

**Міністерство освіти і науки України  
Ніжинський державний університет імені Миколи Гоголя  
Природничо-географічний факультет**

**Кафедра хімії та фармації**

**Магістерська робота  
на тему:**

**«ПОШУК І ВИВЧЕННЯ НОВИХ ІНГІБІТОРІВ  
КСАНТИНОКСИДАЗИ»**

**Виконала:**

студентка другого (магістерського) рівня,  
групи Хкм-61  
Освітньо-професійної програми «Хімія,  
медична та фармацевтична хімія»  
зі спеціальності 102 Хімія  
**Татарчук Альона Віталіївна**

**Наукові керівники:**

д.х.н., завідувач кафедри хімії та фармації,  
професор **Суховєєв В.В.**,  
к.х.н., ст.н.с. Інституту біоорганічної хімії та  
нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАН України  
**Кобзар О.Л.**

**Рецензенти:**

д.фарм.н., професор **Демченко А.М.**,

к.б.н., ст.н.с. Інституту біоорганічної хімії та  
нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАН України  
**Семенюта І.В.**

**Ніжин – 2019**

## ЗМІСТ

ВСТУП .....	3
<b>РОЗДІЛ I. КСАНТИНОКСИДАЗА: СТРУКТУРА ТА ФУНКЦІЇ</b>	
1.1. Структура та механізм дії ксантиноксидази .....	6
1.2. Функції ксантиноксидази в організмі людини .....	8
1.3. Інгібітори ксантиноксидази та їх значення у медицині.....	9
<b>РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ</b>	
2.1. Матеріали.....	24
2.2. <i>In silico</i> скринінг бази даних хімічних сполук як інгібіторів ксантиноксидази .....	24
2.3. <i>In vitro</i> дослідження азометинових похідних <i>para</i> -амінобензойної кислоти як інгібіторів ксантиноксидази.....	26
2.4. Дослідження антиоксидантних властивостей МДА тестом .....	26
2.5. Дослідження кінетики інгібування ксантиноксидази .....	27
2.6. Методи кінетичного аналізу .....	27
2.7. Методи розрахунків та статистичного аналізу.....	28
<b>РОЗДІЛ III. ПОТЕНЦІЙНІ ІНГІБІТОРИ КСАНТИНОКСИДАЗИ</b>	
3.1. Пошук <i>in silico</i> нових інгібіторів ксантиноксидази.....	31
3.2. Азометинові похідні <i>para</i> -амінобензойної кислоти як інгібітори ксантиноксидази .....	35
ВИСНОВКИ.....	43
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	44

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Ксантиноксидаза є ферментом, що каталізує окиснювальне перетворювання гіпоксантину до ксантину та сечової кислоти з продукуванням активних форм кисню. Надмірне утворення сечової кислоти у результаті підвищеної активності ксантиноксидази призводить до розвитку таких хвороб як гіперурикемія, подагра та до запальних захворювань. У всіх цих випадках ксантиноксидаза є мішенню, де інгібітори можуть проявляти свій терапевтичний потенціал.

На сьогодні існує багато інгібіторів ксантиноксидази, серед яких найбільш поширеними є алопуринол, оксипуринол і фебуксостат. Дані сполуки широко використовуються для лікування зазначених вище захворювань [1]. Проте неможливість їх застосування для деяких пацієнтів вказує на необхідність подальшого пошуку ефективних інгібіторів ксантиноксидази [2].

**Метою** роботи був пошук потенційних інгібіторів ксантиноксидази.

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

1. Здійснити огляд наукової літератури стосовно структури ксантиноксидази та механізму її каталітичної дії.
2. Здійснити віртуальний скринінг бази хімічних сполук.
3. Проаналізувати отримані результати та відібрати сполуки з кращою скоринговою енергією та за способом зв'язування, що притаманно існуючим інгібіторам.
4. Дослідити сполуки *in vitro* та з'ясувати зв'язок між структурою і активністю знайдених інгібіторів ксантиноксидази.
5. Запропонувати підходи оптимізації знайдених структур-лідерів для поліпшення їх інгібувальної активності.

**Об'єкт дослідження** – інгібітори ксантиноксидази.

**Предмет дослідження** – дослідження впливу інгібіторів на активність ксантиноксидази.

**Методи дослідження** – ферментативна кінетика, спектральні методи аналізу, молекулярний докінг, теоретичні розрахунки.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше продемонстровано, що азометинові похідні *para*-амінобензойної кислоти, відомої як вітамін B<sub>10</sub>, є мікромолярними інгібіторами ксантиноксидази.

**Практичне значення одержаних результатів.** Запропоновано та розроблено нову ідею, що є важливою і повинна бути врахована при обґрунтуванні механізмів фізіологічної активності азометинових похідних *para*-амінобензойної кислоти. Результати магістерської роботи є важливими для подальшого цілеспрямованого конструювання інгібіторів ксантиноксидази.

**Особистий внесок дослідника.** Магістранткою проведено огляд наукової літератури, виконано експериментальну частину роботи на базі відділу Механізмів біоорганічних реакцій Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАН України (зав. відділом – член-кореспондент, доктор хімічних наук, професор Вовк Андрій Іванович). Ідея розробки належить науковим керівникам. Обговорення результатів дослідження, формування структури роботи, формулювання висновків проводились сумісно 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 одну статтю. Крім того, підготовлено статтю: «Азометинові похідні *para*-амінобензойної кислоти як інгібітори ксантиноксидази» до фахового журналу з хімії.

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

висновків і списку використаних джерел, до складу якого входить 108 найменувань.

Магістерська робота налічує 54 сторінки друкованого тексту, проілюстрована 12 таблицями і 13 рисунками.

## РОЗДІЛ І. КСАНТИНОКСИДАЗА: СТРУКТУРА ТА ФУНКЦІЇ

### 1.1. Структура та механізм дії ксантиноксидази

Ксантиноксидаза (ХО; ЕС: 1.17.3.2) належить до класу ферментів оксидоредуктаз (OR), що каталізують реакції, які супроводжуються переносом протонів з однієї молекули на іншу. Фермент широко поширений в серці, нирках, печінці, кишечнику, головному мозку, легенях і плазмі [3].

Даний фермент є складним флавопротеїном, що складається з субодиниці приблизно 145 кДа, яка містить залізо-сірчаний центр (FeS), що розміщується в N-кінцевому (20 кДа) домені, флавінаденіндинуклеотид (ФАД) у проміжному домені (40 кДа), молібдоптериновий кофактор у C-кінцевому (85 кДа) домені (рис. 1.1). До складу ксантиноксидази входить 1330 амінокислотних залишків, у яких послідовність приблизно на 90% схожа серед людських, щурячих і мишачих ферментів [3–5].

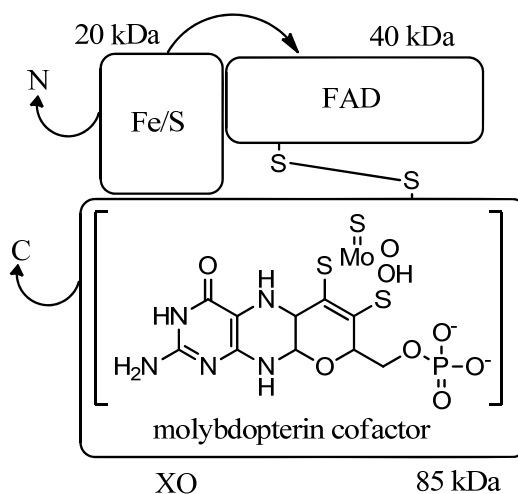


Рис. 1.1. Структурна модель субодиниці ксантиноксидази [3].

Окиснювальне гідроксилювання різноманітних ароматичних гетероциклів і простих альдегідів, гідроксилювання ксантину до сечової кислоти відбувається в молібденовому центрі ферменту, що змінюється в процесі з Mo(VI) до Mo(IV). Реакція гідроксилювання проходить через проміжну сполуку, у якій продукт сечової кислоти координується з молібденом нижчої валентності через введений гідроксил групи Mo(IV)-OR [3, 4].

При проходженні реакції XOR-каталізу два електрони переходять з ксантину в молібденовий центр і згодом до ФАД з посередництвом залізо-сірчаних центрів, де окиснювальна частина реакції відбувається при одночасному зменшенні нікотинамідаденіндинуклеотиду ( $\text{NAD}^+$ ) або молекулярного кисню. Фрагменти FeS і ФАД зазнають спектральних змін в процесі цієї реакції, у той час як  $\text{Mo(V)}$  види виявляють за допомогою електронного парамагнітного резонансу, що дає змогу визначити стан окисно-відновного ферменту [6].

Механізм дії ксантиноксидази на гідроксилювання субстрату був предметом вивчення протягом значного проміжку часу. Причиною цього можна назвати унікальну стехіометрію реакції, адже молібден гідроксилаза для проходження реакції використовує не  $\text{O}_2$ , а воду в якості джерела атома Оксигену; а також не споживає, а генерує відновлювальні еквіваленти [4].

У окисненому стані молібденовий центр ферменту можна записати, як  $\text{LMo}^{\text{VI}}\text{OS}(\text{OH})$ , де L – піраноптериновий кофактор, що є загальним для всіх мононуклеарних молібденових і вольфрамових ферментів (рис. 1.2).

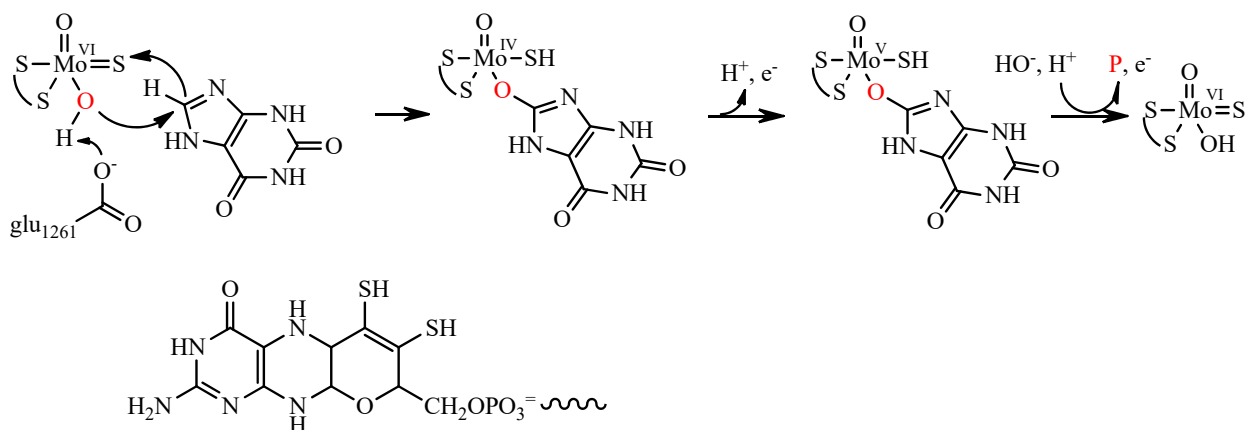


Рис. 1.2. Механізм реакції на ксантиноксидазу. Структура кофактора піраноптерину вказана знизу [4].

Цей ліганд зв'язується з металом через бічний ланцюг у викривленій координаційній квадратно-пірамідальній геометрії. Дані досліджень стверджують, що група  $\text{Mo} = \text{O}$  займає апікальне положення [7].

На рис. 1.2 показано, як база активного сайту абстрагує протон з групи  $\text{Mo} - \text{OH}$ , яка згодом здійснює нуклеофільну атаку на положення субстрату C-8. Перенесення гідриду до групи  $\text{Mo} = \text{S}$  дає  $\text{LMo}^{\text{IV}}\text{O}(\text{SH})(\text{OR})$  види, як показано, з  $\text{OR}$ , що представляє продукт, координований з металом через нововведену гідроксильну групу. Ця початкова проміжна сполука розпадається шляхом перенесення електронів на інші окиснювально-активні центри ферменту з тимчасовим утворенням парамагнітних видів  $\text{Mo}(\text{V})$ , які можна виявити за допомогою спектроскопії електронним парамагнітним резонансом (ЕПР), з подальшим витісненням продукту гідроксидом від розчинника до повернення в початковий стан  $\text{LMo}^{\text{VI}}\text{OS}(\text{OH})$  [3, 4, 7].

## 1.2. Функції ксантинооксидази в організмі людини

Незважаючи на десятилітні дослідження ксантинооксидази, функції людського ферменту до сих пір вивчені недостатньо. В організмі людини він знаходиться у грудному молоці, де активність ферменту досить низька, що пов'язано з низьким вмістом молібдену [8].

Ксантинооксидаза була визначена в якості важливого джерела окисного стресу в судинній системі [9, 10]. Окисний стрес займає центральну роль в патогенезі хвороб серця [11, 12], це відбувається через його внесок у ендотеліальну дисфункцію [13]. Сечова кислота, яка є кінцевим продуктом пуринового катаболізму, відіграє важливу роль у живому організмі як антиоксидант [14–16]. Захист від окисного стресу, що забезпечується уремією, був запропонований в якості фактору для збільшення тривалості життя людей; таким чином, відсутність активності урикази може являти собою еволюційну перевагу для уреотелічних приматів порівняно з уреотелічними ссавцями [17–19].

Дослідження [20–23] розглядає ксантинооксидазу з точки зору судинної ролі ферменту. Автори стверджують, що фермент здатен виробляти  $\text{NO}$  в безкисневих умовах.  $\text{HO}$  може сприяти  $\text{NO}$ -індукованій вазодилатації при ішемії, коли активність  $\text{NO}$ -синтази є низькою. Крім того, дослідження [24]



показали, що ХО є потенційно важливим джерелом NO в ішемічних біологічних тканинах [25–27].

У роботі [28] розглянуто ключову роль ксантинооксидази в патогенезі ішемії-реперфузії. Під час ішемії трансмембранні іонні градієнти розсіюються, що збільшує концентрацію цитозольного кальцію. У свою чергу, клітинний АТФ катаболізується в гіпоксантин, який накопичується. Під час реперфузії відновлений кисень, гіпоксантин і ксантинооксидазу поєднують для отримання перекису водню і супероксиду. Дані активні форми кисню можуть взаємодіяти з утворенням спектра цитостатичних агентів, у тому числі гідроксильних радикалів. Ця гіпотеза дала початок сотням робіт, у яких досліджувався механізм активності ферменту в різних тканинах: кишечнику [29], нирках [30], печінці [31].

