

Шифр «боротьба із вільними радикалами»

СТУДЕНТСЬКА НАУКОВА РОБОТА

на тему:

**«Ендоекологічні аспекти впливу антиоксиданту
мелатонину на вільні радикали»**

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	3
РОЗДІЛ 1 ФІЗИКО-ХІМІЧНІ І БІОХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЕНДОГЕННИХ АНТИОКСИДАНТІВ	5
1.1. Основні антиоксидантні властивості і функції мелатоніну	5
1.2. Методи і критерії оцінки антиоксидантної активності	8
РОЗДІЛ 2 МЕТОДИЧНИЙ АПАРАТ ДОСЛІДЖЕННЯ	11
2.1. Методика квантовохімічних досліджень	12
2.2. Методика проведення експерименту	13
РОЗДІЛ 3 КВАНТОВОХІМІЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ ВЗАЄМОДІЙ MLT З ВІЛЬНИМИ РАДИКАЛАМИ	16
3.1. Геометрична і електронна будови молекули мелатоніну	16
3.2. Вивчення взаємодії антиоксиданту з вільними радикалами	17
3.3. Моделювання впливу водного середовища на механізм взаємодії молекули MLT з $\bullet\text{OH}$ і $\bullet\text{OO}^-$	20
РОЗДІЛ 4 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИРАДИКАЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ MLT	22
4.1. Моделювання процесу електровідновлення активних форм кисню в присутності мелатоніну	22
ВИСНОВКИ	25
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	28
СПИСОК ВЛАСНИХ ПУБЛІКАЦІЙ АВТОРА	33

АНОТАЦІЯ

наукової роботи під шифром «боротьба із вільними радикалами»

Для зменшення негативного впливу вільних радикалів на біологічні об'єкти і живі організми широко застосовують ендогенні антиоксиданти, які беруть участь в системі захисту організмів від агресивного впливу вільних радикалів. Відсутність систематичних досліджень, особливо на молекулярному рівні, антирадикальної активності різних антиоксидантів при їх взаємодії з вільними радикалами в біосистемах обумовлюють не тільки наявність суперечливих оцінок в інтерпретації експериментально отриманих закономірностей, а й створюють труднощі у розвитку загальних уявлень про механізм взаємодії антиоксидантів з вільними радикалами і цілеспрямованого підходу до управління цими процесами, що має практичне значення. Це робить задачу вивчення ефективності застосування різних антиоксидантів особливо актуальною.

Дослідження взаємодії антиоксидантів з вільними радикалами вимагає вивчення впливу великої кількості різноманітних взаємопов'язаних процесів, стабілізація яких в умовах експериментів досить проблематична. Разом з тим в даний час широко застосовується моделювання різних фізико-хімічних процесів на молекулярному рівні методами квантової хімії з подальшим аналізом результатів розрахунків з прив'язкою до експерименту. Тому представляється актуальним вивчення ефективності ендогенних антиоксидантів шляхом моделювання механізму їх взаємодії з вільними радикалами (гідроксил-радикалом, супероксид-аніон-радикалом) методами квантової хімії, а також із застосуванням експериментальних методів, наприклад, електрохімічних, що, на наш погляд, дає можливість на молекулярному рівні не тільки отримати обґрунтування позитивного ефекту використання антиоксидантів, але і встановити потенційну значущість застосування цих речовин в якості лікарських засобів.

Мета роботи: дослідження антирадикальної активності ендогенного антиоксиданту мелатоніну ($C_{13}H_{16}N_2O_2$) шляхом моделювання механізму його взаємодії з гідроксил-радикалом ($\bullet OH$) і супероксид-аніон-радикалом ($\bullet OO^-$).

Мета роботи обумовила виконання наступних завдань:

- встановити рівноважну просторову будову і електронну структуру молекули мелатоніну (MLT);
- визначити методами квантової хімії найбільш активні реакційні центри MLT, які обумовлюють їх антирадикальну активність;
- для підтвердження отриманих теоретичних результатів провести експериментальне дослідження взаємодії MLT з гідроксил радикалом ($\bullet OH$) і супероксид-аніон-радикалом ($\bullet OO^-$) шляхом електрохімічного генерування активних форм кисню (АФК), до яких відносяться $\bullet OH$ і $\bullet OO^-$;

Об'єкт дослідження: молекула гормону мелатоніну і вільні радикали ($\bullet OH$ і $\bullet OO^-$).

Предмет дослідження: механізм взаємодії в системах $MLT \cdots \bullet OH$ і $MLT \cdots \bullet OO^-$, який визначає антирадикальну дію молекули MLT.

Методи дослідження

Розрахунки виконувалися за допомогою різних варіантів програмного модуля GAMESS і програмного модуля Firefly 8 неемпіричних методом квантової хімії в базисі 6-31G **. Електрохімічні дослідження проводились методом диференціальної імпульсної вольтамперометрії.

Структура та обсяг роботи. Наукову роботу викладено на 27 сторінках (без врахування літератури) і складається із анотації, чотирьох розділів, висновків та списку процитованої літератури, який включає 57 посилань, а також містить 3 таблиці та 11 рисунків.

Ключові слова: вільні радикали, мелатонін, GAMESS.

РОЗДІЛ 1.

ФІЗИКО-ХІМІЧНІ І БІОХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЕНДОГЕННИХ АНТИОКСИДАНТІВ

Сполуки, здатні зв'язувати неспарені електрони у вільних радикалах з утворенням менш активних або зовсім неактивних речовин, називають антиоксидантами. До найбільш відомих антиоксидантів відносять: вітаміни А, С, В, Е і ін.; мікроелементи: селен, марганець, мідь і ін., які не синтезуються в організмі людини і не можуть на основі саморегуляції підтримувати нормальний перебіг біохімічних процесів при розвитку різних патологій [1]. На противагу екзогенних антиоксидантів ендogenous синтезуються в організмі людини і переносяться в місця дії гуморальної системою.

1.1. Основні антиоксидантні властивості і функції мелатоніну

В останні роки з'явилася низка повідомлень [2- 4] про те, що найбільш сильним природним інгібітором вільнорадикальних процесів в організмі може бути мелатонін - індольний метаболіт амінокислоти триптофану, що продукується головним чином епіфізом [2, 5]. У досліджах *in vitro* MLT в $5 \div 14$ разів ефективніше зменшував утворення гідроксильного радикала, ніж інші відомі інгібітори, такі як глутатіон. Крім того, мелатонін пригнічує утворення сполук канцерогенів [6, 7]. В експериментах на тваринах було показано, що мелатонін, як і деякі інші природні або синтетичні антиоксиданти, збільшує тривалість їх життя і гальмує розвиток новоутворень [8, 9], він у 2 рази активніше а-токоферолу, в 5 разів активніше глутатіону при взаємодії з гідроксил радикалом [2, 5, 10, 11], і в 500 разів активніше кращих синтезованих антиоксидантів, які використовують у боротьбі з радіацією.

У роботі А. Ю. Беспячих [12] розглянуті основні функції антиоксидантної дії MLT. В даний час твердо встановлено, що пінеальна залоза не є винятковим органом, здатним продукувати мелатонін [13-16]. Численними дослідженнями показано, що екстрапінеальний MLT широко поширений в організмі людини і тварин. Клітини, які продукують мелатонін, виявлені в шлунково-кишковому тракті, дихальних шляхах, підшлунковій залозі,

надниркових залоз, щитовидній залозі, тимусі, мозочку, сечостатевої системі, плаценті та інших органах. Більш того, показана активна продукція MLT в неендокринних клітинах людини [12, 17, 18]. Таким чином, поширення мелатоніну в організмі відображає його ключову роль як міжклітинного нейроендокринного регулятора і координатора багатьох складних і взаємозалежних біологічних процесів.

Мелатонін є гормоном широкого спектру дії в організмі людини - він бере участь в регуляції імунної та ендокринної систем, модулює диференціювання і апоптоз клітин, бере участь в регуляції зорової функції, знижує рівень холестерину, впливає на процеси адаптації при зміні часових поясів, регулює періодичність сну, уповільнює процеси старіння, підвищує опірність організму до стресів і високих фізичних навантажень [2, 4, 18], сприяє нормалізації кров'яного тиску [19] і пригнічує дію вільних радикалів [4, 20-22].

В роботі [12] наведені тільки припущення про можливі механізми антиоксидантної дії MLT, але не наводяться докази. Так, найбільш ймовірні механізми безпосереднього «гасіння» мелатоніном вільних радикалів:

- передача електрона від молекули мелатоніну до активного радикалу з утворенням катіон-радикалу MLT і аніону й подальшим транспортуванням протона від катіон-радикала до аніону з утворенням мелатонін-радикала і R-H;
- пряме перенесення атома водню між мелатоніном і вільним радикалом.

Ці механізми добре узгоджуються із загальними фізико-хімічними та біологічними уявленнями з точки зору протікання окислювально-відновної реакції. Однак деякі їх аспекти є дискусійними.

