

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

Освітньо-професійна програма:

*Хімія, медична та фармацевтична хімія*

Спеціальність: *102 Хімія*

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

На здобуття освітнього ступеня магістр

**«ТЕОРЕТИЧНА І ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ОЦІНКА  
АКТИВНОСТІ ІНГІБІТОРІВ КСАНТИНОКСИДАЗИ»**

Студентки Глушко Ольги Ігорівни

Наукові керівники: **Суховєєв В. В.**, д.х.н., професор;  
**Кобзар О. Л.**, к.х.н., ст.н.с. Інституту біоорганічної хімії  
та нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАН України

Рецензенти: к.х.н., доцент **Москаленко О.В.**, завідувач  
кафедри життєдіяльності і природокористування  
відокремленого підрозділу Національного університету  
біоресурсів і природокористування України  
«Ніжинський агротехнічний інститут», к.б.н., доцент  
**Семеніхін А.В**

Допущено до захисту

Завідувач кафедри хімії та фармації

«14» грудня 2020 р. \_\_\_\_\_/В.В.Суховєєв/

## ЗМІСТ

|   |    |
|---|----|
| ВСТУП .....   | 3  |
| РОЗДІЛ I. КСАНТИНОКСИДАЗА: СТРУКТУРА ТА ФУНКЦІЇ .....   | 6  |
| 1.1. Структура та механізм дії ксантиноксидази .....  | 6  |
| 1.2. Функції ксантиноксидази в організмі людини .....   | 9  |
| 1.3. Інгібітори ксантиноксидази та їх значення у медицині .....   | 11 |
| 1.4. Заключення. Постановка задачі .....  | 26 |
| РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ .....  | 27 |
| 2.1. Матеріали .....  | 27 |
| 2.2. Вивчення <i>in vitro</i> дослідження 6-( <i>N</i> -ациламіно)пуринів .....   | 27 |
| 2.3. Моделювання способу зв'язування <i>N</i> 6-(3,4-диметоксибензоїл)аденіну в активному центрі ксантиноксидази.....                                       | 27 |
| 2.4. Моделювання способу зв'язування 4-((9 <i>H</i> -пурин-6-іл)аміно)- <i>N</i> -(9 <i>H</i> -пурин-6-іл)бензаміду в активному центрі ксантиноксидази..... | 28 |
| РОЗДІЛ III. ВИВЧЕННЯ ПОХІДНИХ 6-( <i>N</i> -АЦИЛАМІНО)ПУРИНУ ЯК ІНГІБІТОРІВ КСАНТИНОКСИДАЗИ.....  | 30 |
| 3.1. Метоксизаміщені похідні <i>N</i> 6-бензоїладеніну як інгібітори ксантиноксидази.....   | 30 |
| 3.2. Оцінка впливу похідних 6-( <i>N</i> -ациламіно)пурину на ферментативну активність ксантиноксидази .....  | 33 |
| ВИСНОВКИ.....   | 37 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....   | 38 |

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Українським вченим І.Я. Горбачевським і німецьким Ф.Шардінгером було введено поняття – «ксантиноксидаза». Цей фермент каталізує перетворення гіпоксантину в ксантин і далі в сечову кислоту, а також окислення ряду птеридину, альдегідів та імідазолу. При дефіциті кисню ксантиноксидаза функціонує як НАД<sup>+</sup> - залежна ксантиндегідрогеназа, причому механізми дії цих двох функціональних форм принципово різняться. В кінці 1980-х років вивчення ксантиноксидази ставало все більш актуальним. Почалася "друга хвиля" досліджень ролі ксантиноксидази в біохімічних процесах, коли з'ясувалося, що ксантиноксидаза є головною системою генерування активних форм кисню в живих організмах.

Сечова кислота у деяких тварин, в тому числі й у людини, є кінцевим продуктом розпаду пуринів, в зв'язку з чим інтенсивність утилізації продуктів дезамінування пуринів у них прямо залежить від активності ксантиноксидази та ксантиндегідрогенази. Ксантиноксидаза і ксантиндегідрогеназа забезпечують утилізацію всього «зайвого» ксантину, який при недостатній утилізації здатний викликати міалгії та інфаркти нирок. Однак, підвищений рівень ксантиноксидази в плазмі відіграє роль в патогенезі інших патологічних станів та їх ускладнень, при яких, як передбачається, інгібітори ксантиноксидази можуть володіти терапевтичною дією, що є об'єктом багатьох досліджень та надзвичайно актуальним питанням на сьогодні [1].

**Метою** даної роботи було дослідження 6-(*N*-ациламіну)пурину як інгібіторів ксантиноксидази.

Відповідно до мети поставлені такі **завдання**:

1. Провести аналіз наукової літератури стосовно дослідження структури та механізмів ферментативної активності ксантиноксидази;
2. Вивчити функції ксантиноксидази в організмі людини;
3. З'ясувати значення інгібіторів ксантиноксидази у медицині.

4. Дослідити похідні 6-(*N*-ациламіну)пурину *in vitro* як інгібіторів ксантиноксидази.
5. Здійснити моделювання фермент-інгібіторних комплексів похідних 6-(*N*-ациламіну)пурину з ксантиноксидази.