Для антибактеріального захисту організму запропоновано генерувати активні форми кисню за участі ксантинооксидази. Особливу увагу приділяли бактерицидній ролі ХО в травному тракті новонароджених дітей [32–35], які споживають молоко матері. Було показано [33], що активність ХО у молоці досягає максимальних значень протягом першого тижня після пологів.

Ксантинооксидаза приймає участь у захисті від інфекційних захворювань, що пов'язано зі здатністю активувати клітинну запальну відповідь на різних рівнях [36]. ХО сприяє лейкоцито-ендотеліальній взаємодії клітин шляхом збільшення адгезії фагоцитів [37]. Крім того, вони індукують продукцію цитокінів [38], таким чином, посилюючи запальну реакцію, а також хемотаксичні фактори [39], які можуть викликати накопичення поліморфноядерних гранулоцитів у мікросудинах [40, 41].

### **1.3. Інгібітори ксантинооксидази та їх значення у медицині**

Процес взаємодії ксантинооксидази з інгібітором представляє інтерес не тільки з точки зору механізму ферментативної реакції, але й з медичної сторони. Конструювання ліків є важливою ланкою в області медичної хімії. Мета пошуку при розробці нових інгібіторів полягає в отриманні активних

сполук з мінімальним стеричним ефектом [42], усуненні побічних дій та підвищенні ефективності тощо [43, 44].

Значна кількість захворювань виникає через нестачу або надлишок конкретного метаболіту в організмі. Наприклад, надлишок сечової кислоти може призвести до подагри. Подагра виникає, коли кристали моногідрату мононатрієвого урату формуються *de novo* в рідині, яка пересичена сечовою кислотою або виділяється у розчин з тканинних відкладень, викликає запальну реакцію. Основним фактором розвитку подагри є тривала безсимптомна гіперурикемія. Інгібування ксантинооксидази знижує рівень сечової кислоти й сприяє антигіперурикемічному ефекту [6].

Інгібітори ксантинооксидази (ХОІ), як правило, використовуються в лікуванні нефропатії і захворювань ниркових каменів, пов'язаних з гіперурикемією. Інтерес до ХОІ останнім часом спостерігається і в профілактиці судинних захворювань, оскільки з'являються докази, що свідчать про роль сечової кислоти під час розвитку серцево-судинних хвороб; фермент є важливим джерелом окиснювального стресу в судинній системі [45].

Вибірче інгібування ХО може привести до широкого хіміотерапевтичного спектру для подагри, раку, запалення і окисного пошкодження тканин [46–49]. Деякі з компонентів, що присутні в екстрактах сирих рослин, наприклад, флавоноїди і поліфенольні сполуки, мають у своєму складі інгібітори ХО [50–55]. Це відкриття дало можливість виділити нові природні сполуки, що мають перспективу бути потенційними інгібіторами ксантинооксидази [2, 56–58].

За останні десятиліття було більш детально вивчено структуру ферменту ХО, розроблені нові лікарські підходи, що привело до відкриття потужних інгібіторів ХО різних класів, у тому числі пуринових аналогів, імідазолу і триазолу, флавоноїдів тощо [6, 59–61].

Алопуринол (рис. 1.3.a) є потужним пуриновим інгібітором ксантинооксидази. Він широко використовується в лікуванні подагри протягом

багатьох десятиліть. Алопуринол виявляє цікавий механізм дії, у результаті якого спочатку окиснюється до оксипуринолу, активного метаболіту алопуринолу, який виступає в якості ковалентного оборотного інгібітора. Останній зв'язується з відновленою формою ксантиноксидази (Mo (IV)) через сильний ковалентний зв'язок, і надає сильну інгібувальну активність [62, 63]. Проте ковалентний зв'язок розривається, оскільки Mo (IV) окиснюється з часом і повертається назад в окиснену форму XO (Mo (VI)), так що оксипуринол вивільняється, відновлюючи активність ферменту [64, 65]. На жаль, серйозні побічні ефекти (ниркова токсичність, висипи на шкірі, шлунково-кишкові розлади тощо) алопуринолу та інших аналогів пурину не дають можливості більш широкому їх застосуванню. Виходячи з цього, існує потреба в новому непуриновому сильнодіючому інгібіторі, який не виявляв би такої кількості побічних ефектів [3, 66, 67].

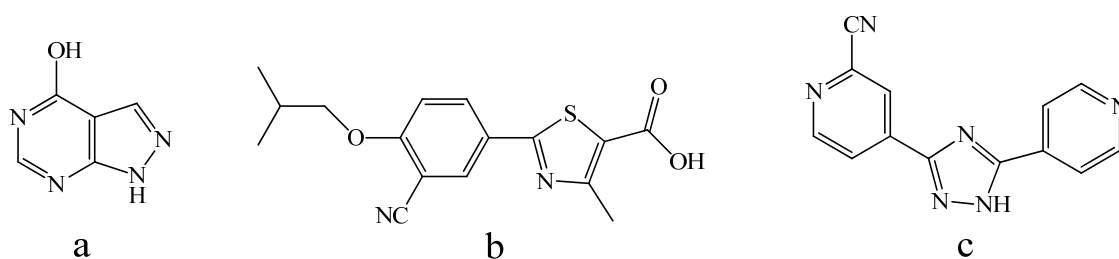


Рис. 1.3. Клінічно використовувані інгібітори ксантиноксидази: алопуринол (а), фебуксостат (b), топіроксостат (с)

Фебуксостат – похідне тіазолу (рис. 1.3.b), сильнодіючий неконкурентний інгібітор. Один із перших непуринових інгібіторів, що затверджений Управлінням з контролю за якістю харчових продуктів і медикаментів (FDA) [68]. Фебуксостат, як і алопуринол, не рекомендується для використання у якості лікарського засобу для гіперурикемії через побічні дії [69, 70].

Топіроксостат (рис. 1.3.c) – структурно новий інгібітор ксантиноксидази гібридного типу [62]. Кінетика дослідження ферменту показує [67], що він

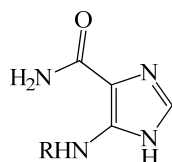
спочатку поводитья як інгібітор конкурентного типу, а потім утворює міцний комплекс з ХО через атом Мо-О-С ковалентного зв'язку.

Інгібітори ксантинооксидази можна класифікувати за структурою [3]:

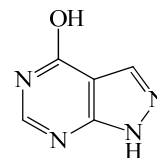
- Інгібітори, що мають 5-членне кільце в якості каркасу ядра
- Інгібітори, що мають 6-членне кільце в якості каркасу ядра
- Інгібітори з біциклічною структурою
- Інгібітори з трициклічною структурою

### Інгібітори, що мають 5-членне кільце в якості каркасу ядра

*Похідні імідазолу.* Одним із прикладів ефективних моноциклічних інгібіторів є сполуки імідазолу. Наявність 5-членного кільця вказує на його важливість при взаємодії з ферментом [71]. Сполуки можна розглядати як структурні аналоги алопуринолу (1.1–1.2), оскільки 4-карбамоїл-5-карбоксамідоімідазольний фрагмент може бути аліциклічною біоізостероною заміною для гіпоксантину (пурину). Також вони мають аліфатичні ланцюги, що стимулюють інгібувальну активність (табл. 1.1).



(1.1–1.2)



Алопуринол

Таблиця 1.1.

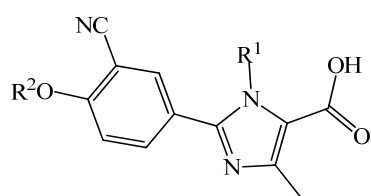
Значення  $IC_{50}$  інгібіторів похідних імідазолу\*

Сполука	R	$IC_{50}$ [мкМ]
<b>1.1</b>	$COCOO(CH_2)_4CH_3$	1,92
<b>1.2</b>	$COCOO(CH_2)_5CH_3$	1,11

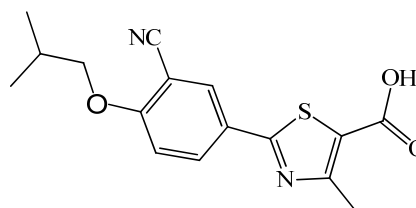
\*як референтну сполуку взято алопуринол,  $IC_{50} = 4,2$  мкМ

У дослідженнях [72] синтезували серію похідних імідазолу (1.3–1.15) як інгібіторів ксантинооксидази, які структурно схожі на фебуксостат, проте дещо оптимізовані [72]. Інгібітори 1.6–1.8 виявляють кращий ефект, ніж ряд інших

сполук; їх значення  $IC_{50}$  трохи нижче, ніж фебуксостату (табл. 1.2). Оскільки розгалуження алкоксигрупи в 4 положенні ідентичні з фебуксостатом, то, очевидно, більш високу активність виявляє саме гідроксильна група ( $R_1$ ), що, швидше за все, з'єднується через N-зв'язок (додатковий зв'язок з Thr1010) [72].



(1.3–1.15)



Фебуксостат

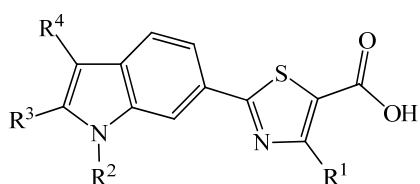
Таблиця 1.2.

Значення  $IC_{50}$  інгібіторів похідних імідазолу\*

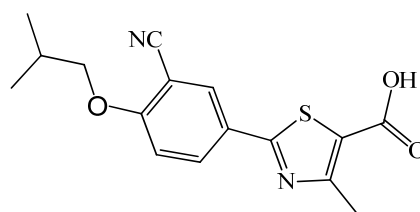
Сполука	$R^1$	$R^2$	$IC_{50}$ [мкМ]
<b>1.3</b>	ОН	CH <sub>3</sub>	0,550
<b>1.4</b>	ОН	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	0,130
<b>1.5</b>	ОН	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,170
<b>1.6</b>	ОН	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	0,003
<b>1.7</b>	ОН	CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	0,003
<b>1.8</b>	ОН	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,006
<b>1.9</b>	ОН	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,030
<b>1.10</b>	ОН	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	0,030
<b>1.11</b>	ОН	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	0,110
<b>1.12</b>	ОН	(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub>	1,200
<b>1.13</b>	ОН	CH <sub>2</sub> -(4-CH <sub>3</sub> )-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	0,110
<b>1.14</b>	OCH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1,500
<b>1.15</b>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> -(4-CH <sub>3</sub> )-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	1,100

\*як референтну сполуку взято фебуксостат,  $IC_{50} = 0,01$  мкМ

Похідні 1,3-тіазолу. Результати досліджень [73] свідчать, що гідрофобні й електронно-акцепторні групи у 1 і 3-положеннях індольного кільця і гідрофобний замісник у 4-положенні тіазольного кільця посилює інгібувальну активність ксантиноксидази, що відповідає фебуксостату (табл. 1.3). Молекулярне моделювання [73] показало основну взаємодію тіазолів на сайті зв'язування ХО; вони включають водень і йонні зв'язки між карбоксилатом інгібітора і Arg880, і Thr1010, а також водневий зв'язок між ціаногрупою інгібітора і Asn768. Серед ряду інгібіторів найкращий ефект виявила сполука **1.26**, порівняно з фебуксостатом [73].



(1.16–1.30)



Фебуксостат

Таблиця 1.3.

Значення IC<sub>50</sub> інгібіторів похідних 1,3-тіазолу\*

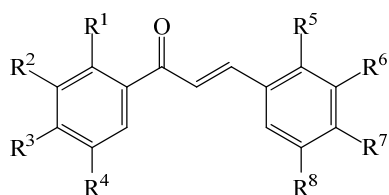
Сполука	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	IC <sub>50</sub> [мкМ]
<b>1.16</b>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	H	0,1100
<b>1.17</b>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	Cl	0,0057
<b>1.18</b>	CH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	Cl	0,0073
<b>1.19</b>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl	0,0160
<b>1.20</b>	CH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	NO <sub>2</sub>	0,0042
<b>1.21</b>	CH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>	H	NO <sub>2</sub>	0,0120
<b>1.22</b>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	CN	0,0055
<b>1.23</b>	H	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	CN	0,0044
<b>1.24</b>	CF <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	CN	0,8950
<b>1.25</b>	OCH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	CN	0,0900

1.26	CH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	CN	0,0035
1.27	CH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	CN	0,0107
1.28	CH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> F	H	CN	0,0049
1.29	CH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> OH	H	CN	0,0030
1.30	CH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>	H	CN	0,0090

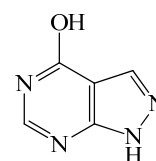
\*як референтну сполуку взято фебуксостат, IC<sub>50</sub> = 0,0043±0,0012 мкМ

### Інгібітори, що мають 6-членне кільце в якості каркасу ядра

*Похідні бензену.* Дослідження [74] сприяли ідентифікації хальконів, які виявляли інгібувальний ефект по відношенню до ксантинооксидази. Згідно структури активних хальконів видно, що для високої інгібувальної активності необхідно мінімум три гідроксильні групи (табл. 1.4). Аналіз взаємозв'язків між структурою та активністю в поєднанні з молекулярним стикуванням показав, що дві гідроксильні групи гідроксильованих хальконів утворюють водневі зв'язки з карбоксильними групами бічного ланцюга Glu802 та Glu1261, а карбонільний кисень в Н-зв'язку з гідроксильною групою Ser876, що пояснює необхідність катехолічного фрагмента. Похідне халькону, що має шість гідроксильних груп, **1.40**, може утворити додаткові водневі зв'язки з Thr1010 і Arg880 [74].



(1.31–1.40)



Алопуринол

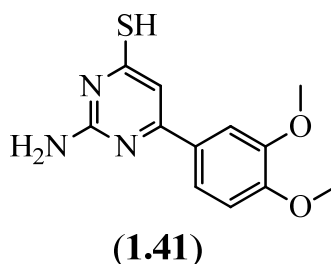
Таблиця 1.4.