Хімічна структура мелатоніну дозволяє йому взаємодіяти з активними формами кисню (АФК), даючи в результаті нетоксичну сполуку, яка метаболізується в організмі - N-1-ацетил-N5-форміл-5-метоксікінурамін. Деякі дослідники [23-26] також підтвердили здатність мелатоніну нейтралізувати гідроксил-радикал. У фармакологічних концентраціях мелатонін пригнічує фотодинамічне пошкодження нейронів. Під дією лазерного опромінення в

організмі людини генерується ряд вільних радикалів, зокрема синглетний кисень, MLT здатний нейтралізувати їх і це використовується при фотодинамічній терапії пухлин [27-30].

У багатьох випадках *in vivo* екзогенний мелатонін скорочує молекулярні і фізіологічні пошкодження, які супроводжують появу NO_3^- . Показано, що мелатонін надає антирадикальну дію. Ефект заснований на поглинанні мелатоніном NO_3^- , що призводить до зменшення кількості $\text{NO}^\bullet$ [27, 28].

В [31] представлені результати досліджень із застосуванням мелатоніну, які свідчать про його участь в нейтралізації вільних радикалів в фізіологічних умовах за рахунок активації або інгібуванні антиоксидантних і прооксидантних ферментів. По-перше, в радикальних реакціях утворюються нові продукти, деякі з них також мають захисні властивості [2, 10]. По-друге, мелатонін може бути проміжною ланкою в ланцюзі передачі електронів через утворення мелатонін-радикала [31-33]. Передбачається, що це є основою для квазікаталітичного процесу, для якого потрібні дуже малі кількості мелатоніну. Безумовно, заслуговує на увагу концепція, обговорювана на основі зниження утворення вільних радикалів при взаємодії з компонентами дихального ланцюга мітохондрій [6, 12, 34].

Мелатонін також пригнічує прооксидантні ферменти [6, 35], при цьому в експериментах спостерігається зменшення утворення оксиду азоту .

Мелатонін підсилює дію аскорбату. Ці результати вказують на існування множинних взаємодій за допомогою регенерації антиоксидантів і можуть свідчити про існування квазікаталітичних реакцій електронного транспорту між різними антиоксидантами [4, 12, 36]. Тому, оцінюючи вище наведене, можна зробити висновок, про те, що антиоксидантний захист мелатоніну є комплексним явищем, проте механізм антирадикальної активності його детально не вивчений.

Нам не відомі роботи, в яких вивчався фізико-хімічними методами механізм взаємодії молекул мелатоніну з вільними радикалами, і тільки групою

авторів S. Gunasekaran, R. Arun Balaji і ін. [37] було експериментально і теоретично досліджено спектроскопічні властивості молекул мелатоніну. Однак отримані результати не могли пояснити антирадикальну активність мелатоніну по відношенню до вільних радикалів.

Так як механізм інгібування вільних радикалів молекулами мелатоніну не пропонується у всіх роботах, які нам відомі, за винятком однієї (С.О. Бачуріна [38]), де була розглянута лише феноменологічна схема взаємодії мелатоніну з активними формами кисню в організмі людини, вважаємо за доцільне вивчення механізму взаємодії MLT з вільними радикалами методами квантової хімії, що, на наш погляд, дасть можливість на нанорівні отримати як обґрунтування позитивного ефекту застосування мелатоніну, так і встановити потенційну значимість в управлінні процесами застосування цього гормону в якості лікарського засобу.

1.2. Методи і критерії оцінки антиоксидантної активності

На сьогоднішній день не існує єдиного показника антиоксидантної активності речовин. Тому необхідність введення нових методів і критеріїв, які зможуть забезпечити надійні результати визначення антиоксидантної активності продукції, є актуальним завданням.

Методи дослідження загальної антиоксидантної активності розрізняються за типом джерела окислення, окислюваного з'єднання і способу вимірювання окисленого з'єднання. Ці методи дають широкий набір результатів, які не можна використовувати окремо.

За способами реєстрації прояву антиоксидантної активності можна розділити методи на волюмометричні [39], фотометричні [40], хемілюмінесцентні [41], флуоресцентні [42], електрохімічні [43] і ряд більш специфічних [44]. Зазвичай використовується протікаюча по радикальному механізму модельна реакція (найчастіше - окислення) будь-якого з'єднання з абонентом, за впливом на перебіг якої і оцінюється антиоксидантна активність індивідуального з'єднання чи суміші. Кінетика контролюється або по

поглинанню кисню способами вимірювання об'єму [39], або по зміні характеристик реакційної суміші: зміни поглинання електромагнітного випромінювання, флуоресценції, люмінесценції і ін. У ряді випадків створюються умови для генерування вільних радикалів з постійною швидкістю: з додаванням ініціаторів або з хімічною генерацією радикалів в результаті протікання контрольованого хімічного процесу (Фентона) [43].

Електрохімічні методи оцінки антиоксидантної активності, які найбільш тонко реагують на зміни характеристик механізму взаємодії «Антиоксидант-Вільний радикал», можуть бути розділені на дві групи. У частині методів використовується тільки електрохімічна реєстрація будь-якого з'єднання, зміна концентрації якого опосередковано пов'язана з протіканням процесів окислення [43, 45]. Інша група методів [44, 46] заснована на безпосередньому вимірі окисно-відновних потенціалів, які на думку авторів, в цілому корелюють з антиоксидантною активністю і можуть бути використані для її оцінки.

На підставі аналізу існуючих оцінок антиоксидантної активності об'єктів можна виділити такі найбільш значущі критерії:

1. Міжнародний критерій *ORAC* (Oxygen radicals absorbance capacity - здатність поглинати кисневі радикали), віднесений до стандартного антиоксиданту.

2. Біохімічний критерій IC_{50} , що відображає концентрацію антиоксиданту при інгібуванні модельного сигналу на 50%. Розмірність: моль/л або мг/л. За результатами визначень будують графік залежності ступеня інгібування модельного сигналу від концентрації доданого антиоксиданту. Цей критерій трактовано як «біохімічний», в зв'язку з його широким використанням в біохімічних дослідженнях.

3. Визначення антиоксидантної активності зразка за градувальним графіком. В даному випадку необхідний вибір стандартного антиоксиданту, за яким будується градуований графік зміни модельного сигналу від відомої концентрації антиоксиданту в розчині. Далі для досліджуваного зразка визначається величина модельного сигналу і по градувальному графіку

визначається показник антиоксидантної активності в перерахунку на стандартний антиоксидант. Розмірність даного критерію виражена в одиницях концентрації стандартного антиоксиданту (моль/л або мг/л).

4. Ємнісний критерій відображає ступінь зміни струму EB O_2 в залежності від концентрації антиоксиданту в розчині [47].

Розмірність: мл/г. При дослідженні фізико-хімічних закономірностей процесу EB O_2 в присутності антиоксидантів в умовах стаціонарної дифузії при малих значеннях швидкості розгортки потенціалу активність антиоксидантів можна визначати, використовуючи відносну зміну струму електровідновлення кисню в залежності від концентрації антиоксиданту в розчині.

Цей критерій має емпіричний характер, і його зручно використовувати для дослідження антиоксидантних властивостей індивідуальних речовин в однаковому концентраційному діапазоні.

5. Кінетичний критерій відображає кількість кисню і активних кисневих радикалів, що прореагували з антиоксидантом (або сумарним вмістом антиоксидантів) за хвилину часу. Розмірність: мкмоль/л хв.

Однак дані критерії оцінки антиоксидантної активності об'єктів носять емпіричний характер і не можуть дати пояснення механізму взаємодії молекул антиоксидантів з вільними радикалами на нанорівні.

Проблема вивчення механізму взаємодії антиоксидантів з вільними радикалами не може бути однозначно вирішена в рамках суто експериментальних досліджень. У зв'язку з цим великого значення набувають методи квантової хімії, що дозволяють на електронному рівні обґрунтувати експериментально виявлені закономірності. Квантова хімія в даний час сформувалася як наука, яка, базуючись на численних рішеннях рівнянь квантової механіки, дозволяє отримувати інформацію як про будову молекулярних систем, так і про зміну енергетичних, геометричних і електронних параметрів цих систем внаслідок впливу різних чинників. Особливого значення набувають результати отримані теоретично, які або неможливо, або досить трудно- і наукоємно отримати експериментально.

Наприклад, теоретичні розрахунки на даний час є єдиним способом прямого вивчення короткоживучих частинок і активованих комплексів, які не підлягають експериментальній реєстрації.

Таким чином, тільки шляхом зіставлення теоретичних результатів, отриманих в квантовохімічних розрахунках, з експериментальними даними можна досягти вирішення тієї чи іншої поставленої задачі.

Для кращого розуміння деталей, проведених в роботі квантовохімічних розрахунків, розглянемо основи методів неемпіричних обчислень з використанням апроксимації молекулярних орбіталей (МО) лінійної комбінацією атомних орбіталей (ЛКАО) методом самоузгодженого поля (СУП).

