410–1423.
121. Toppo S., Flohe L., Ursini F., Vanin S., Maiorino M. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. *Biochim. Biophys. Acta*. 2009. Vol. 1790. P. 1486–1500.
122. Flohe L., Toppo S., Cozza G., Ursini F. A comparison of thiol peroxidase mechanisms. *Antioxid. Redox Signal*. 2011. Vol. 15. P. 763–780.
123. Brigelius-Flohé R., Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta*. 2013. Vol. 1830 (5). P. 3289–3303.
124. Nickel C., Rahlfs S., Deponte M., Koncarevic S., Becker K. Thioredoxin networks in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Antioxid. Redox Signal*. 2006. Vol. 8. P. 1227–1239.
125. Greetham D., Grant C.M. Antioxidant activity of the yeast mitochondrial one-Cys peroxiredoxin is dependent on thioredoxin reductase and glutathione in vivo. *Mol. Cell. Biol*. 2009. Vol. 29. P. 3229–3240.
126. Manevich Y., Feinstein S.I., Fisher A.B. Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with pi GST. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. Vol. 101. P. 3780–3785.

127. Pedrajas J.R., Padilla C.A., McDonagh B., Barcena J.A. Glutaredoxin participates in the reduction of peroxides by the mitochondrial 1-CYS peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antioxid. Redox Signal.* 2010. Vol. 13. P. 249–258.
128. Dietz K.J. Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. *Antioxid. Redox Signal.* 2011. Vol. 15. P. 1129–1159.
129. Collinson E.J., Wheeler G.L., Garrido E.O., Avery A.M., Avery S.V., Grant C.M. The yeast glutaredoxins are active as glutathione peroxidases. *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. P. 16712–16717.
130. Mannervik B., Danielson U.H. Glutathione transferases—structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 1988. Vol. 23. P. 283–337.
131. Salinas A.E., Wong M.G. Glutathione S-transferases—a review. *Curr. Med. Chem.* 1999. Vol. 6. P. 279–309.
132. Hiller N., Fritz-Wolf K., Deponte M., Wende W., Zimmermann H., Becker K. Plasmodium falciparum glutathione S-transferase—structural and mechanistic studies on ligand binding and enzyme inhibition. *Protein Sci.* 2006. Vol. 15. P. 281–289.
133. Fernando M.R., Lechner J.M., Lofgren S., Gladyshev V.N., Lou M.F. Mitochondrial thioltransferase (glutaredoxin 2) has GSH-dependent and thioredoxin reductase-dependent peroxidase activities in vitro and in lens epithelial cells. *FASEB J.* 2006. Vol. 20. P. 2645–2647.
134. Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005. Vol. 45. P. 51–88.
135. Bresell A., Weinander R., Lundqvist G., Raza H., Shimoji M., Sun T.H., Balk L., Wiklund R., Eriksson J., Jansson C., Persson B., Jakobsson P.J., Morgenstern R. Bioinformatic and enzymatic characterization of the MAPEG superfamily. *FEBS J.* 2005 Vol. 272. P. 1688–1703.
136. Martinez Molina D., Eshaghi S., Nordlund P. Catalysis within the lipid bilayer-structure and mechanism of the MAPEG family of integral membrane proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2008. Vol. 18. P. 442–449.