Значення  $IC_{50}$  інгібіторів похідних бензену\*

Сполука	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>	R <sup>7</sup>	R <sup>8</sup>	$IC_{50}$ [мкМ]
<b>1.31</b>	H	OH	H	H	H	OH	OH	H	$5,3 \pm 1,0$
<b>1.32</b>	H	H	OH	H	H	OH	OH	H	$4,3 \pm 1,0$
<b>1.33</b>	OH	H	H	OH	H	OH	OH	H	$17,0 \pm 8,0$
<b>1.34</b>	H	OH	OH	H	H	OH	OH	H	$3,0 \pm 0,6$
<b>1.35</b>	H	OH	H	OH	H	OH	OH	H	$6,5 \pm 2,0$
<b>1.36</b>	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	$1,3 \pm 0,4$
<b>1.37</b>	H	OH	OH	H	OH	H	H	OH	$8,6 \pm 2,0$
<b>1.38</b>	OH	OH	OH	H	H	OH	OH	H	$1,2 \pm 0,2$
<b>1.39</b>	H	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	$18,0 \pm 3,0$
<b>1.40</b>	OH	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	$5,5 \pm 0,9$

\*як референтну сполуку взято алопуринол,  $IC_{50} = 0,2-50$  мкМ

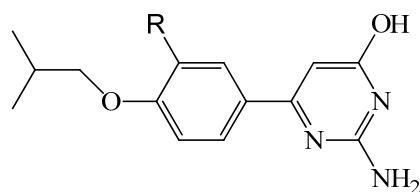
Похідні піримідину. У дослідженнях [75] було проведено віртуальний скринінг і подальші *in vitro* дослідження, які привели до відкриття нової платформи для інгібування ксантинооксидази. Каркас ізоцитозину утворює водневі зв'язки та  $\pi$ -взаємодії з ферментом, подібно до алопуринолу, проте з покращеною ефективністю.



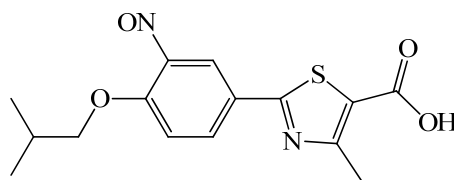
Сполука **1.41** має  $IC_{50} = 1,4 \pm 0,7$  мкМ, що значно більше алопуринолу ( $IC_{50} = 5,7 \pm 0,04$  мкМ). Але, зважаючи на токсичність даних сполук,



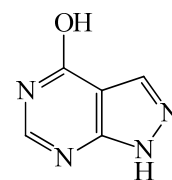
дослідження були припинені. Через деякий час вчені [76] провели оптимізацію сполуки **1.41** та знайшли перспективні інгібітори на основі ізоцитозину (табл. 1.5). Найкращу активність *in vivo* при внутрішньочеревному застосуванні виявила сполука **1.45**.



(1.42–1.47)



Фебуксостат



Алопуринол

Таблиця 1.5.

Значення IC<sub>50</sub> інгібіторів похідних піримідину\*

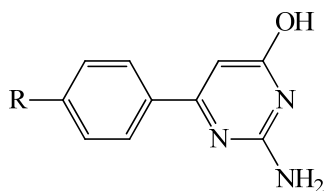
Сполука	R	IC <sub>50</sub> [мкМ]
<b>1.42</b>	S(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	1,63 ± 0,08
<b>1.43</b>	SCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2,44 ± 0,20
<b>1.44</b>	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	2,10 ± 0,19
<b>1.45</b>	OCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,60 ± 0,07
<b>1.46</b>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	0,31 ± 0,08
<b>1.47</b>	OC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	2,47 ± 1,43

\*як референтні сполуки взято фебуксостат з IC<sub>50</sub> = 0,03 мкМ та алопуринол, IC<sub>50</sub> = 4,19 мкМ

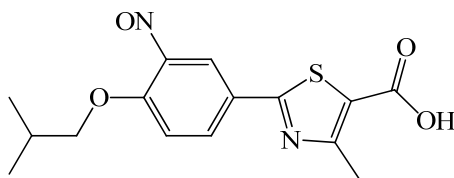
Враховуючи структуру фебуксостату, найпотужніші сполуки були отримані шляхом введення акцепторів Н-зв'язку в 3 положення фенільного кільця, а сполука **1.51**, до складу якого входить ціаногрупа є ефективнішою за фебуксостат (табл. 1.6).

Варто відзначити, що сполуки (**1.48–1.51**) мають за основу ізоцитозинове ядро, яке можна розглядати як аналог алопуринолу, проте структура **1.51** повністю відповідає фебуксостату з лактамним

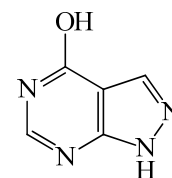
фрагментом, що є біоізостеричною заміною карбоксилату. Вчені стверджують [76], що даний фрагмент може бути кращим за карбоксилат, оскільки можливе утворення додаткових водневих зв'язків з Thr1010 і Arg880, а також групи NH<sub>2</sub> з Glu802.



(1.48–1.51)



Фебуксостат



Алопуринол

Таблиця 1.6.

Значення IC<sub>50</sub> інгібіторів похідних піримідину\*

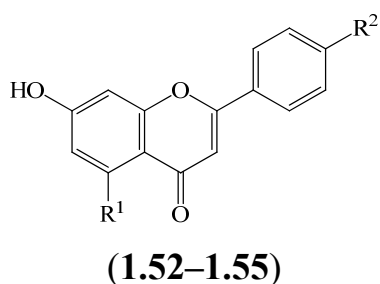
Сполука	R	IC <sub>50</sub> [мкМ]
<b>1.48</b>	CONH <sub>2</sub>	1,92 ± 0,7
<b>1.49</b>	OCH <sub>3</sub>	0,95 ± 0,65
<b>1.50</b>	NO <sub>2</sub>	0,14 ± 0,03
<b>1.51</b>	CN	0,02 ± 0,00

\*як референтні сполуки взято фебуксостат з IC<sub>50</sub> = 0,03 мкМ та алопуринол, IC<sub>50</sub> = 5,77 мкМ

### Інгібітори з біциклічною структурою

*Похідні бензопірану.* Флавоноїди – біологічно і фармакологічно активні сполуки. Серед них, флавоноли й флавоноли показали помірну ХО інгібувальну активність [6, 77–83]. Для того, щоб інгібування було якомога кращим, виявили деякі структурні вимоги: у 5 і 7 положеннях повинні знаходитися гідроксильні групи, подвійний зв'язок між другим і третім атомами Карбону. Гідроксильна група, яка знаходиться при С-6 знижує інгібувальну дію. Флавоноли показують менший інгібувальний вплив, ніж флавоноли. У

дослідженнях [77] доведено, що сполуки **1.52–1.55** виявляють сильніше інгібування, ніж еталонний кверцетин (табл. 1.7).



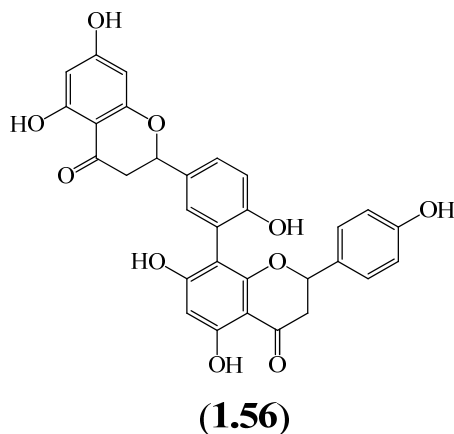
Таблиця 1.7.

Значення  $IC_{50}$  інгібіторів похідних бензопірану\*

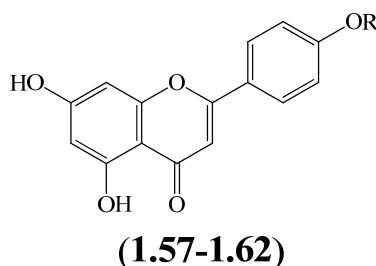
Сполука	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	$IC_{50}$ [мкМ]
<b>1.52</b>	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	0,3470
<b>1.53</b>	OH	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	0,0136
<b>1.54</b>	OH	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	0,0908
<b>1.55</b>	OH	OCH <sub>3</sub>	0,2200

\*як референтну сполуку взято кверцетин,  $IC_{50} = 0,383$  мкМ

Насіння *Semecarpus Anacardium* L. використовується для лікування подагри та запальних захворювань у традиційній індійській медицині. У дослідженнях [57] показано, що етилацетатна фракція цього насіння має біфлавонову сполуку тетрагідроаментофлавонону (**1.56**), яка відповідає за високу інгібувальну XO активність. Ефективність інгібування сполуки **1.56** дорівнює 0,092 мкМ. Вона є неконкурентним інгібітором ксантинооксидази. Сполука має шість гідроксильних груп, дві з яких у 5 і 7 положеннях, та карбонільна група в 4 положенні. Від інших флавоноїдів даний інгібітор відрізняють висока молекулярна маса, велика кількість гідроксильних груп, що й може бути причиною його неконкурентного механізму інгібування [57].



Вчені [78] синтезували серію похідних апігеніну, шляхом приєднання карбоксиалкільної групи до 4'-, 5- або 7-гідроксильних груп. Дослідження показали, що активність інгібітора збільшувалася модифікаціями в положенні 4' (табл. 1.8) і зменшувалася за допомогою аналогічних модифікацій в положеннях 5 і 7 ( $IC_{50} > 100$  мкМ).



Таблиця 1.8.

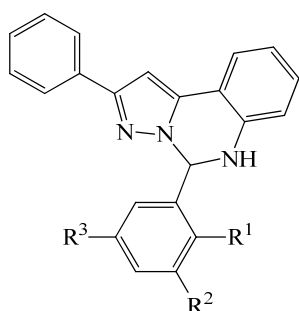
Значення  $IC_{50}$  інгібіторів похідних бензопірану\*

Сполука	R	$IC_{50}$ [мкМ]
<b>1.57</b>	$CH_2COOH$	0,820
<b>1.58</b>	$(CH_2)_3COOH$	0,600
<b>1.59</b>	$(CH_2)_4COOH$	0,220
<b>1.60</b>	$(CH_2)_5COOH$	0,320
<b>1.61</b>	$(CH_2)_6COOH$	0,098
<b>1.62</b>	$(CH_2)_7COOH$	0,250

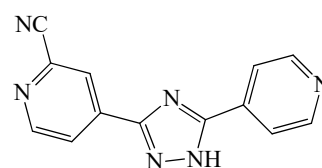
\*як референтну сполуку взято алопуринол,  $IC_{50} = 2,9$  мкМ

## Інгібітори з трициклічною структурою

Похідні піразоло-хіназоліну. Під час досліджень [45, 84] було синтезовано сполуки-інгібітори ксантинооксидази, які дещо нагадують топіроксостат. Інгібувальну активність вчені збільшували шляхом введення додаткового фенільного замісника. Сполука **1.63** виявляє краще інгібування (табл.1.9) [85], проте не має важливих особливостей, які присутні в топіроксостаті. Тому схожий механізм дії з останнім малоймовірний.



(1.63–1.64)



Топіроксостат

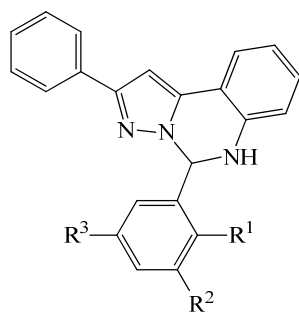
Таблиця 1.9.

Значення  $IC_{50}$  інгібіторів похідних піразоло-хіназоліну\*

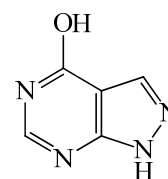
Сполука	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	$IC_{50}$ [мкМ]
<b>1.63</b>	ОН	Cl	Cl	10,96
<b>1.64</b>	H	NO <sub>2</sub>	H	20,89

\*як референтну сполуку взято алопуринол,  $IC_{50} = 31,62$  мкМ

Похідні ксантонів. Було синтезовано [86] новий клас похідних ксантонів та оцінено їх з точки зору активності до ксантинооксидази (табл. 1.10). У будові структури **1.65** бензольне кільце замінювали на інші радикали, що, у свою чергу, покращило ефект інгібування ксантинооксидази. Передбачалося, що дані сполуки зв'язуються з активною ділянкою молібден-птеринового центру ферменту й майже повністю перекривають птерин.



(1.65–1.72)



Алопуринол

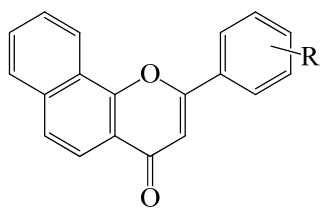
Таблиця 1.10.

Значення  $IC_{50}$  інгібіторів похідних ксантону\*

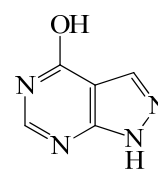
Сполука	R	$IC_{50}$ [мкМ]
<b>1.65</b>	–	21,73 ± 1,52
<b>1.66</b>	2-CH <sub>3</sub>	7,08 ± 0,65
<b>1.67</b>	3-CH <sub>3</sub>	13,56 ± 0,28
<b>1.68</b>	4-CH <sub>3</sub>	5,73 ± 0,10
<b>1.69</b>	2-Cl	6,41 ± 0,15
<b>1.70</b>	4-Cl	4,70 ± 0,12
<b>1.71</b>	4-Br	20,06 ± 1,37
<b>1.72</b>	4-CN	4,67 ± 0,35

\*як референтну сполуку взято алопуринол,  $IC_{50} = 24,40 \pm 0,50$  мкМ

*Похідні нафтопірану.* У дослідженнях [87] показали, що синтезовані сполуки мають активність зі змішаним типом інгібування. Заміщення галогену та нітрогрупи в *o*- та *n*-положеннях фенільного кільця сприяла підвищенню інгібувальної дії (табл. 1.11). Тому структури з заміщеними фенільними кільцями виявилися більш активними, ніж незаміщені.