РОЗДІЛ 2

МЕТОДИЧНИЙ АПАРАТ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Методика квантово-хімічних досліджень

Електронна будова і властивості молекул і молекулярних систем в будь-яких їх можливих стаціонарних станах можуть бути на певному чисельному рівні визначені шляхом вирішення стаціонарного рівняння Шредінгера. Це рівняння зазвичай вирішують в адіабатичному наближенні, тобто в припущенні, що ядерну і електронну хвильові функції можна розділити і вирішувати рівняння для руху ядер і електронів окремо. У цьому наближенні рівняння Шредінгера для електронної хвильової функції записується в такий спосіб:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi, \quad (2.1)$$

де $\hat{H}$ - гамільтоніан системи, тобто сума операторів кінетичної і потенційної енергій; $\Psi = \Psi(x_1, x_2, \dots, x_n)$ - хвильова функція для системи з n частинок, яка залежить від їх розташування в просторі і спінів; E - повна електронна енергія. Однак точно вирішити це рівняння вдається лише в разі одноелектронних систем. Тому в квантовохімічних розрахунках

використовуються наближені методи. Серед них найбільшого поширення набув метод Хартрі-Фока [48,49], або метод СУП.

У неемпіричних методах все матричні елементи взаємодії електронів і атомних ядер і електронів між собою обчислюються за допомогою аналітичного розрахунку необхідних інтегралів в деякому базисі АО. Найбільш точно розподіл електронної щільності в атомах можна передати за допомогою слейтеровських АО [49,50], тобто функцій типу $\exp(-\alpha r)$, $r \exp(-\alpha r)$, $x \exp(-\alpha r)$, $y \exp(-\alpha r)$ і т.д. Однак зі слейтеровськими орбіталями досить складно розрахувати інтеграли, що входять в фокіан для молекул. Тому в якості базисних АО зазвичай беруть гаусові функції - для *s-орбіталей*: $\exp(-\alpha r^2)$; для *p-орбіталей*: $x \exp(-\alpha r^2)$, $y \exp(-\alpha r^2)$, $z \exp(-\alpha r^2)$; для *d-орбіталей*: $x^2 \exp(-\alpha r^2)$, $y^2 \exp(-\alpha r^2)$, $z^2 \exp(-\alpha r^2)$, $xy \exp(-\alpha r^2)$, $xz \exp(-\alpha r^2)$, $yz \exp(-\alpha r^2)$. Це так звані примітивні гаусові функції [49]. За ними відносно легко обчислювати матричні елементи, але, якщо їх недостатньо, вони погано відображають розподіл електронної щільності в атомах і молекулах. У зв'язку з цим гаусових орбіталей доводиться брати набагато більше, ніж слейтеровських. Зазвичай використовують так звані збалансовані базиси, в яких кожна базисна орбіталь є лінійною комбінацією з декількох примітивних гаусових функцій [51].

В даний час для вивчення будови і реакційної здатності молекулярних систем найбільш широко використовуються базиси, запропоновані Поплом: мінімальний базис ОСТ-3ГФ, валентно-розщеплені базиси 3-21ГФ, 4-31ГФ, 6-31ГФ, валентно-розщеплені базиси, що включають поляризаційні орбіталі 6-31ГФ * і 6-31ГФ **, валентно-розщеплені базиси з дифузними *s*- і *p*-орбіталями 3-21 + ГФ та 4-31 + ГФ і т.п. [52].

Оскільки для ряду складних багатоатомних сполук доводиться шукати компроміс між точністю розрахунків, з одного боку, та реальними витратами машинного часу - з іншого, то часто обмежуються базисами середнього і навіть мінімального розмірів. Досить прийнятними в такому відношенні є валентно-розщеплені базиси, які, наприклад, за даними [53], дають хорошу якісну кореляцію з експериментом.

2.2. Методика проведення експерименту .

Дослідження каталітичного окислення природних антиоксидантів *in vivo* пов'язане з впливом великої кількості різноманітних взаємопов'язаних процесів, стабілізація яких в умовах експериментів на тваринах є досить проблематичною.

Однією з реальних можливостей для дослідження активних інтермедіатів відновлення кисню може бути використання методу імпульсної вольтамперометрії.

Використовуючи метод імпульсної вольтамперометрії, вдається дослідити процес відновлення кисню поетапно і реєструвати короткоживучі активні інтермедіати його відновлення. Велика швидкість поляризації в умовах осцилополярографії призводить до того, що продукти електродної реакції не встигають виводитися з приелектродному шарі і можуть вступати в електродні реакції при подальшій поляризації електрода. Це дозволяє реєструвати короткоживучі радикальні продукти відновлення кисню, які мають нетривалий час життя.

Вольтамперні дослідження процесу відновлення кисню на твердих електродах проводили за допомогою полярографа ПУ-1, сполученого з комп'ютером. При визначенні перевага віддавалася диференціальним вольтамперним характеристикам $di/dE - E$, оскільки на них в меншій мірі впливають ємність електрода і опір електроліту. Концентрація кисню, як правило, відповідає рівноважній концентрації при атмосферному тиску і температурі 20°C. Контроль концентрації кисню здійснюється за допомогою оксиметру GMH 3610. Дослідження проводилися в різних водних середовищах за триелектродною схемою Me/Pt/Ag, AgCl. Електрохімічне відновлення активних форм кисню в 0,1 моль/л водному розчині хлористого натрію проводили на твердих електродах з міді, які були обрані виходячи з їх життєвої важливості в біологічних системах. Електроди, виготовлені з металів високого ступеня чистоти, запресовуються в тефлонову обойму. Робочою поверхнею

служив торець діаметром 3 мм. Перед вимірами робочу поверхню електрода ретельно зачищали, промивали дистильованою водою, висушували фільтрувальним папером [53].

Багаторазові повторні зйомки вольтамперних кривих показали, що на ретельно зачищеній поверхні робочого електрода результати досить добре відтворювані. Запис диференціальних вольтамперних кривих, як правило, проводили на третьому циклі сканування потенціалу. Як електрод порівняння використовували хлор-срібний електрод. Схема електрохімічної комірки представлена на рис.1.

Здатність антиоксидантів до адсорбції на негативно зарядженої поверхні електрода вивчали методом спектроскопії електричного імпедансу за допомогою універсальної системи ACM Instruments Auto за 3-електродною схемою на фоні 0,1 М NaCl.

Вимірювання проводили за 3-електродною схемою на фоні 0,1 М NaCl. В якості робочого використовували торцевий мідний електрод діаметром 3 мм, в якості допоміжного - платинову пластину.

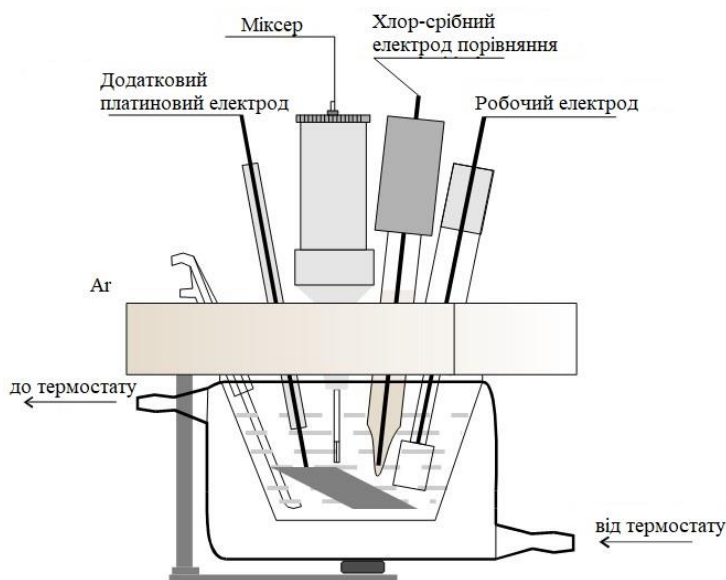


Рис. 1. Схема електрохімічної комірки для досліджень на твердих електродах.

Дослідження проводилися як у відсутності кисню, так і при вільному доступі атмосферного кисню в осередку, оскільки біологічно активні речовини здатні взаємодіяти з продуктами відновлення останнього, що може впливати на

показники адсорбції. У першому випадку для видалення кисню досліджуваний розчин в осередку продували аргоном протягом 30 хв. перед кожним виміром, а в процесі вимірювання проводилося продування аргоном для запобігання потрапляння атмосферного кисню в клітинку. Для вимірювань в присутності кисню його концентрація відповідала рівноважної при атмосферному тиску і температурі 25°C ($2,8 \cdot 10^{-4}$ моль/л). Розчини досліджуваних речовин готували безпосередньо перед експериментом на основі 0,1 NaCl з реактивів, чистота яких відповідає кваліфікації ос.ч. Величину ступеня заповнення електрода Θ розраховували за класичною моделлю паралельних конденсаторів.

РОЗДІЛ 3.

КВАНТОВОХІМІЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ ВЗАЄМОДІЙ MLT З ВІЛЬНИМИ РАДИКАЛАМИ

Існуюча в даний час інформація про значущість антирадикальної активності ендогенних антиоксидантів і можливості їх застосування часто носить лише описовий характер і відповідає констатації факту позитивного впливу у встановленні і підтримці процесів рівноваги, генерації, а особливо, нейтралізації вільних радикалів. Разом з тим існуючі методи вивчення впливу антиоксидантів, які зменшують негативний вплив вільних радикалів на організм людини носять феноменологічний характер, так як для цього залучаються лише результати аналізу статистичних даних їх лікувального застосування, які не дозволяють пояснити і зрозуміти природу біохімічних процесів при взаємодії вільних радикалів з антиоксидантами.