137. Pearson W.R. Phylogenies of glutathione transferase families. *Methods Enzymol.* 2005. Vol. 401. P. 186–204.
138. Buchholz K., Schirmer R.H., Eubel J.K., Akoachere M.B., Dandekar T., Becker K., Gromer S. Interactions of methylene blue with human disulfide reductases and their orthologues from *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008. Vol. 52 (1). P.183–191.
139. Müller T., Johann L., Jannack B., Brückner M., Lanfranchi D.A., Bauer H., Sanchez C., Yardley V., Deregnaucourt C., Schrével J., Lanzer M., Schirmer R.H., Davioud-Charvet E. (August). Glutathione reductase-catalyzed cascade of redox reactions to bioactivate potent antimalarial 1,4-naphthoquinones—a new strategy to combat malarial parasites. *J. Am. Chem. Soc.* 2011. Vol. 133(30). P.11557–11571.
140. Champe P.C., Harvey R.A., Ferrier D.R. *Biochemistry* (fourth ed.). Lippincott Williams and Wilkins. 2008
141. Ramos P.S., Oates J.C., Kamen D.L., Williams A.H., Gaffney P.M., Kelly J.A., Kaufman K.M., Kimberly R.P., Niewold T.B., Jacob C.O., Tsao B.P., Alarcón G.S., Brown E.E., Edberg J.C., Petri M.A., Ramsey-Goldman R., Reveille J.D., Vilá L.M., James J.A., Guthridge J.M., Merrill J.T., Boackle S.A., Freedman B.I., Scofield R.H., Stevens A.M., Vyse T.J., Criswell L.A., Moser K.L., Alarcón-Riquelme M.E., Langefeld C.D., Harley J.B., Gilkeson G.S. Variable association of reactive intermediate genes with systemic lupus erythematosus in populations with different African ancestry. *J. Rheumatol.* 2013. Vol. 40(6). P.842–849.
142. Gergely P., Grossman C., Niland B., Puskas F., Neupane H., Allam F., Banki K., Phillips P.E., Perl A. Mitochondrial hyperpolarization and ATP depletion in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2002. Vol. 46(1). P.175–190.
143. Yan J., Meng X., Wancket L.M., Lintner K., Nelin L.D., Chen B., Francis K.P., Smith C.V., Rogers L.K., Liu Y. Glutathione reductase facilitates host defense by sustaining phagocytic oxidative burst and promoting the development of neutrophil extracellular traps. *J. Immunol.* 2012. Vol. 188(5). P.2316–2327.

144. Kamerbeek N.M., Zwieten R., Boer M., Morren G., Vuil H., Bannink N., Lincke C., Dolman K.M., Becker K., Schirmer R.H., Gromer S., Roos D. Molecular basis of glutathione reductase deficiency in human blood cells. *Blood*. 2007. Vol. 109(8). P.3560–3566.
145. Roos D., Weening R.S., Voetman A.A., van Schaik M.L., Bot A.A., Meerhof L.J., Loos J.A. Protection of phagocytic leukocytes by endogenous glutathione: studies in a family with glutathione reductase deficiency. *Blood*. 1979. Vol. 53(5). P.851–866.
146. Warsy A.S., el-Hazmi M.A. Glutathione reductase deficiency in Saudi Arabia. *East. Mediterr. Health J.* 1999. Vol. 5(6). P.1208–1212.
147. Cappellini M.D., Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet*. 2008. Vol. 371(9606). P.64–74.
148. Smith I.K., Vierheller T.L., Thorne C.A. RAssay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal Biochem*. 1988. Vol. 175(2). P.408–413.
149. Marty L., Siala W., Schwarzländer M., Fricker M.D., Wirtz M., Sweetlove L.J., Meyer Y., Meyer A.J., Reichheld J.P., Hell R. The NADPH-dependent thioredoxin system constitutes a functional backup for cytosolic glutathione reductase in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009. Vol. 106(22). P.9109–14.
150. Sushko I., Novotarskyi S., Körner R. et al., Online chemical modeling environment (OCHEM): web platform for data storage, model development and publishing of chemical information. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 2011. Vol. 25. P.533–554.
151. Tetko I.V. Neural network studies. 4. Introduction to associative neural network. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 2002. Vol. 42. P.717-728.
152. DeepChem : веб-сайт. URL: <https://deepchem.io> (дата звернення: 14.11.2020).
153. Chen T., Guestrin C. XGBoost: A Scalable Tree Boosting System. : веб-сайт. URL: <https://arxiv.org/abs/1603.02754> (дата звернення: 14.11.2020).
154. Breiman L. Random forests. *Machine Learn.* 2001. Vol. 45. P.5-32.