(1.73–1.75)



Алопуринол

Таблиця 1.11.

Значення  $IC_{50}$  інгібіторів похідних нафтопірану\*

Сполука	R	$IC_{50}$ [мкМ]
<b>1.73</b>	2-F	4,94
<b>1.74</b>	4-F	0,62
<b>1.75</b>	4-NO <sub>2</sub>	1,95

\*як референтну сполуку взято алопуринол,  $IC_{50} = 8,69$  мкМ

## РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

### 2.1. Матеріали

У роботі було використано ксантиноксидазу з коров'ячого молока (компанія – Sigma-Aldrich). Фермент з активністю 0,4 од./мг білка знаходився у вигляді суспензії в 2,3 М сульфаті амонію, що також вміщував 1 мМ натрій саліцилату.

Азометинові похідні *para*-амінобензойної кислоти були синтезовані в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАН України під керівництвом д.х.н., професора В.С. Броварця. Структуру синтезованих сполук доведено за допомогою елементного аналізу, мас-спектроскопії та  $^1\text{H}$ -ЯМР,  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопії.

### 2.2. *In silico* скринінг бази даних хімічних сполук як інгібіторів ксантиноксидази

Віртуальний скринінг (*in silico*) хімічних баз даних успішно застосовується для ідентифікації потенційних сполук-лідерів, які потім можуть бути досліджені *in vitro*. У подальшому знайдені хімічні структури оптимізують для покращення їх біологічного ефекту. Даний підхід використовують для пошуку багатьох біоактивних сполук, у тому числі й інгібіторів ксантиноксидази [88, 89].

Під час віртуального скринінгу зазвичай використовують метод молекулярного докінгу. Даний метод дозволяє передбачити переважний спосіб зв'язування ліганда з білком відомої тривимірної структури. Комплекс ліганд-рецептор може бути використано для дослідження зв'язування конформацій, характеристики ключових міжмолекулярних взаємодій, характеристики невідомих сайтів зв'язування, зв'язування конформаційних змін, спричинених лігандом, тощо [90]. За допомогою спеціальної функції програма для докінгу приблизно дає оцінку спорідненості молекули з білком і представляє її у вигляді розрахованої вільної енергії зв'язування ( $\Delta G$ , ккал/моль), що є основою ранжування структур з бази даних.



База хімічних структур, надана д.х.н., проф. В.С. Броварцем, містила 65 691 сполуку. Підготовка сполук до докінгу проходила в два етапи. До попередньої підготовки бази даних входило видалення сумішей і солей, фільтр відповідно до елементів H, C, N, O, F, Br, I, Cl, P, S за допомогою програми KNIME. Після чого, у цій же програмі, базу відфільтрували відповідно до правила Ліпінського: молекулярна маса не більше 500, ліпофільність  $\log P \leq 5$ , не більше 5 атомів-донорів і 10 атомів-акцепторів водневого зв'язку.

Другий етап включав обробку лігандів у програмі Open Babel. Для початку, SDF файл, що вміщував 47 100 структур, розділили на сполуки (файли з розширенням MOL2). Одержані файли було почергово мінімізовано в програмі Open Babel при рН 7,4 в силовому полі MMFF94s. Після цього, дані файли конвертували в PDBQT з використання файлу `prepare_ligand4.py` програми MGLTools. Таким чином, PDBQT файли були використані в подальшому процесі стикування в активному центрі ланцюга С кристалу коров'ячої ксантинооксидази (PDB код 1FIQ).

Білкову структуру ксантинооксидази було завантажено з RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>) та підготовлено до докінгу за допомогою програми Discovery Studio 3.5 та MGLTools. Молекулярний докінг здійснено в область активного центру ланцюга С коров'ячої ксантинооксидази (PDB код 1FIQ). Під час підготовки до скринінгу було збережено файли в форматі \*.pdbqt та видалено ліганди, молекули води з кристалу фермента. Молекулу *HOH1457* не видаляли, оскільки вона може бути залучена до ферментного каталізу. Каталітично важливий атом Оксигену молібден-птеринового кофактору був замінений молекулою води [54]. Віртуальний скринінг сполук як інгібіторів коров'ячої ксантинооксидази здійснено в програмі AutoDock Vina.

Отриманий результат стикування містив як співставлення одержаних значень розрахованої вільної енергії зв'язування для окремих сполук, так і оцінку отриманої моделі зв'язування. У результаті аналізу було враховано

спосіб розташування ліганду, його конформацію та взаємозв'язки з близькими амінокислотними залишками.

### **2.3. *In vitro* дослідження азометинових похідних *para*-амінобензойної кислоти як інгібіторів ксантиноксидази**

У дослідженні сполук як інгібіторів ксантиноксидази було використано фермент з коров'ячого молока фірми Sigma-Aldrich. Реакційна суміш для тестування інгібувального впливу азометинів вміщувала 50 мМ фосфатного буферу (рН 7,4), 50 мкМ ксантину, близько 0,005 одиниць/мл ксантиноксидази, інгібітор в концентрації від 0,1 мкМ до 150 мкМ, 0,1 мМ ЕДТА та 1 об. % ДМСО. Модельну систему термостатували протягом 5 хвилин при 25 °С після чого реакцію розпочинали додаванням ксантиноксидази. Швидкість ферментативного перетворення ксантину детектували спектрофотометрично за зміною оптичної густини при довжині хвилі 293 нм. Для перерахунку отриманих результатів було використано коефіцієнт молярної екстинції сечової кислоти  $12,2 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ .  $IC_{50}$ ,  $K_i$ ,  $K_i'$  та  $K_m$  подано як значення  $\pm$  середнє відхилення, тоді як нахил Хіла подано як значення  $\pm$  стандартна помилка.

### **2.4. Дослідження антиоксидантних властивостей МДА тестом**

Здатність сполук нейтралізувати гідроксильні радикали вивчали з використання модифікованого МДА тесту [91]. Реакційна суміш містила 50 мкМ хлориду заліза (II), 100 мкМ ЕДТА, 50 мМ фосфатного буферу (рН 7,4), 0,3 мМ сполуки, 2,8 мМ 2-дезоксирибози, воду та 2,8 мМ пероксиду водню. Модельну систему термостатували 1 годину при 37 °С після чого до неї додавали 1 мл 2,8% водного розчину трихлороцетової кислоти та 1 мл 1% розчину тіобарбітурової кислоти в 50 мМ гідроксиду натрію. Отриману суміш термостатували на водяній бані протягом 20 хвилин при 80-100 °С. Аналіз проводили спектрофотометрично за концентрацією продуктів реакції тіобарбітурової кислоти з малоновим діальдегідом при довжині хвилі 532 нм.

## 2.5. Дослідження кінетики інгібування ксантиноксидази

Перед проведенням експерименту сполуку розчиняли у ДМСО. Потім інгібітор з необхідною концентрацією додавали в реакційну суміш, яка містила 50 мМ фосфатного буферу з рН 7,4, 0,01 мМ ЕДТА, 1 об. % ДМСО та ксантин як субстрат. Концентрація ксантину була наближена до значення  $K_m$  ферментів, що досліджувались. Термостатування суміші проходило протягом 5 хвилин за температури 25 °С. Фермент вносили в суміш перед вимірюваннями швидкості окиснення субстрату, яку детектували за зміною абсорбції при довжині хвилі 293 нм. У реакційній суміші ферментна концентрація становила 2–6 мкМ.

Виходячи з результатів аналізу кінетики накопичення продукту реакції розраховували значення  $IC_{50}$ , коефіцієнт Хіла, константу Міхаеліса, максимальну швидкість ферментативної реакції та константу інгібування. Зважаючи на дані параметри зроблено висновки стосовно ефективності інгібіторів, їх вибірковості та типу інгібування (конкурентний, неконкурентний, змішаний чи безконкурентний).

## 2.6. Методи кінетичного аналізу

За проходженням ферментативних реакцій здійснювали контроль вимірюванням концентрації продукту спектрофотометричним методом. Дослідження ферментативних реакцій проходило при:

$$[S]_0 \gg [E]_0 \text{ та } [S]_0 \leq K_m$$

де  $[E]_0$  та  $[S]_0$  – початкові концентрації ферменту та субстрату;  $K_m$  – константа Міхаеліса. Виходячи з цього створені умови стаціонарності, при яких концентрація проміжного комплексу фермент-субстрат була постійною, а, отже, постійною була й каталітична швидкість реакцій.

Ферментативну активність визначали за допомогою прямої лінії тренду, що була дотично проведена до лінійної частини кінетичної кривої, яка показує накопичення продукту окисно-відновної реакції залежно від часу. Дані залишкової ферментативної активності ( $[S]_0 = K_m$ ) при різних концентраціях

наносили на графік залежності. З одержаної кривої визначали  $IC_{50}$  та коефіцієнт Хіла. Значення  $IC_{50}$  відповідають концентраціям інгібіторів за яких ферментативна активність зменшувалася на 50%. Коефіцієнт Хіла показує мінімальне число молекул інгібітора, які зв'язуються з однією молекулою ферменту.

Кінетичні константи  $V_{max}$  та  $K_m$  (у системі відсутній інгібітор), а також  $V'_{max}$  та  $K'_m$  (у системі наявний інгібітор) визначали за допомогою залежності швидкості ферментативної реакції від концентрації субстрату в обернених подвійних координатах Лайнуївера-Берка (графік залежності  $1/V$  від  $1/[S]$ ). Для побудови даного графіка використовували кінетичні дані, що були одержані з серії вимірювань, які проводили в умовах пропорційного зменшення концентрації субстрату. Таким чином, отримали пряму при відсутності інгібітора та серію прямих при його наявності за різних концентрацій. Вид графіка свідчив про тип інгібування.

У роботі представлено змішаний тип інгібування. Константу інгібування  $K_i$  можна визначити за рівнянням (2.1) і в координатах залежності  $K'_m$ , від  $[I]$ .

$$K'_m = K_m \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \quad (2.1)$$

## 2.7. Методи розрахунків та статистичного аналізу

Результати досліджень було обраховано з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel та GraphPad Prism 6.

Попередні значення  $IC_{50}$  отримали, виходячи з серії вимірювань залишкової ферментативної активності за різних концентрацій інгібітора, які наносили на відповідний графік (залежність відсотка активності від концентрації інгібітора) та аналізували методом регресійного аналізу з використанням лінії тренду, що можна описати рівнянням:

$$y = -ax + b \quad (2.2)$$

Виходячи з рівняння (2.2) визначали значення  $IC_{50}$ :

$$IC_{50} = \frac{50-b}{a} \quad (2.3)$$

Лінію тренду намагалися проводити в області 50% активності.

Середнє значення та стандартне відхилення із серії досліджень попередніх значень  $IC_{50}$  були розраховані за допомогою Microsoft Excel.

Стандартне відхилення (S) було обчислено за формулою:

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X-M)^2}{n-1}} \quad (2.4)$$

Для окремих інгібіторів значення  $IC_{50}$  та коефіцієнт Хіла розраховувались за допомогою програми GraphPad Prism 6 за чотирьох параметровим рівнянням нелінійної регресії:

$$Y = \frac{Bottom + (Top - Bottom)}{(1 + 10^{((LogIC_{50} - X) \cdot HillSlope)})}; \quad (2.5)$$

де X – логарифм концентрації інгібітора;

Y – залишкова ферментна активність;

Top і Bottom – верхнє та нижнє плато;

HillSlope – коефіцієнт Хіла.

За допомогою Microsoft Excel з графіків Лайнуівєра-Берка розраховували константи інгібування. Для цього через серію точок, які були отримані при різних концентраціях субстрату, проводили лінію тренда (рис. 2.1). Згідно отриманих даних лінійного рівняння (2.2) обчислювали  $V_{max}$ ,  $V'_{max}$ ,  $K_m$  та  $K'_m$  за рівнянням (2.6) та (2.7), а також  $K_i$  за рівнянням (2.1).

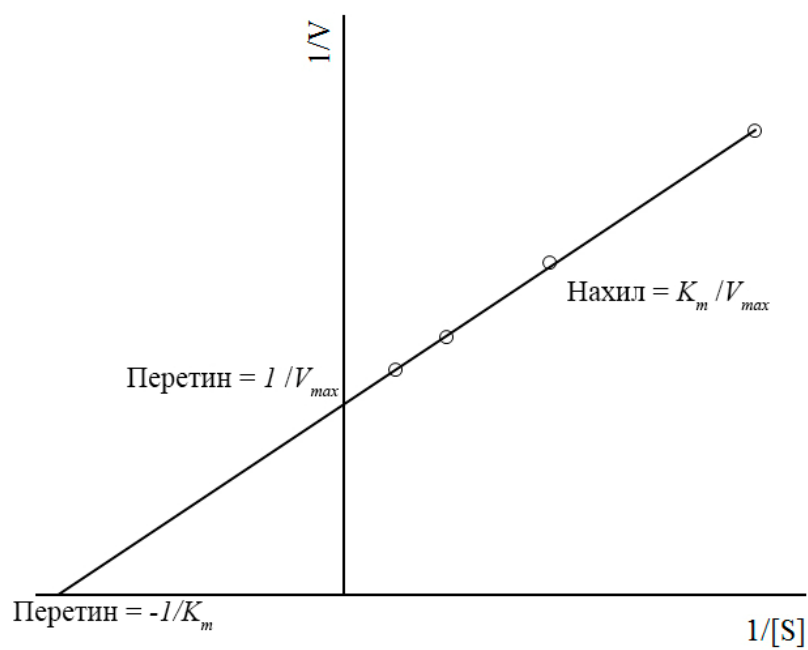


Рис. 2.1. Графік Лайнуівера-Берка та кінетичні параметри, що з нього можна визначити.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot [S] + \frac{1}{V_{max}} \quad (2.6)$$

$$K_m = \frac{K_m}{V_{max}} / \frac{1}{V_{max}} \quad (2.7)$$

## РОЗДІЛ III. ПОТЕНЦІЙНІ ІНГІБІТОРИ КСАНТИНОКСИДАЗИ

### 3.1. Пошук *in silico* нових інгібіторів ксантиноксидази

Комп'ютерний скринінг є широко застосовуваним методом у пошуку та дослідженні нових або уже існуючих структур. Одна з основних обчислювальних методологій була впроваджена на початку 1980-х років і залишається високоактивним напрямком досліджень, суть якого полягає у приєднанні невеликих молекул до місць зв'язування білків [92, 93]. Док-станція використовується в першу чергу як інструмент швидкої ідентифікації. Проте подібні обчислення часто також використовуються пізніше під час оптимізації сполук, коли є можливість внести зміни до відомих активних структур і передбачити її активність [94].