Тому видається актуальним застосування сучасних високоточних неемпіричних квантовохімічних розрахунків для дослідження механізму взаємодії мелатоніну з гідроксил-радикалом і супероксид-аніон-радикалом, що дасть можливість на нанорівні отримати обґрунтування позитивного ефекту застосування цих антиоксидантів в якості лікарських засобів.

3.1. Геометрична та електронна будова молекули мелатоніну

До проведення досліджень нам не були відомі роботи, в яких було б встановлено електронну і геометричну будову молекули мелатоніну. А в біохімічних реакціях [37] наводиться лише запис її структурної формули. Тому є інтерес встановити, перш за все, геометричну і електронну будову молекули мелатоніну, що дасть можливість в майбутньому на електронному рівні отримати обґрунтування характеру взаємодії мелатоніну з вільними радикалами.

Вивчення проводили шляхом квантовохімічних розрахунків із застосуванням пакета програм GAMESS в базисі 6-31G **. У процесі обчислення використовували градієнтну техніку повної автоматичної оптимізації геометрії об'єктів з одночасною зміною довжин зв'язків і кутів до значення максимальної компоненти градієнта 0,001.

Таким чином на підставі отриманих розрахунків геометричних параметрів молекули мелатоніну була побудована просторова модель молекули мелатоніну (рис. 2) [54, 55].

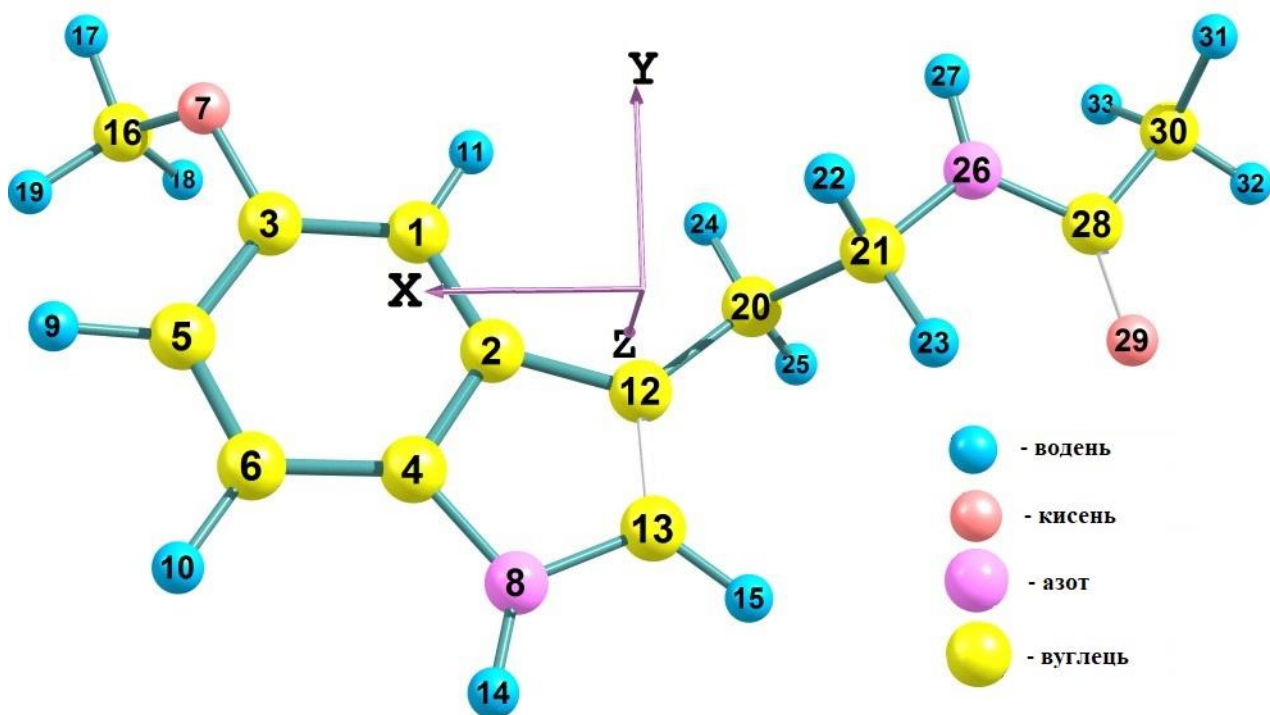


Рис.2. Рівноважна просторова будова молекули мелатоніну

3.2. Вивчення взаємодії антиоксиданту з вільними радикалами

Для вивчення антирадикальних властивостей на мікроскопічному рівні молекул мелатоніну і глутатіону при взаємодії з вільними радикалами застосовували оптимізовану геометрію молекули MLT. З числа вільних радикалів об'єктами вивчення були взяті $\bullet\text{OH}$ і $\bullet\text{OO}^-$. Для пошуку напрямків атаки молекул мелатоніну і глутатіону вільними радикалами були виконані неемпіричні квантовохімічні розрахунки розподілу електростатичного потенціалу в радикалах $\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{OO}^-$ (рис.3) і в молекулах антиоксидантів (рис.3).

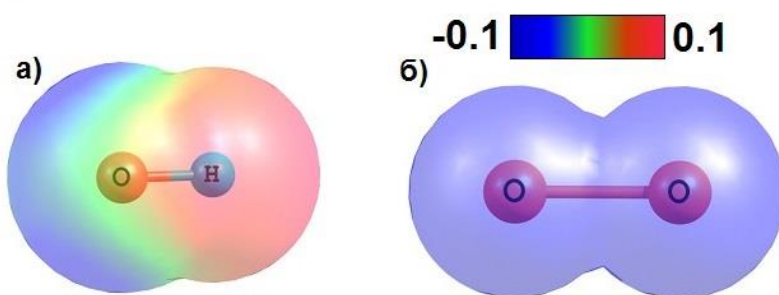


Рис. 3. Розподіл молекулярного електростатичного потенціалу:

а) $\bullet\text{OH}$; б) $\bullet\text{OO}^-$.

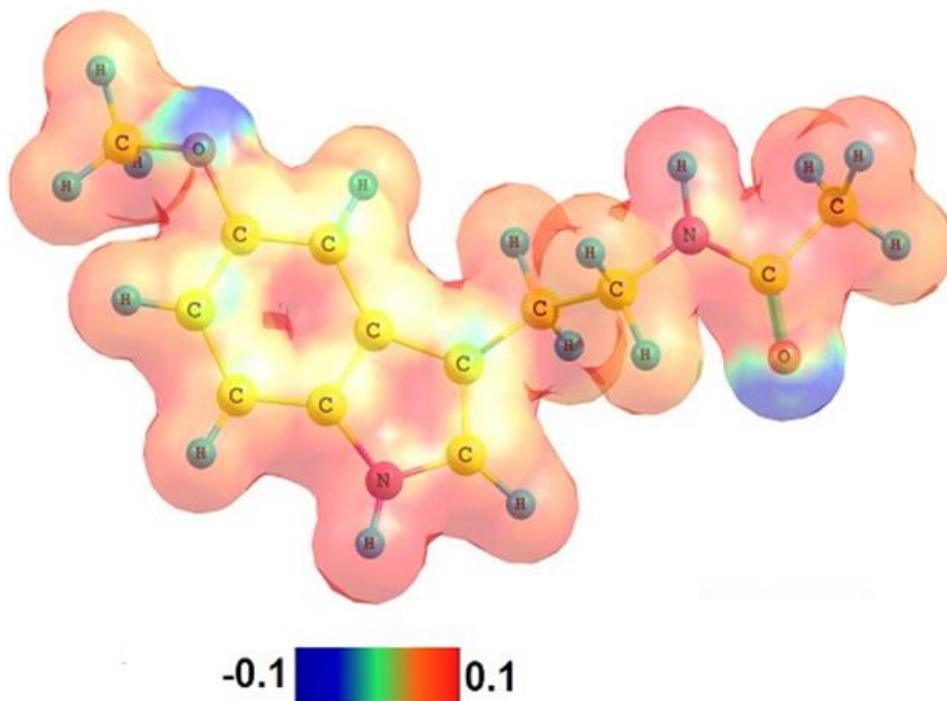


Рис.4. Розподіл молекулярного електростатичного потенціалу молекули мелатоніну

На рис.3 показано, що в гідроксил-радикалі мінімум молекулярного електростатичного потенціалу (МЕСП) локалізований поруч з атомом кисню, а в супероксид-аніон-радикала має місце ізотропний розподіл МЕСП. Вільні радикали, маючи один неспарений електрон, будуть «атакувати» місця з позитивними значеннями електростатичного потенціалу в молекулах антиоксидантів. Області позитивних значень МЕСП в молекулі мелатоніну (рис.4) локалізовані поруч з атомами водню, які і будуть виступати «місцями атаки» $\bullet\text{OH}$ і $\bullet\text{OO}^-$.

Для попереднього визначення структури взаємодій $\text{MLT} \cdots \bullet\text{OH}[\bullet\text{OO}^-]$ пошуку мінімумів повної енергії, які відповідають максимумам енергії взаємодії вільних радикалів з молекулою мелатоніну, було проведено сканування поверхні потенційної енергії (ППЕ) взаємодії в околах «місць атаки» молекули MLT радикалами $\bullet\text{OH}$ і $\bullet\text{OO}^-$. Отримані результати показали наявність для молекули мелатоніну 16 мінімумів повної енергії при взаємодії з вільними радикалами (рис. 5) із яких для подальшого вивчення нами було вибрано 5 найбільш глибоких мінімумів для кожного з комплексів.