155. Chemistry Development Kit : веб-сайт. URL: <https://cdk.github.io> (дата звернення: 14.11.2020).
156. Hall L.H., Kier L.B. Electrotopological State Indexes for Atom Types - a Novel Combination of Electronic, Topological, and Valence State Information. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 1995. Vol. 35. P.1039-45.
157. Tetko I.V., Tanchuk V. Yu. Application of associative neural networks for prediction of lipophilicity in ALOGPS 2.1 program. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 2002. Vol. 42. P.1136-45.
158. Whitley D. C., Ford M.G., Livingstone D.J. Unsupervised Forward Selection: A Method for Eliminating Redundant Variables. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 2000. Vol. 40. P.1160-68.
159. Tetko I.V., Sushko I., Pandey A.K., Zhu H., Tropsha A., Papa E. et al., Critical assessment of QSAR models of environmental toxicity against *Tetrahymena pyriformis*: focusing on applicability domain and overfitting by variable selection. *J. Chem. Inf. Model.* 2008. Vol. 48. P.1733-1746.
160. Brovarets V.S., Lobanov O.P., Drach B.S. Synthesis of 4-phosphorylated oxazoles and thiazoles. *Russ. Zh. Obshch. Khim.* 1983. Vol. 53. P.660-664.
161. Drach B.S., Sviridov E.P., Kisilenko A.A., Kirsanov A.V. Reaction of secondary amines with *N*-acyl-2,2-dichlorovinylamines and *N*-acyl-1-cyano-2,2-dichlorovinylamines. *Russ. Zh. Org. Khim.* 1973. Vol. 9. P.1818-1824.
162. Abdurakhmanova E.R., Pil'о S.G., Kondratyuk K.M., Golovchenko A.V., Brovarets V.S. 1,3-Oxazole derived cytisines. *Russ. J. Gen. Chem.* 2017. Vol. 87. P.244–251.
163. Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris J.C., Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 1966. Vol. 45. P.493-496.
164. UniProtKB - Q59NQ5 (Q59NQ5_CANAL) : веб-сайт. URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q59NQ5> (дата звернення: 14.11.2020).
165. UniProtKB - Q962Y6 (Q962Y6_SCHMA) : веб-сайт. URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q962Y6> (дата звернення: 14.11.2020).

166. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990. Vol. 215. P.403-410.
167. Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., Heer F.T., de Beer T.A.P., Rempfer C., Bordoli L., Lepore R., Schwede T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 2018. Vol. 46. P.W296-W303.
168. Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., Madden T.L. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics.* 2009. Vol. 10. P.421-430.
169. Steinegger M., Meier M., Mirdita M., Vöhringer H., Haunsberger S. J., Söding J. HH-suite3 for fast remote homology detection and deep protein annotation. *BMC Bioinformatics.* 2019. Vol. 20. P.473.
170. Benkert P., Biasini M., Schwede T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics.* 2011. Vol. 27. P.343-350.
171. Colovos C., Yeates T.O. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci.* 1993. Vol. 2. P.1511–1519.
172. Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S., Thornton J.M., PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. App. Cryst.* 1993. Vol. 26. P.283-291.
173. Sanner M.F., Python: A programming language for software integration and development. *J. Mol. Graph. Model.* 1999. Vol. 17. P.57-61.
174. Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Visualizer, v4.0.100.13345, San Diego: Dassault Systèmes, 2020.
175. ChemAxon MarvinSketch : веб-сайт. URL: <http://www.chemaxon.com> (дата звернення: 14.11.2020).
176. Hanwell M.D., Curtis D.E., Lonie D.C., Vandermeersch T., Zurek E., Hutchison G.R. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. Cheminform.* 2012. Vol. 4. P.17.

177. Halgren T.A., MMFF VI. MMFF94s option for energy minimization studies. *J. Comput. Chem.* 1999. Vol. 20. P. 720-29.
178. Trott O., Olson A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* 2010. Vol. 31. P.455-461.
179. Data Warrior : веб-сайт. URL: <http://www.openmolecules.org/datawarrior> (дата звернення: 14.11.2020).
180. Maras B., Angiolella L., Mignogna G., Vavala E., Macone A., Colone M. et al., Glutathione metabolism in *Candida albicans* resistant strains to fluconazole and micafungin. *PloS one.* 2014. Vol. 9. P. e98387.
181. ChEMBL1614161 : веб-сайт. URL: https://www.ebi.ac.uk/chembl/assay_report_card/ChEMBL1614161(дата звернення: 14.11.2020).
182. Angelucci F., Miele A.E., Boumis G., Dimastrogiovanni D., Brunori M., Bellelli A. Glutathione reductase and thioredoxin reductase at the crossroad: the structure of *Schistosoma mansoni* thioredoxin glutathione reductase. *Proteins.* 2008. Vol. 72. P.936-45.
183. 1,3-Oxazole derivatives of cytosine as potential inhibitors of glutathione reductase of *Candida* spp.: QSAR modeling, docking analysis and experimental study of new anti-*Candida* agents / Larysa O. Metelytsia, Maria M. Trush, Vasyl V. Kovalishyn, Diana M. Hodyna, Maryna V. Kachaeva, Volodymyr S. Brovarets, Stepan G. Pilyo, Volodymyr V. Sukhoveev, Serhii A. Tsyhankov, Volodymyr M. Blagodatnyi, Ivan V. Semenyuta. *Computational Biology and Chemistry.* – на стадії публікування
<https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2020.107407>