Молекулярний докінг допомагає передбачити положення, орієнтацію і конформації молекул-лігандів у межах ділянки зв'язування. За рахунок цього можна зрозуміти взаємодії, які будуть відбуватися між лігандом і його рецептором. Також спрогнозувати афінність і методи оптимізації ліганду [88, 95].

Існують два основні підходи до віртуального скринінгу [96]: ліганд-орієнтований підхід і рецептор-орієнтований підхід. Підхід на основі ліганду спрямований на виявлення молекул із фізичною та хімічною подібністю (на основі фармакофору, дескриптора) з відомими лігандами, які взаємодіють із мішенню. Цей підхід обмежує різноманітність структур, оскільки вони піддаються впливу властивостей відомих лігандів.

Віртуальний скринінг на основі рецепторів (стикування білка-ліганду, активно-орієнтовані фармакофори) спрямований на використання молекулярного розпізнавання між лігандом та білком-мішенню. Його використовують для того, щоб вибрати хімічні структури, які сильно зв'язуються з активними ділянками біологічних мішеней, для яких відомі тривимірні структури. Це більш відкритий підхід, він дозволяє ідентифікувати структурно нові ліганди, які можуть мати подібні взаємодії з відомими лігандами [96, 97].

Рецептор-орієнтований підхід успішно застосовується під час пошуку біоактивних сполук, у тому числі й інгібіторів ксантиноксидази [98].

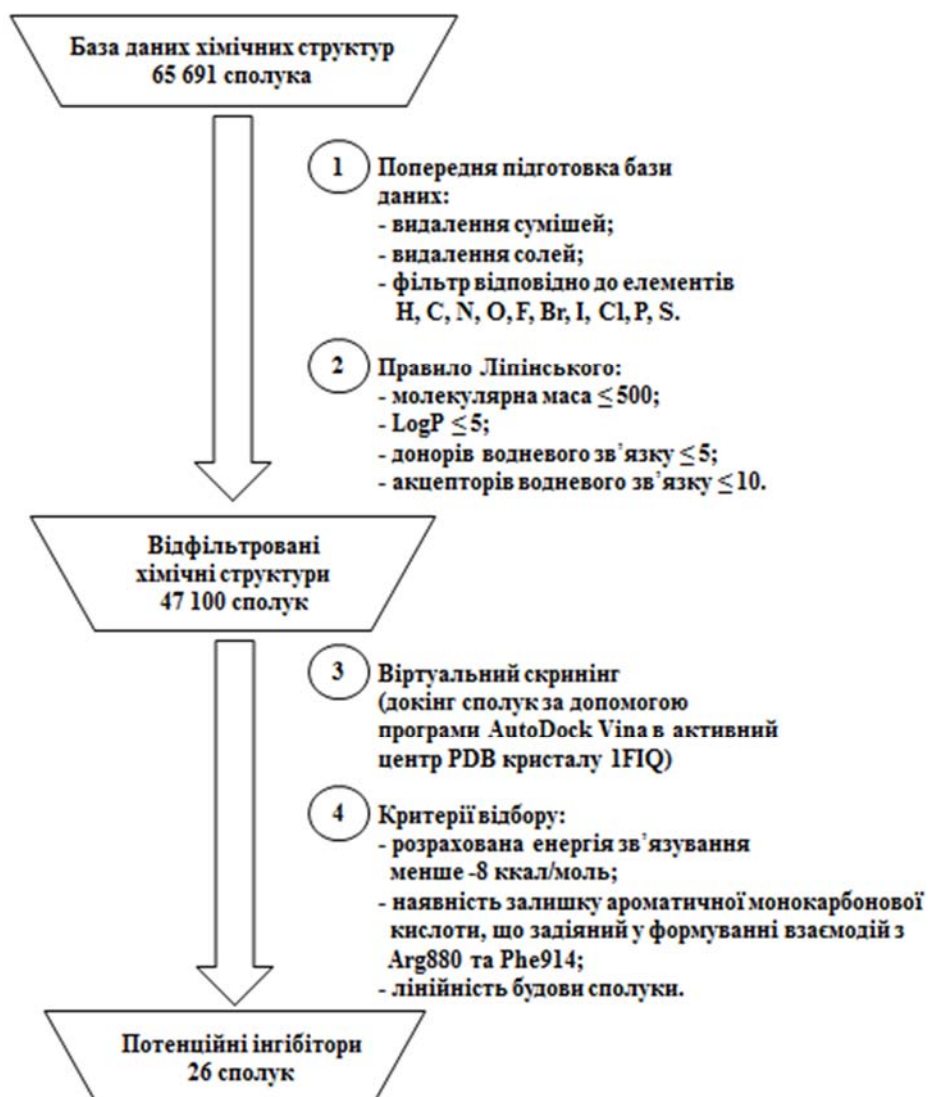


Рис. 3.1. Стратегія ідентифікації потенційних інгібіторів ксантиноксидази методом комп'ютерного скринінгу бази хімічних структур.

Попередню підготовку бази хімічних структур (пункт 1 та 2 на рис. 3.1) здійснено за допомогою аналітичної платформи KNIME. Надалі використано молекулярний докінг (пункт 3 на рис. 3.1), що є структурно орієтованим підходом, який моделює розташування та взаємодію хімічної сполуки в активному центрі ферменту або на поверхні білка-мішені. За допомогою спеціальної функції докінг-програма наближено оцінює спорідненість



молекули з білком і подає її у вигляді розрахованої вільної енергії зв'язування ( $\Delta G$ , ккал/моль), що і є основою ранжування структур з бази даних.

У результаті проведеного дослідження нами було відібрано 26 сполук, що характеризувались:  $\Delta G$  менше -8 ккал/моль; наявністю залишку ароматичної монокарбонової кислоти, що безпосередньо задіяний у формуванні взаємодій з Arg880 та Phe914; лінійністю будови, що забезпечувала проходження сполуки в активний центр. Здебільшого, відібрані за зазначеними критеріями сполуки належать до похідних *n*-амінобензойної кислоти, ізоксазол-3-карбонової кислоти, фуран-2-карбонової кислоти та бензофуран-2-карбонової кислоти (рис. 3.2).

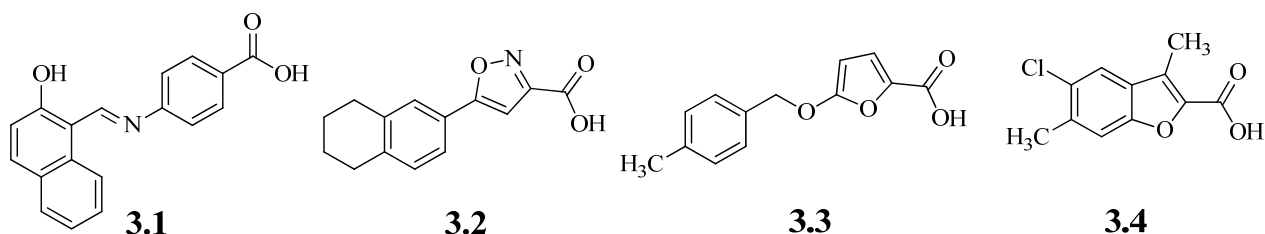


Рис. 3.2. Структури сполук, які було відібрано *in silico* як потенційні інгібітори ксантинооксидази. Значення  $\Delta G$  складає -9,8 ккал/моль, -9,5 ккал/моль, -8,5 ккал/моль та -8,3 ккал/моль для сполук **3.1**, **3.2**, **3.3** та **3.4**, відповідно.

Відповідно до отриманої моделі зв'язування (рис. 3.3), сполука **3.1** займає каталітичний центр ксантинооксидази зі значенням розрахованої вільної енергії зв'язування -9,8 ккал/моль. Карбоксильна група залишку *n*-амінобензойної кислоти і атом азоту залучені до формування водневих зв'язків з Arg880 та Ser876, відповідно, тоді як ароматичне кільце забезпечує  $\pi$ - $\pi$  взаємодію з Phe914. Гідроксильна група нафталенового залишку залучена до водневого зв'язку з Ser876. Комплекс додатково стабілізується за рахунок електростатичних, гідрофобних та Ван-дер-Вальсових взаємодій з Leu648, Phe649, Lys771, Leu873, Phe1009, Val1011 та Leu1014.

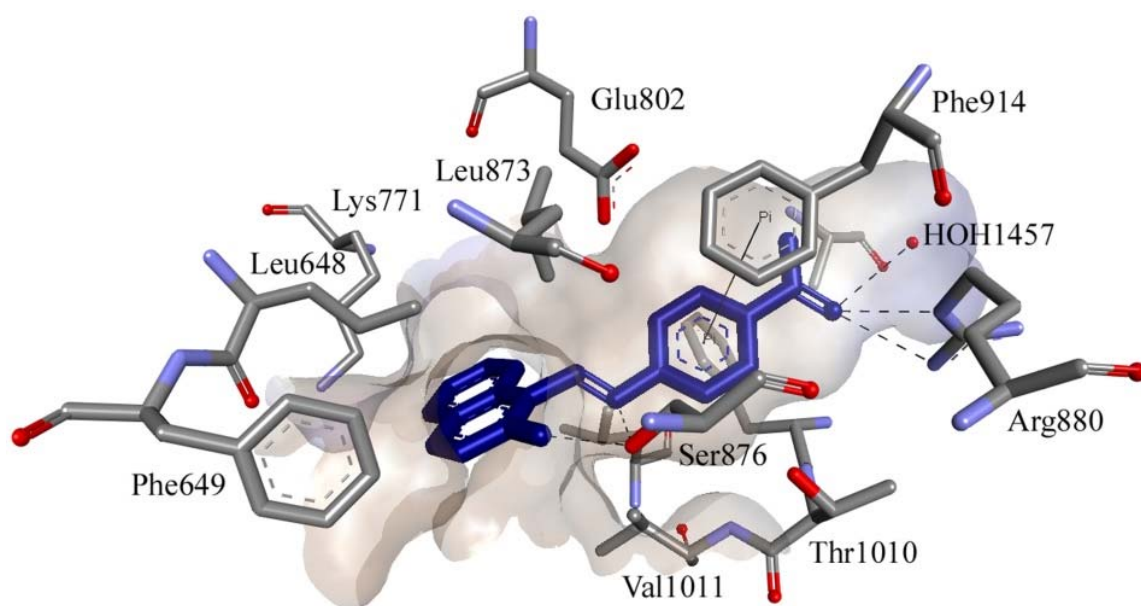


Рис. 3.3. Моделі зв'язування сполуки **3.1** в активному центрі ксантиноксидази.

Як і сполука **3.1**, похідна ізоксазолу **3.2** (рис. 3.4) взаємодіє з Arg880. Крім того, фрагмент ізоксазолкарбонової кислоти формує водневі взаємодії з Thr1010 та молекулою води, що імітує каталітичну гідроксильну групу молібденового кофактору.

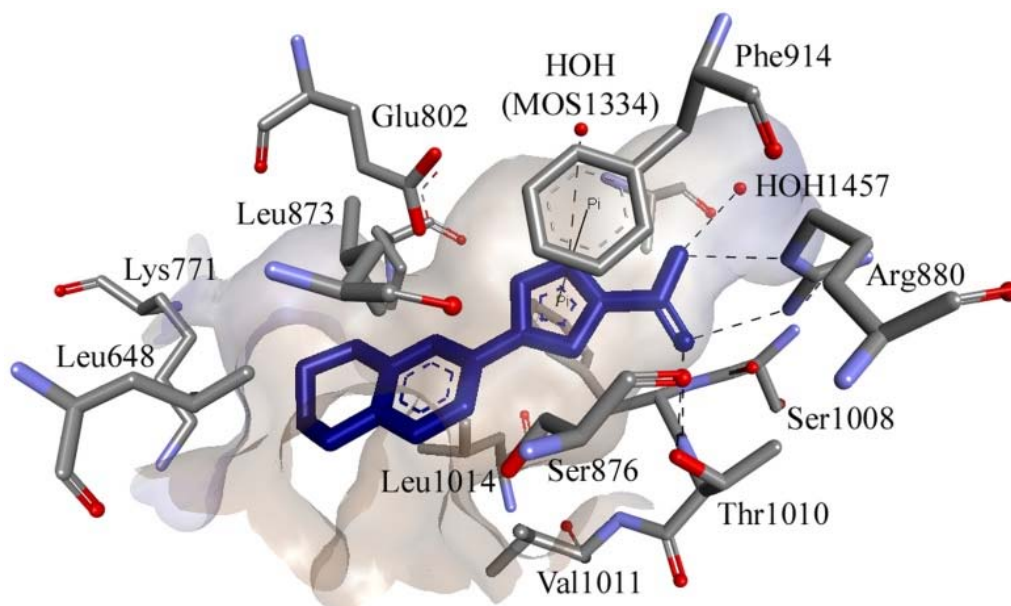


Рис. 3.4. Моделі зв'язування сполуки **3.2** в активному центрі ксантиноксидази.

Таким чином, на підставі проведеного комп'ютерного скринінгу бази хімічних структур було знайдено сполуки, що можуть бути інгібіторами ксантиноксидази. Попередні дослідження *in vitro* сполуки **3.1** та її структурних аналогів показали активність потенційних інгібіторів у мікромольному діапазоні концентрацій.