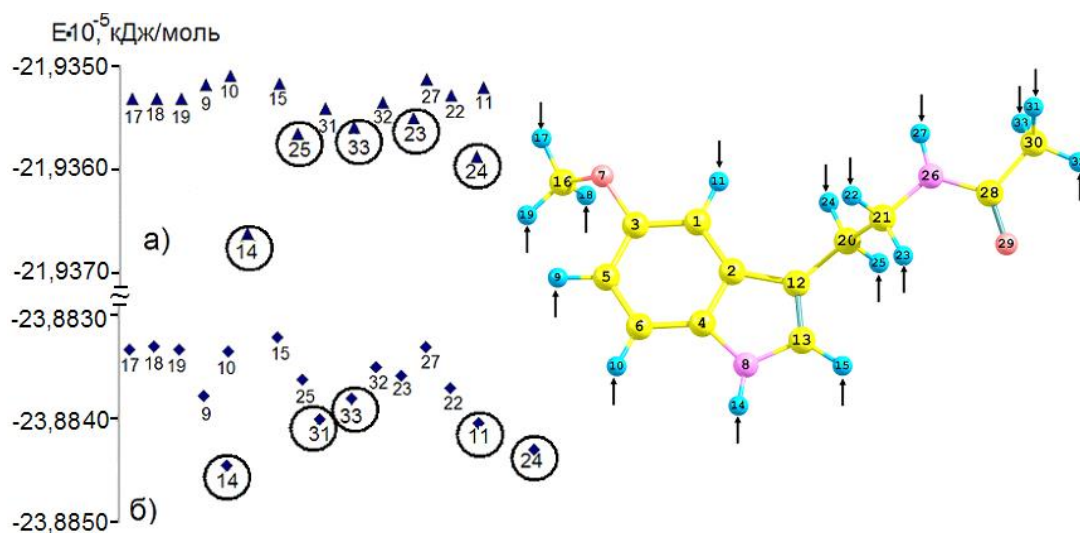


Рис. 5. Мінімуми повної енергії взаємодії (E) у комплексах $\text{MLT} \cdots \bullet\text{OH}[\bullet\text{OO}^-]$ при атаці молекули MLT вільними радикалами: а) $\bullet\text{OH}$; б) $\bullet\text{OO}^-$ (виділені 5 найбільш глибокі мінімуми – $\bigcirc$).

Взаємодія одного гідроксил-радикала з молекулою MLT в 5 найглибших мінімумах повної енергії молекули мелатоніну призводить до переносу заряду з молекули антиоксиданту на вільний радикал, що веде до збільшення величини

зарядів на атомах водню в молекулі MLT в $1,2 \div 1,7$ раз. Як наслідок, зменшуються відповідні величини порядків зв'язку. Це призводить до збільшення довжин зв'язку між атомами водню і довколишніх до нього атомом в молекулі MLT в $1,3 \div 3$ раз, вказуючи тим самим на ймовірність відриву атомів водню від молекули мелатоніну і приєднання їх до гідроксил-радикалу з утворенням молекули води (рис.6).

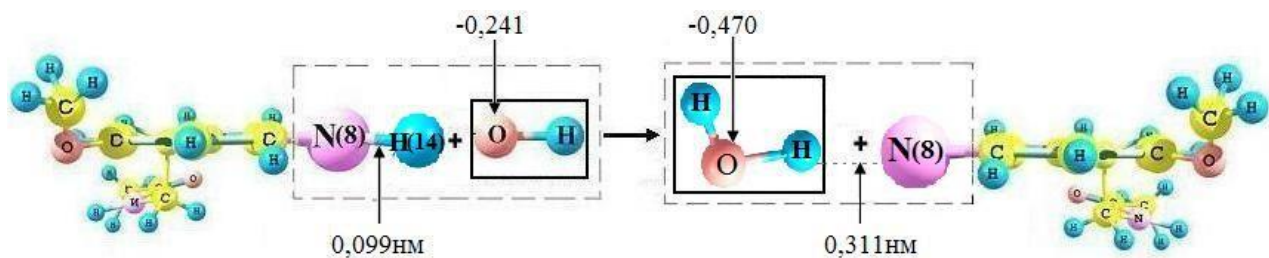


Рис. 6. Схема взаємодії молекули MLT з $\bullet\text{OH}$ (в точці глобального мінімуму).

Навпаки, взаємодія молекули мелатоніну з одним супероксид-аніон-радикалом приводить до переносу заряду з $\bullet\text{OO}^-$ на молекулу гормону, що призводить до подовження зв'язку між атомами кисню у вільному радикалі і стимулює ослаблення відповідних зв'язків водню в молекулі MLT, але не призводить до їх розриву. Як наслідок, в молекулі мелатоніну відбувається зменшення величин зарядів на атомах, які пов'язані з атомами водню в $1,1 \div 2,2$, що призводить до зменшення величин порядків в молекулі MLT, що вказує на ефективну взаємодію вільного радикала і молекули антиоксиданту і можливість утворення комплексу $\text{MLT} \cdots \bullet\text{OO}^-$ (рис.7).

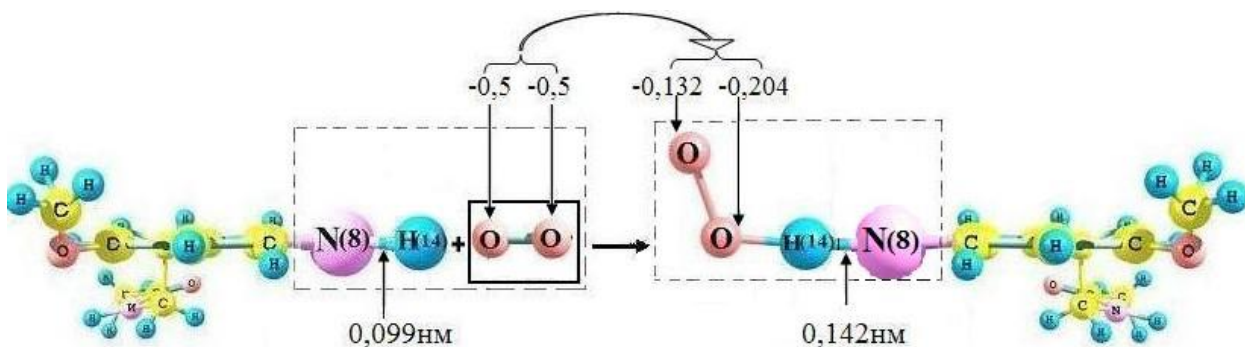


Рис.7.Схема взаємодії молекули MLT з $\bullet\text{OO}^-$ (в точці глобального мінімуму).

Аналіз отриманих результатів взаємодії молекули мелатоніну з гідроксил-радикалом і супероксид-аніон-радикалом показав, що відбувається різноспрямований перерозподіл заряду в молекулі антиоксиданту.

Таким чином зроблений порівняльний аналіз отриманих результатів підтверджує різноспрямований механізм переносу заряду при взаємодії молекули антиоксиданту з гідроксил-радикалом і супероксид-аніон-радикалом відповідно до схеми перерозподілу електронної густини при взаємодії молекули MLT з $\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{OO}^-$ (рис.8) .

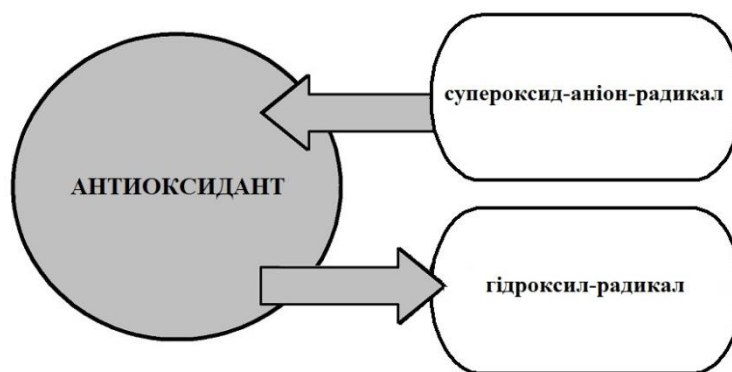


Рис. 8. Схема перерозподілу електронної густини при взаємодії молекули MLT з $\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{OO}^-$.

3.3. Моделювання впливу водного середовища на механізм взаємодії молекули MLT з $\bullet\text{OH}$ і $\bullet\text{OO}^-$.

Для наближення результатів розрахунків до реальних умов взаємодії мелатоніну з вільними радикалами в організмі людини і моделювання ситуації впливу водного середовища на механізм взаємодії молекули MLT з вільними радикалами були проведені квантовохімічні розрахунки в рамках програми Firefly 8. При розрахунках враховували, що діелектрична проникність водного середовища дорівнює $\epsilon = 78,355$, а температура $T = 298$ в рамках моделі розчинника PCM.

Аналіз отриманих результатів (табл.1, табл.2) при врахуванні впливу водного середовища на взаємодію молекули антиоксиданту з вільними радикалами показав, що механізм перерозподілу електронної густини посилюється для взаємодій $\text{MLT} \cdots \bullet\text{OH}$ і $\text{MLT} \cdots \bullet\text{OO}^-$.

Таблиця 1. Порівняльний розподіл зарядів q по Льовдіну для взаємодій $MLT \cdots \bullet OH$ та $MLT \cdots \bullet OO^-$ і вільних радикалів при PCM в точках глобального мінімуму

Взаємодія		q		
		MLT		
		N(8)	H(14)	O(34)
$\bullet OH$	Без PCM	-0,184	0,210	-0,470
	PCM	-0,178	0,215	-0,485
$\bullet OO^-$	Без PCM	-0,342	0,220	-0,204
	PCM	-0,370	0,209	-0,200

Таблиця 2. Розподіл порядків зв'язків B_{ij} і відстаней R для взаємодій $MLT \cdots \bullet OH$ та $MLT \cdots \bullet OO^-$ в точках глобального мінімуму з урахуванням і без PCM

Взаємодія		MLT			
		N(8)-H(14)		O(34)-H(14)	
		B_{ij}	R_{nm}	B_{ij}	R_{nm}
$\bullet OH$	Без PCM	-	0,311	0,820	0,094
	PCM	-	0,314	0,816	0,095
$\bullet OO^-$	Без PCM	0,149	0,142	0,671	0,098
	PCM	0,139	0,144	0,689	0,097

Так при взаємодії молекули MLT з $\bullet OH$ величина заряду на атомах кисню в гідроксил-радикалів зменшується в 1,03 (табл.1), що призводить до збільшення величин порядків зв'язків O(34)-H(14) і O(38)-H(23) в 1,01 і як наслідок, відбувається незначне зменшення величини довжини відповідних зв'язків (табл.2). Все це призводить до збільшення ймовірності відриву атомів водню від молекули MLT з утворенням молекул води, на відміну від взаємодії молекул антиоксидантів з $\bullet OO^-$, де йде посилення утворення комплексів $MLT \cdots \bullet OO^-$. При врахуванні впливу сольватаційних ефектів відбувається перерозподіл електронної густини з $\bullet OO^-$ на молекулу антиоксиданту, в

результаті чого зменшуються величини зарядів на атомах N(8) в 1,08-1,1, що призводить до незначного збільшення величин порядків зв'язків і N(8)-H(14) в 1,07 і відстаней між цими атомами.

РОЗДІЛ 4.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИРАДИКАЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ MLT

Каталітичне окислення ендогенних антиоксидантів, яке відбувається під впливом активних форм кисню, є предметом численних досліджень [15-35]. Це обумовлено важливістю цих процесів для підтримки антиоксидантної системи організму, нормалізації обміну речовин, оздоровлення та гальмування процесів старіння.

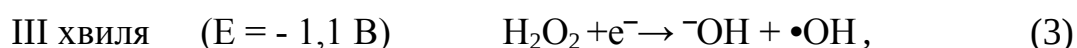
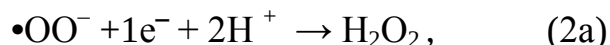
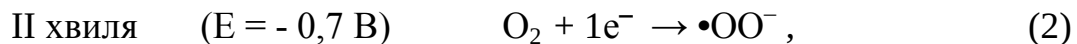
Для підтвердження результатів квантовохімічних розрахунків було проведено електрохімічне дослідження взаємодії мелатоніну з активними формами кисню (АФК) у водному фізіологічному розчині шляхом електрохімічного генерування АФК в присутності MLT.

4.1. Моделювання процесу електровідновлення активних форм кисню в присутності мелатоніну

Як об'єкт вивчення використовували мелатонін фірми Merck (Німеччина), res. grad без додаткового очищення. Фоновий електроліт (0,1моль/л NaCl - фізіологічний розчин) готували з двічі перекристалізованого NaCl кваліфікації "х. ч." в бідистильованій воді. Концентрація кисню в розчині відповідала рівноважній при атмосферному тиску і температурі 20°C. Вольтамперні дослідження антиоксидантів проводили за допомогою сполученого з комп'ютером полярографа ПУ-1 в 3-електродній ємкості за розробленою методикою [56].

В якості робочого використовували мідний торцевий електрод, допоміжним електродом служила платинова пластина, потенціал (-0,2 – -1,2В) задавали відносно хлор-срібного електрода порівняння.

При поляризації мідного катода вдається отримати диференціальні вольтамперні криві відновлення АФК (рис. 9), які характеризують реакції (1-3), аналогічні тим, що протікають в біосистемах в процесі дихання, обміну речовин, кисневого стресу:



знімали на фоні 0,1М розчину NaCl у воді (фізіологічному розчині) з подальшим титруванням фонового електроліту добавками MLT різної концентрації.

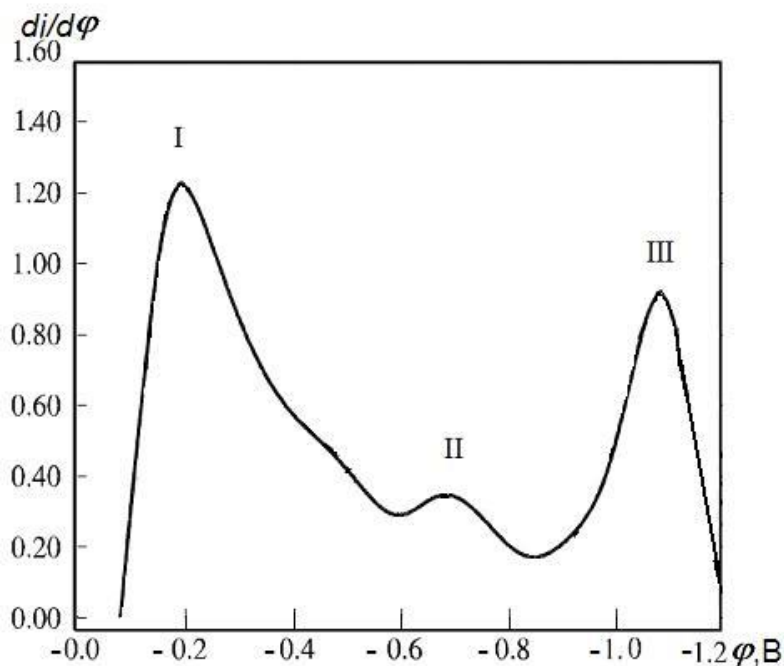


Рис. 9. Диференціальні вольтамперограми відновлення АФК на мідному катоді на фоні 0,1 NaCl у воді (швидкість поляризації мідного електрода 105 мВ/с).

При введенні у фоновий розчин добавок MLT різної концентрації спостерігали появу трьох хвиль (рис. 10). При цьому потенціал відновлення (ϕ) першої хвилі не змінювався, що вказує на відновлення однакових по типу та формі ЕАЧ. Збільшення концентрацій добавок MLT призводить до істотного

зниження граничного струму перших хвиль на вольтамперних кривих за рахунок чисто хімічної реакції в об'ємній фазі розчину за схемою (4):



що вказує на зменшення кількості ЕАЧ типу $\bullet\text{OH}$.

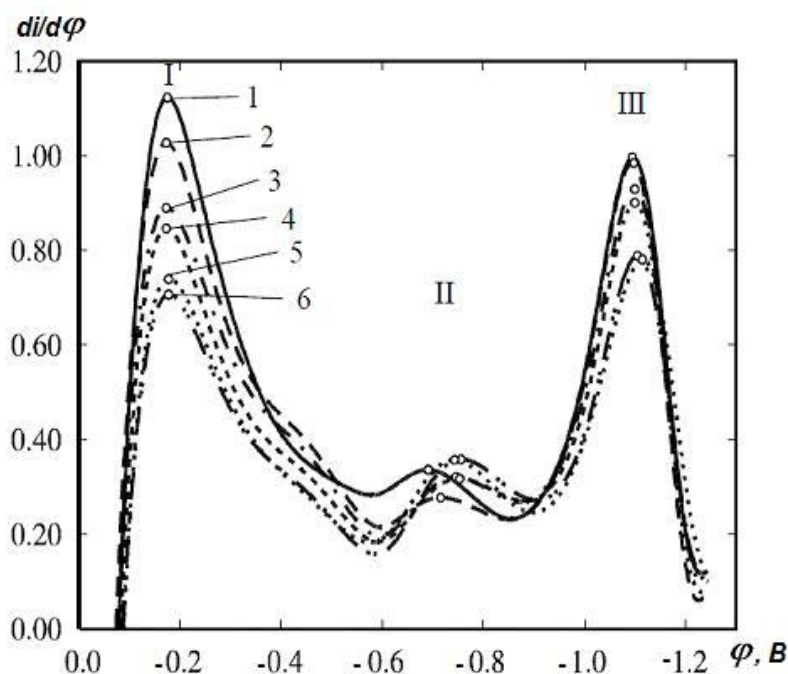


Рис.10. Диференціальні вольтамперограми відновлення АФК на мідному катоді на фоні 0,1 NaCl у воді (1) в присутності різних концентрацій мелатоніну: 2 - 0,39; 3 - 0,74; 4 - 1,07; 5 - 1,67; 6 $2,18 \cdot 10^{-3} \text{ M/dm}^3$.