### **3.2. АзOMETинові похідні *para*-амінобензойної кислоти як інгібітори ксантиноксидази**

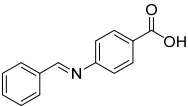
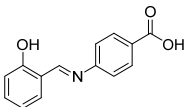
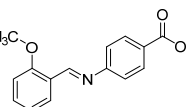
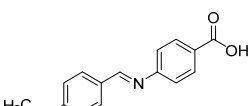
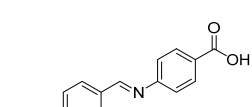
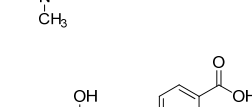
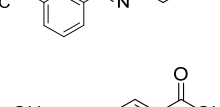
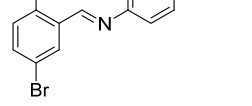
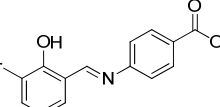
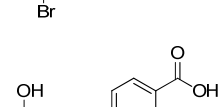
*Para*-амінобензойна кислота належить до фізіологічно активних речовин і виконує ряд функцій, які є життєво необхідними в організмі людини. Кислота та її похідні на даний час відіграють важливу роль у медицині, фармакології (як вітамін B<sub>10</sub>) тощо.

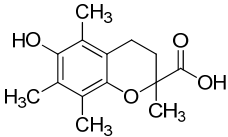
Більшість похідних *para*-амінобензойної кислоти мають фармакологічні властивості. АзOMETини отримали значний інтерес через їх антимікробні [99–101], антибактеріальні [100], протипухлинні [102], знеболюючі та протизапальні [103], а також антиоксидантні [104, 105] властивості. Виходячи зі структурного різноманіття азOMETинових похідних *para*-амінобензойної кислоти, їх низької токсичності, даний клас речовин особливо підходить для конструювання на їх платформі потенційних інгібіторів, у тому числі й ксантиноксидази [106].

Нами було досліджено азOMETинові похідні *para*-амінобензойної кислоти як інгібітори ксантиноксидази. Сполуки **3.6–3.14** синтезовані к.х.н. С.Г. Пільо в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАН України у відділі біоактивних азотовмісних гетероциклічних основ.

Таблиця 3.1.

АзOMETинові похідні *para*-амінобензойної кислоти як інгібітори  
ксантинооксидази та антиоксиданти

Сполука	Структура	Антиоксидантна активність, % *	IC <sub>50</sub> , мкМ
3.5		74±2	> 120
3.6		Н.В.**	23±6
3.7		75±2	> 120
3.8		72±1	105±11
3.9		52±7	30±9
3.10		Н.В.	25±5
3.11		60±3	18±3
3.12		70±1	11±2
3.13		72±1	6,4±1,7
3.14		Н.В.	4,2±1,0

Тролокс		46±4	
---------	---	------	--

\* Антиоксидантну активність визначали за допомогою МДА-тесту при концентрації сполук та тролоксу 300 мкМ; \*\* антиоксидантна активність не визначалась через погану розчинність сполук в модельній системі.

Антиоксидантну активність азометинів **3.5**, **3.7–3.9**, **3.11–3.13** оцінювали в модельній системі з використанням модифікованого тесту на малоновий діальдегід (МДА-тест) [91]. Здатність сполук **3.5**, **3.7**, **3.8**, **3.12** та **3.13** нейтралізувати гідроксильні радикали перевершила антиоксидантні властивості тролокса, який був використаний як референс-препарат. Антиоксидантні властивості цих сполук виявились співмірними і становили близько 70% при концентрації азометинів в реакційній суміші 300 мкМ. Дещо нижчою здатністю нейтралізувати гідроксильні радикали характеризувались сполуки **3.9** та **3.11** зі значеннями 52% та 60%, відповідно.

Інгібувальну активність азометинів **3.6–3.14** оцінювали *in vitro* з використанням ксантинооксидази з коров'ячого молока, яка має 90% амінокислотної ідентичності з ферментом печінки людини [107]. Наведені значення  $IC_{50}$  в табл. 3.1 є концентраціями сполук, що знижували ферментативну активність ксантинооксидази на 50% при концентрації субстрату 50 мкМ.

Аналіз залежності структура-активність вказує на те, що наявність 2-гідроксифенільного фрагменту в структурі інгібітора сприяє комплексоутворенню з ксантинооксидазою. Так, сполука **3.6** інгібує активність ферменту зі значенням  $IC_{50}$  23 мкМ, тоді як азометинова похідна **3.5** була досить слабким інгібітором цього ферменту. Заміна гідроксильної групи в структурі азометину **3.6** на метокси-групу привела до зниження спорідненості сполуки **3.7** до ксантинооксидази. Переміщення метокси-групи в *пара*-положення фенільного фрагменту (сполука **3.8**) не покращило інгібувальний

ефект. Тільки азометинова похідна **3.9** з диметиламіновою групою в *para*-положенні фенільного фрагменту продемонструвала значення  $IC_{50}$  30 мкМ.

Зважаючи на вище викладене, наступні зусилля були зосереджені на модифікаціях 2-гідроксифенільного фрагменту сполуки **3.6**. Азометинова похідна **3.10**, що поруч з гідроксильною групою в своїй структурі містила метоксигрупу, характеризувалася значенням  $IC_{50}$  25 мкМ. Введення в структуру 2-гідроксифенільного замісника сполуки **3.6** атома бромю (сполука **3.11**) мало покращило інгібувальний ефект, тоді як бромовання в положення 3 і 5 (сполука **3.12**) дещо покращило інгібувальну дію. Кращих інгібувальних властивостей азометинових похідних вдалося досягти шляхом введення нітрогрупи в положення 5 (сполука **3.13**) або модифікацією 2-гідроксифенільного фрагменту до 2-гідроксинафтильного (сполука **3.14**). Ці азометини продемонстрували значення  $IC_{50}$  6,4 мкМ та 4,2 мкМ, відповідно.

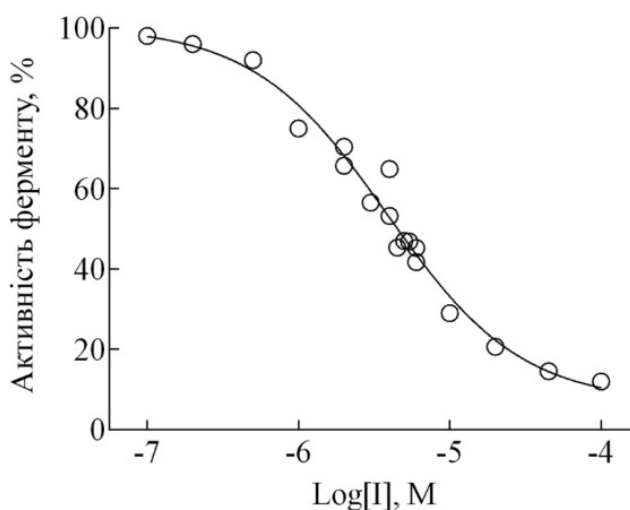


Рис. 3.5. Дозо-залежна крива інгібування активності ксантиноксидази сполукою **3.14**.

Детальні кінетичні дослідження були проведені для вивчення механізму інгібування активності ксантиноксидази азометиновими похідними *para*-амінобензойної кислоти. Коефіцієнт Хіла для сполуки **3.14**, розрахований з дозо-залежної кривої (рис. 3.5), становить  $0,98 \pm 0,17$ , що вказує на відсутність кооперативних ефектів у механізмі інгібування. Графік Лайнуівера-Берка, що

представлений на рис. 3.6, свідчить про змішаний тип інгібування. Розраховані значення констант інгібування  $K_i$  та  $K_i'$  складають  $0,74 \pm 0,10$  мкМ та  $5,85 \pm 0,83$  мкМ, відповідно.

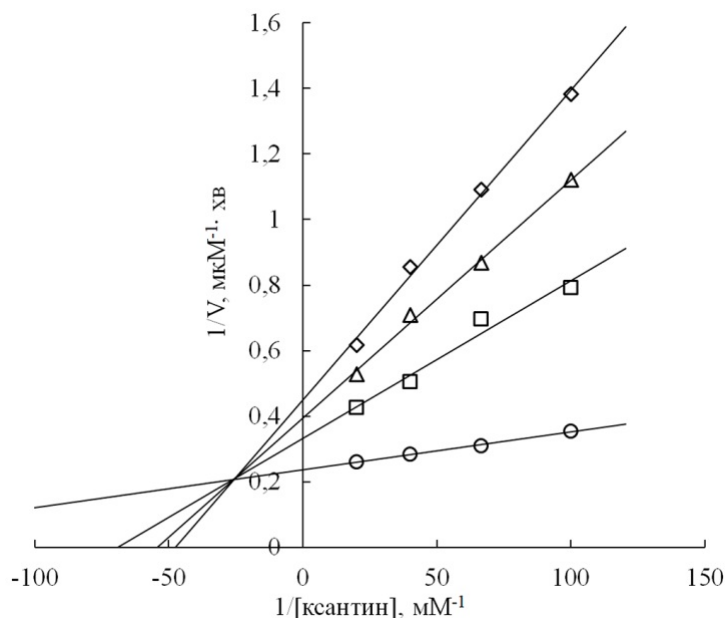


Рис. 3.6. Графік Лайнуївера-Берка, що демонструє інгібування активності ксантиоксидази сполукою **3.14**. Концентрація інгібітора: 0 (○), 2 мкМ (□), 4 мкМ (△) та 6 мкМ (◇).

Для з'ясування молекулярних механізмів інгібувальної здатності азометинових похідних було застосовано підходи комп'ютерного моделювання. Молекулярний докінг в область активного центру кристалічної структури ксантиоксидази з коров'ячого молока (PDB код 1FIQ) було проведено з *E*-ізомерами сполук **3.6**, **3.8–3.14**, при цьому для сполук **3.6**, **3.10–3.14** було обрано конформацію, що забезпечує наближення гідроксильної групи бензиліденового замісника до атома азоту C=N-фрагменту. Така конформація була визначена як енергетично найбільш вигідна методом квантово-хімічних розрахунків проведених для сполуки **3.14** з використанням методу DFT з функціоналом BP (рис. 3.7).

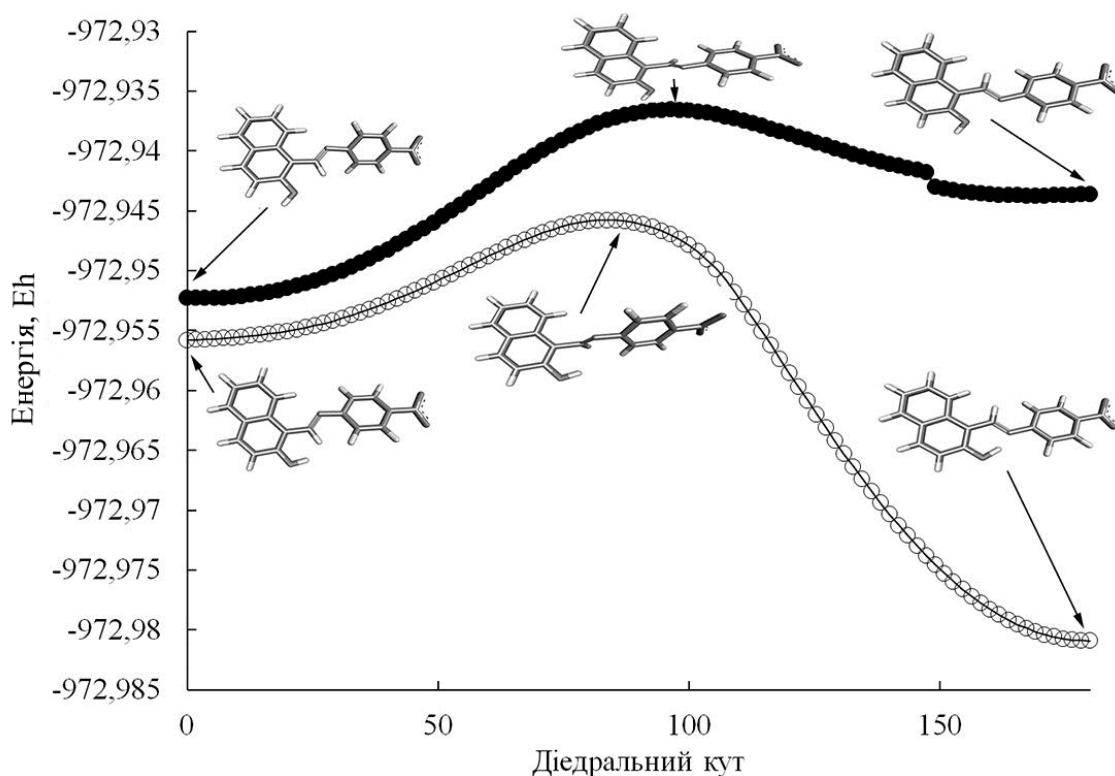


Рис. 3.7. Розслаблене сканування сполуки **3.14** при зміні дієдрального кута з використанням методу DFT з функціоналом BP з базовим набором функцій def2-SVP та def2/J.

Імовірно, що наявність внутрішньомолекулярного водневого зв'язку поміж атомом Гідрогену гідроксильної групи та атомом Нітрогену забезпечує певну стабілізацію такої конформації. Залежність між розрахованою енергією зв'язування сполук **3.6**, **3.8–3.14** в області активного центру ксантинооксидази та логарифмами експериментально визначених значень  $IC_{50}$  з коефіцієнтом кореляції 0,77 наведено на рис. 3.8.