Подальше відновленням $\bullet\text{OH}$, концентрація яких буде зменшуватися внаслідок реакції (4) при введенні добавок MLT[GSH] буде спостерігатися при незмінному потенціалі (0,2 В) на електроді за такою реакцією:



На відміну від першої хвилі спостерігається катодний зсув другої хвилі потенціалу відновлення, встановлений як при введенні добавок MLT. Так як результати квантовохімічних досліджень взаємодії $\bullet\text{OO}^-$ з MLT не вказують на розрив водневих зв'язків в молекулі MLT, а вказують на вірогідність утворення комплексів, то експериментально знайдений катодний зсув потенціалу 2 хвилі відновлення, однозначно вказує на процес відновлення електроактивного комплексу, тип, форма і кількість яких буде визначатися концентрацією MLT

відносно $\bullet\text{OO}^-$. Зсув хвилі відновлення $\bullet\text{OO}^-$ в присутності MLT відбувається в бік збільшення. Таке обґрунтування зсуву другої хвилі процесу одноелектронного відновлення ЕАЧ корелює із результатами квантовохімічної оцінки значень енергії активації при одноелектронному переносі заряду (табл.3), які різняться для «ізольованої» молекули $\bullet\text{OO}^-$ та комплексу $\{\text{MLT}\bullet\text{OO}^-\}$. Незмінність потенціалу відновлення та зменшення граничного струму (1 хвиля) та катодний зсув потенціалу (2 хвиля) зі збільшенням концентрації антиоксиданту при взаємодії із вільними радикалами є прямим підтвердженням на макрорівні результатів квантовохімічних розрахунків [57].

Таблиця 3. Результати розрахунків енергій активацій для $\bullet\text{OO}^-$ та комплексу $\{\text{MLT}\bullet\text{OO}^-\}$ при приєднанні одного електрона

Об'єкт	Е _а , кДж/моль
	комплекс + $\bar{e}$
$\bullet\text{OO}^-$	572,5
$\{\text{MLT}\bullet\text{OO}^-\}$	821,6

Отримані результати експерименту повністю підтвердили на макрорівні результати квантовохімічних досліджень і показали, що MLT проявляє антирадикальну активність.

ВИСНОВКИ

Проведено моделювання порівняльної активності антиоксидантів на прикладі взаємодії молекули MLT з гідроксил-радикалом і супероксид-аніон-радикалом на основі результатів квантовохімічних розрахунків і електрохімічних досліджень, яке дозволило обґрунтувати мікроскопічний механізм антирадикальної активності молекули MLT за запропонованою схемою перерозподілу електронної густини в молекулі мелатоніну при

взаємодії з вільними радикалами, яка дає можливість прогнозувати і встановлювати найбільш ймовірні активні центри антиоксиданту.

1. Встановлено найбільш ймовірні активні центри взаємодії молекули MLT з супероксид-аніон-радикалом і гідроксил-радикалом, які відповідають найбільш глибоким мінімумам повної енергії взаємодії.
2. Запропоновано схему перерозподілу електронної густини в молекулі мелатоніну при взаємодії з вільними радикалами. Збільшення кількості вільних радикалів по відношенню до молекули MLT принципово не змінюють виявлений механізм перерозподілу електронної густини, що вказує на інваріантність протікання таких реакцій як по відношенню до концентрації вільних радикалів, так і з урахуванням впливу сольватаційних ефектів. На макроскопічному рівні підтверджена принципова відмінність механізмів інгібування MLT гідроксил-радикалів та супероксид-аніон-радикалів.
3. Проведені електрохімічні дослідження підтвердили антирадикальні властивості мелатоніну.
4. Встановлена кореляція зміни макроскопічних параметрів процесу електровідновлення активних форм кисню в присутності мелатоніну (потенціал та граничний струм хвиль відновлення) з отриманими на нанорівні результатами квантовохімічних досліджень (перерозподіл електронної густини, порядки зв'язків між атомами, енергетичних характеристик) при взаємодії молекули антиоксиданту із вільними радикалами.
5. Доведена перспективність використання результатів квантовохімічних розрахунків в поєднанні з електрохімічними дослідженнями для обґрунтування та встановлення особливостей та відмінностей антирадикальної активності MLT та інших антиоксидантів при взаємодії з супероксид-аніон-радикалом і гідроксил-радикалом з метою прогнозування шляхів створення нових лікарських препаратів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Guzik, T.J. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation/ T.J. Guzik, / Journal of Physiology and Pharmacology.–1998. Vol. 54, № 4. –P.469-487.
2. Анисимов В. Н. Мелатонин роль в организме, применение в клинике / В. Н. Анисимов –С-Пб.: Издат-во «Система», 2007. – 40 с.
3. Герман С.В. Мелатонин у человека /С.В Герман. // Клин. мед. – 1993. – № 71(3). – С. 22-30.
4. Малиновская Н.К. Роль мелатонина в организме человека /Н.К.Малиновская // Клиническая медицина.–1997.– № 10.– С.12-22.
5. Russel J. Melatonin: Lowering the High Price of Free Radicals / J. Russel //News Physiol. Sci. – 2000. –Vol.15. – P. 246-250.
6. Анисимов В.Н. Антиоксидантная роль эпителиамина и мелатонина /В.Н. Анисимов, А.В. Арутюнян, В.Х. Хавинсон. Геронтологические аспекты пептидной регуляции функций организма.– СПб.: Наука, 1996. –15 с.
7. Арушанян Э.Б. Антистрессорные возможности эпифизарного мелатонина / Э.Б. Арушанян // Мелатонин в норме и патологии / Под ред. Ф.И. Комарова, - М.: 2004. – С 198-222.
8. Maestroni G.J. Melatonin, stress, and the immune system/ G.J. Maestroni, A.Conti, W. Pierpaoli // Pineal Res. Rev. – 1989. – Vol. 7. –P. 203-226.
9. Melatonin in the treatment of cancer: a systematic review of randomized controlled trials and meta-analysis / E. Mills, P. Wu, D. Seely, G. Guyatt // J. Pineal. Res.– 2005.– Vol. 39, № 4.– P. 360–366.
10. Барабой В.А. Антиокислительная и биологическая активность мелатонина / В.А. Барабой. // Укр. біохім. журнал. 2000. Т 72, №3. – С. 5-11.
11. Wetterberg L. Melatonin and clinical application / L. Wetterberg Reprod. Nutr. Dev.– 1999.– Vol. 39, № 3. – P. 367–382.
12. Беспярых А. Ю. Мелатонин как антиоксидант: основные функции и свойства / А. Ю. Беспярых, О. В. Бурлакова, В. А. Голиченков // Успехи современной биологии. – 2010. – Т. 130, № 5. – С. 487–496 .

13. Raikhlin N.T. Melatonin and enterochromaffine cells / N.T. Raikhlin, I.M. Kvetnoy // *Acta Histochem.* 1976. – Vol. 55. – P. 19–25.
14. Raikhlin N.T. Melatonin may be synthesised in enterochromaffine cells / N.T. Raikhlin, I.M. Kvetnoy, V.N. Tolkachev // *Nature.* 1975. – Vol. 155. – P. 344–345.
15. Kvetnoy I.M. Autoradiographical and immunohistochemical analysis of melatonin distribution in endocrine and non-endocrine organs / I.M. Kvetnoy, V.V. Yuzhakov, G.A. Petrova // *Bull. Exp. Biol. Med.* –1990. Vol.41, № 10. – P. 438–440.
16. Kvetnoy I.M. Extrapineal melatonin in pathology: new perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of illness / I.M. Kvetnoy // *Neuroendocrinolog. Lett.* 2002. – Vol. 23, Suppl. 1. – P. 92–96.
17. Barriga C. Physiological concentrations of melatonin and corticosterone in stress and their relationship with phagocytic activity/ C. Barriga, M.I. Martin // *J. Neuroendocrinol.* – 2002– Vol. 14. – P. 691–695.
18. Barriga C. Circadian rhythm of melatonin, corticosterone and phagocytosis: effect of stress / C.Barriga // *Hi. Pineal Res.* – 2001. – Vol.30, № 3. –P. 180–187.
19. Reiter R.J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions/ R.J. Reiter // *Endocrinol. Rev.*–1991. – Vol. 12. – P.151–180.
20. Mayo J.C. The oxidant/antioxidant network: role of melatonin / J.C. Mayo, S. Ramos // *Biol. Signals Recept.* – 1999. – Vol. 8. –P. 56–63.
21. Antioxidant capacity of melatonin / R.J. Reiter, D.X. Tan, L.C. Manchester, J.R. Calvo // *Handbook of Antioxidants*, 2nd edn. Ed. E. Cadenas, L. Packer. - New York: Marcel Dekker. – 2002. – P. 565–613.
22. Reiter R.J. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence/ R.J. Reiter, D.X. Tan, L.C. Manchester // *Cell Biochem. Biophys.* – 2001. – Vol. 34. – P. 247–256.
23. Акмаев И.Г. Нейроиммуноэндокринология жировой ткани / И.Г. Акмаев, В.Г. Сергеев // *Успехи физиол. наук.* 2002. – Т. 33, № 2. – С. 316.
24. Арутюнян А.В, Свободнорадикальные процессы в сыворотке крови, печени и толстой кишке при канцерогенезе, индуцируемом 1,2-диметилгидразином у