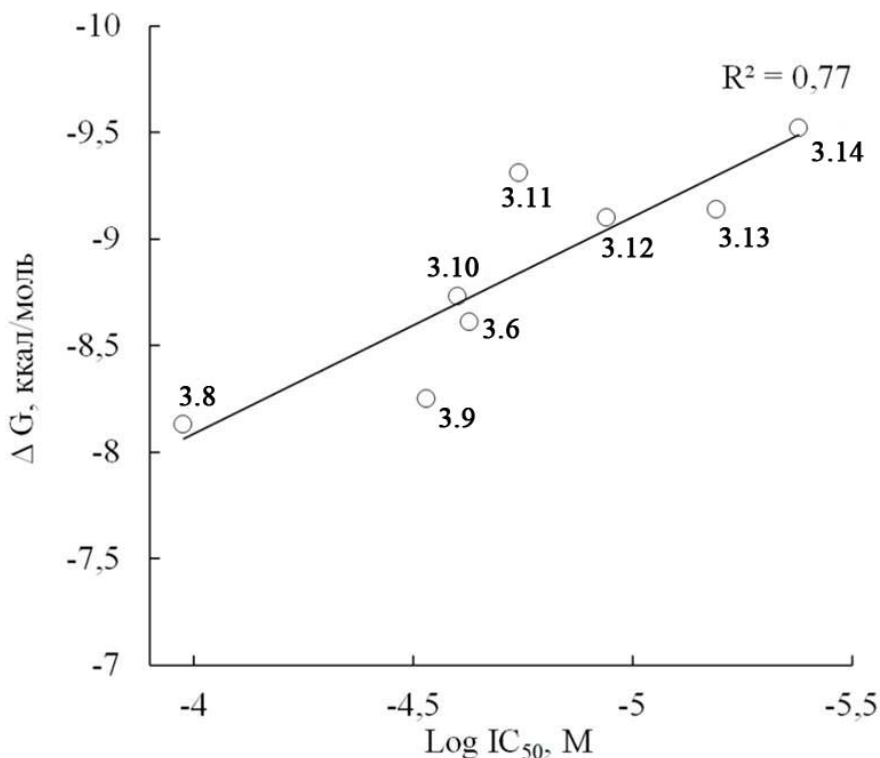


Рис 3.8. Залежність поміж значенням розрахованої енергії зв'язування для азометинових похідних **3.6**, **3.8–3.14** в області активного центру ксантиноксидази та експериментально визначеним значенням LogIC<sub>50</sub>.

Отримані моделі зв'язування азометинів **3.6**, **3.8–3.14** в області активного центру ксантиноксидази (рис. 3.9А) характеризуються значною суперпозицією. Завдяки карбоксильній групі залишку *para*-амінобензойної кислоти, сполука **3.14** у конформації, що має внутрішньомолекулярний водневий зв'язок (рис. 3.9Б), утворює водневі контакти з Arg880, Thr1010 і Glu1261 (через молекулу води НОН1457), тоді як гідроксильна група гідроксинафталенового залишку має водневий контакт з Asn768 і додатково може бути залучена до водневого зв'язку з Glu802, що в каталітичному процесі приймає участь у стабілізації фермент-субстратного комплексу [108]. Крім того, залишок *para*-амінобензойної кислоти сполуки **3.14** характеризується наявністю ароматичних взаємодій з Phe914 і Phe1009, а гідроксинафтильний фрагмент має гідрофобні взаємодії з алкільними групами амінокислотних залишків Leu648, Val1011 і Leu1014 та арильною групою Phe1013.

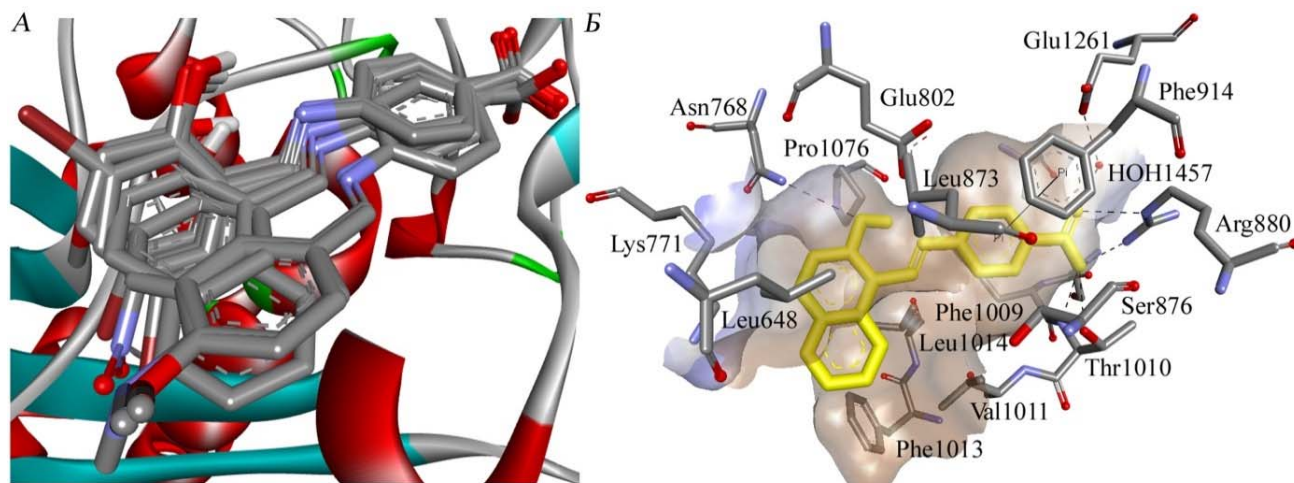


Рис. 3.9. Суперпозиції азометинових похідних **3.6**, **3.8–3.14** в області активного центру ксантинооксидази (А) та модель зв'язування сполуки **3.14** в активному центрі ферменту (Б).

Відповідно до отриманих результатів можна припустити, що для покращення ефективності сполук-лідерів вагоме значення мають гідрофобні замісники, які забезпечують відповідну взаємодію з алкільними групами амінокислот, що посилює інгібувальну дію по відношенню до ксантинооксидази.

Таким чином, встановлено, що азометинові похідні *para*-амінобензойної кислоти є інгібіторами ксантинооксидази зі значенням  $IC_{50}$  в мікромольному діапазоні та проявляють антиоксидантні властивості, нейтралізуючи гідроксильні радикали. Механізми дії сполук на активність ферменту описується закономірностями змішаного типу. Аналіз залежності структура-активність вказує на те, що гідроксильна група в структурі азометинів має вагоме значення для інгібування ксантинооксидази.

## ВИСНОВКИ

1. Здійснено огляд наукової літератури стосовно структури ксантиноксидази, механізму її каталітичної дії та функцій в організмі людини. Проаналізовано раніше досліджені інгібітори ксантиноксидази з метою пошуку закономірностей в конструюванні нових біоактивних сполук.
2. Проведено віртуальний скринінг бази хімічних структур. Знайдено структури, що можуть бути потенційними інгібіторами ксантиноксидази.
3. Проаналізовано результати *in silico* досліджень та відібрано сполуки, що характеризувались найкращою скоринговою енергією та способом зв'язування для подальших досліджень *in vitro*.
4. Досліджено *in vitro* ряд сполук як інгібіторів ксантиноксидази. Показано, що азометинові похідні *para*-амінобензойної кислоти є інгібіторами ксантиноксидази з мікромольними значеннями  $IC_{50}$ . Аналіз між структурою та активністю вказує на те, що наявність гідроксильної групи в структурі сполуки має вагоме значення для інгібування ферменту.
5. Розглянуто оптимізацію знайдених структур-лідерів для покращення їх інгібувальної активності. Визначено, що введення гідрофобних замісників сприяє кращому ефекту інгібування ферменту.
6. Матеріали магістерської роботи можуть бути використані при проведенні факультативних занять з хімії у ліцях з профільного навчання та спеціалізованих школах з поглибленим вивченням природничих дисциплін.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Xanthine oxidase inhibitory activity of constituents of *Cinnamomum cassia* twigs / T. M. Ngoc et al. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2012. Vol. 22. No. 14. P. 4625–4628.
2. Xanthine Oxidase: Isolation, Assays of Activity, and Inhibition / D. A. Kostic et al. *Journal of Chemistry*. 2015. Vol. 2. P. 1–8.
3. Xanthine oxidase inhibitors beyond allopurinol and febuxostat; an overview and selection of potential leads based on *in silico* calculated physico-chemical properties, predicted pharmacokinetics and toxicity / A. Šmelcerović et al. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017. Vol. 135. P. 491–516.
4. Agarwal A. Xanthine oxidoreductase: A journey from purine metabolism to cardiovascular excitation-contraction coupling. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2011. №31. P. 264–280.
5. Hille R. Structure and Function of Xanthine Oxidoreductase. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2006. №10. P. 1913–1926.
6. Borges F., Fernandes E., Roleira F. Progress Towards the Discovery of Xanthine Oxidase Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*. 2002. Vol. 9. P. 195–217.
7. Studies on the mechanism of action of xanthine oxidase / E.-Y. Choi et al. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2004. Vol. 98. P. 841–848.
8. Mutations Associated with Functional Disorder of Xanthine Oxidoreductase and Hereditary Xanthinuria in Humans / K. Ichida et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012. №13. P. 15475–15495.
9. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: Role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase / U. Landmesser et al. *Circulation*. 2002. Vol. 106. P. 3073–3078.
10. Weseler A. R., Bast A. Oxidative Stress and Vascular Function: Implications for Pharmacologic Treatments. *Current Hypertension Reports*. 2010. №12. P. 154–161.

11. Role of oxidative stress in atherosclerosis / D. Harrison et al. *The American Journal of Cardiology*. 2003. Vol. 91. P. 7A–11A.
12. Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress / J. S. McNally et al. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003. Vol. 285. P. 2290–2297.
13. Xanthine Oxidase Inhibition For The Treatment Of Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis / P. Higgins et al. *Cardiovascular Therapeutics*. 2011. Vol. 30. No. 4. P. 217–226.
14. Uric acid and oxidative stress / G.K. Glantzouniset et al. *Current Pharmaceutical Design*. 2005. Vol. 11. P. 4145–4151.
15. Dawson J., Walters M. Uric acid and xanthine oxidase: future therapeutic targets in the prevention of cardiovascular disease. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2006. Vol. 62. No. 6. P. 633–644.
16. Hare J. M., Johnson R. J. Uric Acid Predicts Clinical Outcomes in Heart Failure Insights Regarding the Role of Xanthine Oxidase and Uric Acid in Disease Pathophysiology. *Circulation*. 2003. Vol. 107. No. 15. P. 1951–1953.
17. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis / B.N. Ames et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1981. Vol. 78. P. 6858–6862.
18. Berry C.E., Hare J.M. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J. Physiol*. 2004. Vol. 555. P. 589–606.
19. Battelli M., Bolognesi A., Polito L. Pathophysiology of circulating xanthine oxidoreductase: New emerging 3 roles for a multi-tasking enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014. Vol. 1842. No. 9. P. 1502–1517.
20. Reduction of Nitrite to Nitric Oxide Catalyzed by Xanthine Oxidoreductase / B. L. J. Godber et al. *The journal of biological chemistry*. 2000. Vol. 275. No. 11. P. 7757–7763.

21. Xanthine Oxidase Inhibition For The Treatment Of Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis / P. Higgins et al. *Cardiovascular Therapeutics*. 2011. Vol. 30. No. 4. P. 217–226.
22. Andres M., Sivera F., Pascual E. Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors on Cardiovascular Disease in Patients with Gout: Ascertaining the Efficacy of Treatment Matters. *The American Journal of Medicine*. 2015. Vol. 128. P. 41–42.
23. Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors on Cardiovascular Disease in Patients with Gout: A Cohort Study / S. C. Kim et al. *The American Journal of Medicine*. 2015. Vol. 128. No. 6. P. 653.e7–653.e16.
24. Characterization of the Magnitude and Kinetics of Xanthine Oxidase-catalyzed Nitrite Reduction / H. Li et al. *The journal of biological chemistry*. 2001. Vol. 276. No. 27. P. 24482–24489.
25. Cantu-Medellin N., Kelley E. Xanthine oxidoreductase-catalyzed reduction of nitrite to nitric oxide: Insights regarding where, when and how. *Nitric Oxide*. 2013. Vol. 34. P. 19–26.
26. A new route to peroxynitrite: a role for xanthine oxidoreductase / B. Godber et al. *FEBS Letters*. Vol. 475. No. 2. 2000. P. 93–96.
27. Nishino T. The Conversion of Xanthine Dehydrogenase to Xanthine Oxidase and the Role of the Enzyme in Reperfusion Injury. *J. Biochem*. 1994. Vol. 116. No. 1. P. 1–6.
28. Harrison R. Physiological Roles of Xanthine Oxidoreductase. *Drug Metab Rev*. 2004. Vol. 36. P. 363–375.
29. Kurose. I., Granger D. N. Evidence implicating xanthine oxidase and neutrophils in reperfusion-induced microvascular dysfunction. *Ann. NY Acad. Sci*. 1994. Vol. 723. P. 158–179.
30. Rapid conversion to high xanthine oxidase activity in viable Kupfer cells during hypoxia / J. S. Wiezorek et al. *J. Clin. Invest*. 1994. Vol. 94. P. 2224–2230.
31. Greene E. L., Paller M. S. Xanthine oxidase produces O<sub>2</sub><sup>-</sup> in posthypoxic injury of renal epithelial cells. *Am. J. Physiol*. 1992. Vol. 263. P. 251–255.

32. Robert A. M., Robert L. Xanthine Oxido-Reductase, Free Radicals and Cardiovascular Disease. A Critical Review. *Pathology & Oncology Research*. 2013. №20. P. 1–10.
33. Antibacterial properties of xanthine oxidase in human milk / C. R. Stevens et al. *The Lancet*. 2000. Vol. 356. P. 829–830.
34. Role of xanthine oxidoreductase as an antimicrobial agent / H.M. Martin et al. *Infection and Immunity*. 2004. Vol. 72. No. 9. P. 4933–4939.
35. Role of Xanthine Oxidoreductase as an Antimicrobial Agent / H. M. Martin et al. *Infection and immunity*. 2004. Vol. 72. No. 9. P. 4933–4939.
36. Suzuki M., Grisham M.B., Granger D.N. Leukocyteendothelial cell adhesive interactions: role of xanthine oxidase-derived oxidants. *Journal of Leukocyte Biology*. 1991. Vol. 50. No. 5. P. 488–494.
37. Shenkar R., Abraham E. Plasma from hemorrhaged mice activates CREB and increases cytokine expression in lung mononuclear cells through a xanthine oxidase-dependent mechanism. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 1996. Vol. 14. No. 2. P. 198–206.
38. Free radicals and inflammation: superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma / W. F. Petrone et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1980. Vol. 77. No. 2. P. 1159–1163.
39. Xanthine oxidase and superoxide radicals in portal triad crossclamping-induced microvascular reperfusion injury of the liver / M. J. Muller et al. *Free Radical Biology and Medicine*. 1996. Vol. 21. No. 2. P. 189–197.
40. Xanthine Oxidoreductase-Derived Reactive Species: Physiological and Pathological Effects / M. G. Battelli et al. *Hindawi Publishing Corporation*. 2016. Vol. 548. P. 1–8.
41. Cavasotto C. N., Orry A. J.W. Ligand Docking and Structure-based Virtual Screening in Drug Discovery. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2007. Vol. 7. P. 1006–1014.

42. Study of potential xanthine oxidase inhibitors: *In silico* and *in vitro* biological activity / M. Umamaheswari et al. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 2011. Vol. 6. P. 117–123.
43. George J., Struthers A. D. Role of urate, xanthine oxidase and the effects of allopurinol in vascular oxidative stress. *Vascular Health and Risk Management*. 2009. №5. P. 265–272.
44. Synthesis, anti-inflammatory, and antioxidant activities of 18b-glycyrrhetic acid derivatives as chemical mediators and xanthine oxidase inhibitors / D. Maitraie et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2009. №17. P. 2785–2792.
45. A rational approach for the design and synthesis of 1-acetyl-3,5-diaryl-4,5-dihydro(1H)pyrazoles as a new class of potential non-purine xanthine oxidase inhibitors / K. Nepali et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2011. №19. P. 1950–1958.
46. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase / W. S. Chang, et al. *Anticancer Research*. 1993. Vol. 13. No. 6. P. 2165–2170.
47. Characterization and screening of tight binding inhibitors of xanthine oxidase: An on-flow assay / M. V. N. Rodrigues et al. *RSC Advances*. 2015. Vol. 5. No. 47. P. 1–14.
48. Synthesis of N-aryl-5-amino-4-cyanopyrazole derivatives as potent xanthine oxidase inhibitors / S. Gupta et al. *European journal of medicinal*. 2008. Vol. 43. P. 771–780.
49. Synthesis of some 5-phenylisoxazole-3-carboxylic acid derivatives as potent xanthine oxidase inhibitors / Sh. Wang et al. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2010. Vol. 45. P. 2663–2670.
50. Activity of polyphenolic crude extracts as scavengers of superoxide radicals and inhibitors of xanthine oxidase / L. Costantino et al. 1992. Vol. 58. No. 4. P. 342–344.



51. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers / P. Cos et al. *Journal of Natural Products*. 1998. Vol. 61. No. 1. P. 71–76.
52. Design, synthesis and molecular modeling of aloe-emodin derivatives as potent xanthine oxidase inhibitors / D.-H. Shia et al. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2014. Vol. 75. P. 289–296.
53. Inhibitory activity of xanthine oxidase by fractions *Crateva adansonii* / A. Abdullahi et al. *Journal of Acute Disease*. 2012. Vol. 1. P. 126–129.
54. Carboxylated aurone derivatives as potent inhibitors of xanthine oxidase / O. V. Muzychka et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2017. Vol. 25. P. 3606–3613.
55. Inhibition action on Xanthine Oxidase by biflavonoids from *Selaginella labordei* / L. Li et al. *3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering*. 2009. Vol. 23. No. 4. P. 393–398.
56. Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids / D. E. C. van Hoorn et al. *European Journal of Pharmacology*. 2002. Vol. 451. No. 2. P. 111–118.
57. Tetrahydroamentoflavone (THA) from *Semecarpus anacardium* as a potent inhibitor of xanthine oxidase / R. Arimboor et al. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011. Vol. 133. No. 3. P. 1117–1120.
58. Spector T., Johns D.G. Stoichiometric inhibition of reduced xanthine oxidase by hydroxypyrazolo [3,4-d]pyrimidines. *J. Biol. Chem.* 1970. Vol. 245. P. 5079–5085.
59. Xanthine oxidase inhibitors: a patent survey / R. Kumar et al. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2011. Vol. 21. P. 1071–1108.
60. Synthesis and Structure–Activity Relationships of 1-Phenylpyrazoles as Xanthine Oxidase Inhibitors / S. Ishibuchi et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2001. Vol. 11. P. 879–882.
61. Kittleson M. M., Hare J. M. Xanthine oxidase inhibitors: an emerging class of drugs for heart failure. *European Heart Journal*. 2005. Vol. 26. P. 1458–1460.

62. Effects of topiroxostat on the serum urate levels and urinary albumin excretion in hyperuricemic stage 3 chronic kidney disease patients with or without gout / T. Hosoya et al. *Clinical and Experimental Nephrology*. 2014. №18. P. 876–884.

63. Effects of Xanthine Oxidase Inhibition in Hyperuricemic Heart Failure Patients: The EXACT-HF Study / M.M. Givertz et al. *Circulation*. 2015. Vol. 131. No. 20. P. 1763–1771.

64. Design and synthesis of aza-flavones as a new class of xanthine oxidase inhibitors / R. Dhiman et al. *Archiv der Pharmazie*. 2013. Vol. 346. P. 7–16.

65. Pacher P., Nivorozhkin A., Szabo C. Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol. *Pharmacological Reviews*. 2006. Vol. 58. No. 1. P. 87–114.

66. Synthesis and bioevaluation of 2-phenyl-4-methyl-1,3-selenazole-5-carboxylic acids as potent xanthine oxidase inhibitors / Q. Guan et al. *Eur. J. Med. Chem.* 2014. Vol. 85. P. 508–516.

67. FYX-051: A Novel and Potent Hybrid-Type Inhibitor of Xanthine Oxidoreductase / K. Matsumoto et al. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2011. Vol. 336. No. 1. P. 95–103.

68. Synthesis and biological evaluation of new imidazole, pyrimidine, and purine derivatives and analogs as inhibitors of xanthine oxidase / G. Biagi et al. *J. Med. Chem.* 1996. Vol. 39. P. 2529–2535.

69. Febuxostat: A Selective Xanthine-Oxidase/Xanthine-Dehydrogenase Inhibitor for the Management of Hyperuricemia in Adults With Gout / M. E. Ernst et al. *Clinical Therapeutics*. 2009. Vol. 31. No. 11. P. 503–2518.

70. Clinical and health care use characteristics of patients newly prescribed allopurinol, febuxostat and colchicine for gout / S. C. Kim et al. *Arthritis Care & Research*. 2013. Vol. 65. P. 1–28.

71. Synthesis and evaluation of 1-hydroxy/methoxy-4-methyl-2-phenyl-1H-imidazole-5-carboxylic acid derivatives as non-purine xanthine oxidase inhibitors

/ Sh. Chen et al. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015. Vol. 103. P. 343–353.

72. Structure-based design and biological evaluation of novel 2-(indol-2-yl)thiazole derivatives as xanthine oxidase inhibitors / J.U. Song et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2016. Vol. 26. P. 950–954.

73. Design and synthesis of novel 2-(indol-5-yl)-thiazole derivatives as xanthine oxidase inhibitors / J.U. Song et al. *Bioorg. Med. Chem.* 2015. Vol. 25. P. 1254–1258.

74. Hydroxylated chalcones with dual properties: Xanthine oxidase inhibitors and radical scavengers / E. Hofmann et al. *Bioorg. Med. Chem.* 2016. Vol. 24. P. 578–587.

75. Identification of novel isocytosine derivatives as xanthine oxidase inhibitors from a set of virtual screening hits / C. B-Rao et al. *Bioorg. Med. Chem.* 2012. Vol. 20. P. 2930–2939.

76. Isocytosine-based inhibitors of xanthine oxidase: Design, synthesis, SAR, PK and *in vivo* efficacy in rat model of hyperuricemia / S. Khanna et al. *Bioorg. Med. Chem.* 2012. Vol. 22. P. 7543–7546.

77. Costantino L., Rastelli G., Albasini A. A rational approach to the design of flavones as xanthine oxidase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 1996. Vol. 31. P. 693–699.

78. Discovery of xanthine oxidase inhibitors and/or  $\alpha$ -glucosidase inhibitors by carboxyalkyl derivatization based on the flavonoid of apigenin / Z.R. Su et al. *Bioorg. Med. Chem.* 2015. Vol. 25. P. 2778–2781.

79. Cao H., Pauff J. M., Hille R. X-ray Crystal Structure of a Xanthine Oxidase Complex with the Flavonoid Inhibitor Quercetin. *Journal of Natural Products*. 2014. Vol. 77. P. 1693–1699.

80. Xanthine oxidase inhibitory activity of the methanolic extracts of selected Jordanian medicinal plants / M. M. Hudaib et al. *Pharmacognosy Magazine*. 2011. Vol. 7. P. 320–324.

81. Nagao A., Seki M., Kobayashi H. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 1999. Vol. 63. No. 10. P. 1787–1790.
82. Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids / D. E.C. Van Hoorn et al. *European Journal of Pharmacology*. 2002. Vol. 451. P. 111–118.
83. Novel Insights into the Inhibitory Mechanism of Kaempferol on Xanthine Oxidase / Y. Wang et al. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015. №63. P. 526–534.
84. *N*-(1,3-Diaryl-3-oxopropyl)-amides as a new template for xanthine oxidase inhibitors / K. Nepali et al. *Bioorg. Med. Chem.* 2011. Vol. 19. P. 5569–5576.
85. Synthesis and Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of 5,6-Dihydropyrazolo/pyrazolo[1,5-*c*]quinazoline Derivatives / D. Kumar et al. *Bioorganic Chemistry*. 2014. Vol. 57. P. 57–64.
86. Discovery of novel xanthone derivatives as xanthine oxidase inhibitors / L. Hu et al. *Bioorg. Med. Chem.* 2011. Vol. 21. P. 4013–4015.
87. Microwave assisted synthesis of naphthopyrans catalysed by silica supported fluoroboric acid as a new class of non-purine xanthine oxidase inhibitors / S. Sharma et al. *Bioorg. Med. Chem.* 2014. Vol. 24. P. 495–500.
88. Zoete V., Grosdidier A., Michielin O. Docking, virtual high throughput screening and in silico fragment-based drug desing. *J. Cell. Mol. Med.* 2009. Vol. 3. P. 238–248.
89. Screening of ferulic acid related compounds as inhibitors of xanthineoxidase and cyclooxygenase-2 with anti-inflammatory activity / S. Nile et al. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2016. Vol. 26. No. 1. P. 50–55.
90. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies / L. G. Ferreira et al. *Molecules*. 2015. Vol. 20. P. 13384–13421.
91. Aruoma O.I. Deoxyribose assay for detecting hydroxyl radicals. *Methods Enzymol.* 1994. Vol. 233. P. 57–66.

92. Virtual and In Vitro Bioassay Screening of Phytochemical Inhibitors from Flavonoids and Isoflavones Against Xanthine Oxidase and Cyclooxygenase-2 for Gout Treatment / Ya. Li et al. *Chem Biol Drug Des.* 2013. Vol. 81. P. 537–544.

93. Discovery of a novel human lactate dehydrogenase A (LDHA) inhibitor as an anti-proliferation agent against MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells / Y. Sun et al. *Royal Society of Chemistry.* 2016. №6. P. 23218–23222.

94. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications / D. B. Kitchen et al. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2004. Vol. 3. P. 935–949.

95. Cavasotto C. N., Orry A. J.W. Ligand Docking and Structure-based Virtual Screening in Drug Discovery. *Current Topics in Medicinal Chemistry.* 2007. Vol. 7. P. 1006–1014.

96. Structure-based virtual screening of chemical libraries for drug discovery / S. Ghosh et al. *Current Opinion in Chemical Biology.* 2006. Vol. 10. P. 194–202.

97. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery / X.-Yu Meng et al. *Current Computer-Aided Drug Design.* 2011. Vol. 7. P. 146–157.

98. Татарчук А.В., Кобзар О.Л., Танчук В.Ю, Суховєєв В.В., Вовк А.І. Комп'ютерний скринінг хімічних сполук для пошуку інгібіторів ксантинооксидази. Матеріали VI Міжнародної заочної науково-практичної конференції молодих учених «Фундаментальні та прикладні дослідження в сучасній хімії» м. Ніжин, 24 квітня, 2019. С. 105–108.

99. Negm N.A., Zaki M.F., Salem M.A.I. Cationic schiff base amphiphiles and their metal complexes: Surface and biocidal activities against bacteria and fungi. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2010. Vol. 77. P. 96–103.

100. Antibacterial effect of some benzopyrone derivatives / R. Amin et al. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2010. Vol. 45. P. 372–378.

101. Synthesis and antimicrobial activity of Schiff and Mannich bases of isatin and its derivatives with pyrimidine / S.N. Pandeya et al. *II Farmaco* 1999. Vol. 54. P. 624–628.

102. Synthesis, antitumor activity and molecular docking study of novel Sulfonamide-Schiff's bases, thiazolidinones, benzothiazinones and their C-nucleoside derivatives / M. M. Kamel et al. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2010. Vol. 45. P. 572–580.

103. A class of novel Schiff's bases: Synthesis, therapeutic action for chronic pain, anti-inflammation and 3D QSAR analysis / Y. Zhou et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2010. Vol. 18. P. 2165–2172.

104. Shih M.-H., Ke F.-Y. Syntheses and evaluation of antioxidant activity of sydnonyl substituted thiazolidinone and thiazoline derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2004. Vol. 12. No. 17. P. 4633–4643.

105. Synthesis of azomethines derived from cinnamaldehyde and vanillin: in vitro acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant and in silico molecular docking studies / S. Chigurupati et al. *Medicinal Chemistry Research*. 2017. Vol. 27. No. 3. P. 807–816.

106. Synthesis, Activity Testing and Molybdenum(VI) Complexation of Schiff Bases Derived from 2,4,6-Trihydroxybenzaldehyde Investigated as Xanthine Oxidase Inhibitors / M. Leigh et al. *ChemMedChem*. 2011. Vol. 6. P. 612-616.

107. Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion / C. Enroth et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. Vol. 97. No. 20. P. 10723–10728.

108. Human xanthine oxidase changes its substrate specificity to aldehyde oxidase type upon mutation of amino acid residues in the active site: role of active site residues in binding and activation of purine substrate / Y. Yamaguchi et al. *J. Biochem.* 2007. Vol. 141. No. 4. P. 513–524.