- крыс / А.В. Арутюнян, В.М. Прокопенко// Успехи физиол. наук. 2001. – Т. 31, № 2. – С. 216.
25. Верещагин Н.В. Антиоксиданты в ангионеврологии / Н.В. Верещагин// Атмосфера. Нервные болезни. 2004. – № 3. – С. 8–12.
 26. Анисимов В.Н. Мелатонин и эпиталамин угнетают процесс свободнорадикального окисления у крыс / В.Н. Анисимов, В.М. Прокопенко, В.Х. Хавинсон // Доклады РАН. 1995. – Т. 343. – С. 557-559.
 27. Рябых Т.П. Действие регулятора биоритмов мелатонина на синтез ДНК в краткосрочных культурах злокачественных опухолях человека / Т.П. Рябых, Т.Г. Николаева, Н.Б. Бодрова // Вестник АМН СССР. 2000. – № 8. – С. 30–33.
 28. Neufelder A.E. Endocrinology meets immunology-T lymphocytes as novel targets for melatonin / A.E. Neufelder // Eur. J. Endocrinol. 1996.– Vol. 134. – P. 424–425.
 29. Слепушкин В.Д. Эпифиз и адаптация организма / В.Д. Слепушкин, В.Г. Пашинский – Томск: Изд. Томского ун-та, 1982. – 210 с.
 30. Слепушкин В.Д. Эпифиз, иммунитет и рак: теоретические и клинические аспекты / В.Д. Слепушкин, В.Н. Анисимов, В.Х. Хавинсон – Томск: Медицина 1990. – 148 с.
 31. Russel J. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans/ J.Russel, S.Reiter // Acta biochimica Polonica. 2003.– Vol. 50, № 4. – P.135–140.
 32. Neumann H. Neuronal control of the immune response in the central nervous system: linking brain immunity to neurodegeneration / H. Neumann, H. Wekerle // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1998. – Vol. 57.– P.1–9.
 33. Regelson W. Melatonin: a rediscovered antitumor hormone / W. Regelson, W. Pierpaoli // Cancer Invest. 1987. – Vol. 5. – P. 276–283.
 34. Ю.Анисимов В.Н. Мелатонин и эпиталамин угнетают процесс свободнорадикального окисления у крыс / В.Н. Анисимов, В.М. Прокопенко, В.Х. Хавинсон // Доклады РАН. 1995. – Т. 343. – С. 557–559.
 35. Fischer T.W. The antioxidopative potential of melatonin in the skin / T.W. Fischer, P. Eisner /Curr. Probl. Dermatol. –2009.– Vol. 29. – P. 165–174.

36. Арушунян Э.Б., Эпифизарный мелатонин как антистрессорный агент / Э.Б.Арушунян, Л.Г. Арушунян // Эксперимент и клинич. фармакология. – 1997. – № 60(6). – С. 71–77.
37. Gunasekan S. Experimental and theoreticsl investigation of spectroscopic properhies of N-acetyl-5- methoxyptamine /Gunasekan S., Arun Balaji R.,Rumqresan S. //Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy – 2008. – Vol. 53. – P. 150–162.
38. Бачурин С.О. Медико-химические подходы к направленному поиску препаратов для лечения и предупреждения болезни Альцгеймера /С.О.Бачурин // Вопросы мед. химии.– 2001.– № 2 .– С. 11–25.
39. P. Pignatelli. Hydrogen Peroxide Is Involved in Collagen-Induced Platelet /P. Pignatelli // Nutr. Dev.– 1996.–Vol.34, № 2. – P.484–490 .
40. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins/ D.D. Wayner, G.W. Burton, K.U. Ingold, S.Locke // FEBS Letters.–1985. –Vol. 187.– P.33–37.
41. Quantif ication of antioxidant activity in brain tissue homogenates using the ‘total equivalent antioxidant capacity’ / T.B. Shea, E. Rogers, D. Ashline, D. Ortiz // Journal of Neuroscience Methods.– 2003.– Vol. 125.– P. 55–58.
42. Фотохемилюминесценция как метод изучения антиоксидантной активности в биологических системах. Математическое моделирование / Д.В. Магин, Д.Ю. Измайлов, И.Н. Попов, Ю.А. Владимиров //Вопросы медицинской химии.– 2000.– Т. 4.– С. 65-68.
43. Ehlenfeldt M.K. Oxygen radical absorbance capac ity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry/ M.K. Ehlenfeldt, R.L. Prior // Journal of Agricultural and Food Chemistry.– 2001. –Vol. 49. –P. 2222–2227.
44. Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials/ B. Yang, A. Kotani, K.Arai, F.Kusu // Analytical Sciences (Japan).– 2001. –Vol. 17.– P. 599–604.

45. A rapid screening assay for antioxidant potential of natural and synthetic agents in vitro / P.Srinivasan, M.V. Vadhanam, J.M. Arif, R.C. Gupta // International Journal of Oncology. – 2002. – Vol. 20. – P. 983–986
46. Хасанов В. В. Методы исследования антиоксидантов / В. В. Хасанов, Г. Л. Рыжова, Е. В. Мальцева // Химия растительного сырья. – 2004. – № 3, – С. 63 – 75.
47. Новый вольтамперометрический метод определения антиоксидантной активности косметической продукции / Е.И. Короткова, О.А. Аврамчик, И.Г. Каморзина, Ю.А.Карбаинов // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2004 – №8. – С.13–17.
48. Мак-Вини Р. Квантовая механика молекул / Р.Мак-Вини, Б.М. Сатклиф. – М.:Мир. – 1972. – 380 с.
49. Roothan C.C. New developments in molecular orbital theory/ C.C. Roothan // Rev. Mod. Phys. – 1951. – Vol. 23. – P. 69–78.
50. Pople I.A. Approximate Self-consistent Molecular Orbital Theory, III: CNDO Results for AB and AB Systems/ I.A. Pople, G.A. Segal // J. Chem.Phys. – 1966. – Vol.44. – P. 289-297.
51. Amos A.T. Single determinant wave functions / A.T. Amos, G.G. Hall // Proc. Roy. Soc. – 1961. – Vol. 263. – P. 483–489.
52. Amos A.T. Unrestricted Hartree-Fock calculations. An Improved method of computing spin properties/ A.T. Amos, L.C. Shyder // J.Chem. Phys. – 1964. – Vol. 41. – P. 1773–1782.
53. Громова В.Ф. Исследование антирадикальной и антиокислительной активности биологически активных карбоновых кислот/ В.Ф. Громова, Г.С. Шаповал, И.Е. Миронюк // Журн. общей химии. – 2002. – 72, вып. 5. — С.828-831.
54. Геометрична й електронна будова мелатоніну за відсутності токсичних речовин / А. О. Прокопенко, В.В. Соловйов, С.Д. Просветов // Тези 71-ої наукової конференції професорів, викладачів, наукових працівників, аспірантів та

- студентів університету. Том 2. (Полтава, 22 квітня – 17 травня 2019р.) – Полтава: ПолтНТУ, 2019. – С. 295-297.
55. Геометрическое и электронное строение молекулы мелатонина. / Соловйов В.В., Прокопенко А.А., Просветов С.Д. // VI міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Сучасний рух науки», 4-5 квітня 2019 р. – Дніпро, 2019. – С. 643 – 645.
56. Электрохимическое моделирование элементарных стадий окислительно-восстановительных реакций в биосистемах / В.Ф. Громова, Г.С. Шаповал, В.П. Кухарь, В.И. Пивень // Доповіді НАН України. – 1995. – №3. – С.92-94.
57. Аналіз антирадикальної активності MLT за результатами електрохімічних досліджень/ Прокопенко А.О., Соловйов В.В., Просветов С.Д., Омельчук А.О.// XVIII Міжнародна науково-технічна конференція «Фізичні процеси та поля технічних і біологічних об'єктів»: матеріали конференції. – Кременчук: КрНУ, 2019. – с. 45-46

СПИСОК ВЛАСНИХ ПУБЛІКАЦІЙ АВТОРА

1. Геометрична й електронна будова мелатоніну за відсутності токсичних речовин / А. О. Прокопенко, В.В. Соловйов, С.Д. Просветов // Тези 71-ої наукової конференції професорів, викладачів, наукових працівників, аспірантів та студентів університету. Том 2. (Полтава, 22 квітня – 17 травня 2019р.) – Полтава: ПолтНТУ, 2019. – С. 295-297.
2. Геометрическое и электронное строение молекулы мелатонина. / Соловйов В.В., Прокопенко А.А., Просветов С.Д. // VI міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Сучасний рух науки», 4-5 квітня 2019 р. – Дніпро, 2019. – С. 643 – 645.
3. Аналіз антирадикальної активності MLT за результатами електрохімічних досліджень/ Прокопенко А.О., Соловйов В.В., Просветов С.Д., Омельчук А.О.// XVIII Міжнародна науково-технічна конференція «Фізичні процеси та поля технічних і біологічних об'єктів»: матеріали конференції. – Кременчук: КрНУ, 2019. – с. 45-46