**Об'єкт дослідження** – похідні 6-(*N*-ациламіну)пурину як інгібітори ксантиноксидази.

**Предмет дослідження** – інгібування ксантиноксидази похідними 6-(*N*-ациламіну)пурину.

**Методи дослідження:** спектральні методи аналізу, молекулярний докінг, хромато-мас-спектрометрія.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Продемонстровано, що метоксизаміщені похідні *N*6-бензоїладеніну та похідних 6-(*N*-ациламіно)пурину є інгібіторами ксантиноксидази.

**Особистий внесок дослідника.** Магістранткою проведено огляд наукової літератури, виконано експериментальну частину 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, вдосконалення структури роботи, формулювання висновків проводились разом з керівниками.

**Апробація результатів дослідження.** Результати кваліфікаційної роботи опробовані та опубліковані в збірнику статей за матеріалами VII Міжнародної заочної науково-практичної конференції молодих учених «Фундаментальні та прикладні дослідження в сучасній хімії та фармації» (Ніжин, 21 квітня 2020 р.) та V Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії» (Харків, 26 листопада 2020 р.)

**Публікації.** За матеріалами кваліфікаційної роботи опубліковано 2 статті у наукових виданнях:

1. Метоксизаміщені похідні N6-бензоїладеніну як інгібітори ксантиноксидази. *Фундаментальні та прикладні дослідження в сучасній хімії та фармації*: за матер. VII Міжнар. заоч. наук.- практ. конф. молодих учених: Ніжин, 2020. С. 75-80.
2. Оцінка похідних 6-(N-ациламіно)пурину як інгібіторів ксантиноксидази. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії*: за матер. V Міжнар. наук.-практ. інтернет-конференції: Харків, 2020. С. 229-233.

**Структура і обсяг кваліфікаційної роботи.** Кваліфікаційна робота викладена на 46 сторінках друкованого тексту і включає вступ, три розділи, висновки та список використаних джерел, до складу якого входить 75 найменувань. Вона проілюстрована 8 рисунками, 2 схемами та 3 таблицями.

## РОЗДІЛ I. КСАНТИНОКСИДАЗА: СТРУКТУРА ТА ФУНКЦІЇ

### 1.1. Структура та механізм дії ксантиноксидази

У 1902 р. Ф.Шардінгер [2] показав, що молоко містить фермент, який здатний окиснювати альдегіди до кислот, що супроводжується відновленням метиленового синього; цей фермент тоді називали «ферментом Шардінгера». У 1922 р. Е.Дж. Морган та співавт. [3] показали, що молоко містить фермент, здатний окиснювати ксантин та гіпоксантин з одночасним відновленням  $O_2$  до  $H_2O_2$ , і цей фермент називали ксантиноксидазою.

Структурна організація ксантиноксидази (ксантиндегідрогенази) досить складна. Фермент має димерну структуру, причому при поділі його на мономери виявляється, що кожен з них окремо має каталітичну активність. Молекулярна маса ферменту, визначена за допомогою диск-електрофорезу в ПААГ, становить 283 кДж. Кожен мономер складається з трьох неідентичних субодиниць, пов'язаних між собою дисульфідними зв'язками. Молекулярна маса субодиниць, визначена тим же методом, складає відповідно 135, 120 і 40 кДж. До складу ферменту входить ФАД, ковалентно зв'язаний з його білковою частиною. На кожен мономер доводиться одна молекула ФАД. Білкова частина ферменту багата цистеїном і містить 60-62 вільні SH-групи. У структурі ксантиноксидази є також ферумсульфурові центри з типом кластера  $2 Fe - 2 S$ . До складу ферменту входить молібден, який у збудженому стані є п'ятивалентним і знаходиться у вигляді так званого молібденового кофактора - він зв'язаний двома s-зв'язками з ФАД, двома - з шестизаміщеними птеринами, протонованими в положенні 7 і однієї - з Сульфуром цистеїну.

Показано, що до складу ксантиноксидази в розрахунку на кожен мономер входить також одна надсульфідна група (- S - SH), яка, можливо, і служить для зв'язування Молібдену. В ході досліджень було встановлено, що птерини і надсульфідна група не беруть безпосередньої участі в каталітичному акті. У гомогенному стані фермент швидко інактивується через конформаційні зміни, що виникають завдяки наявності великої кількості вільних SH-груп.

Показано, що фермент здатний поступово втрачати молібден. З'ясувалося, що активність ксантиноксидази і ксантиндегідрогенази прямо залежать від вмісту Молібдену в організмі [4].

Механізм дії ксантиноксидази досить складний. Спочатку відбувається окиснення Феруму в складі ферумсульфурового центру ферменту з утворенням супероксидного радикалу. ФАД дегідруючий субстрат, перетворюючись у дуже активний семіхінон, здатний дегідрувати навіть воду з утворенням ФАДН<sub>2</sub> та негайно відновлює супероксид в Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>. Електрон, що залишився у ФАД, може відновити окиснений ферумсульфуровий центр. Два гідроксили, що утворилися в результаті дегідрування води на двох мономерах ксантиноксидази, конденсуються в молекулу Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>. Віддаючи електрон, Молібден розщеплює перекис водню на два йони ОН<sup>-</sup>, змінюючи при цьому свою валентність. Збуджений Молібден зв'язується з гідроксил аніоном, забирає у нього втрачений електрон і гідроксильє субстрат, передаючи останньому гідроксильний радикал. Схематично механізм дії ксантиноксидази представлений на рис. 1.1.

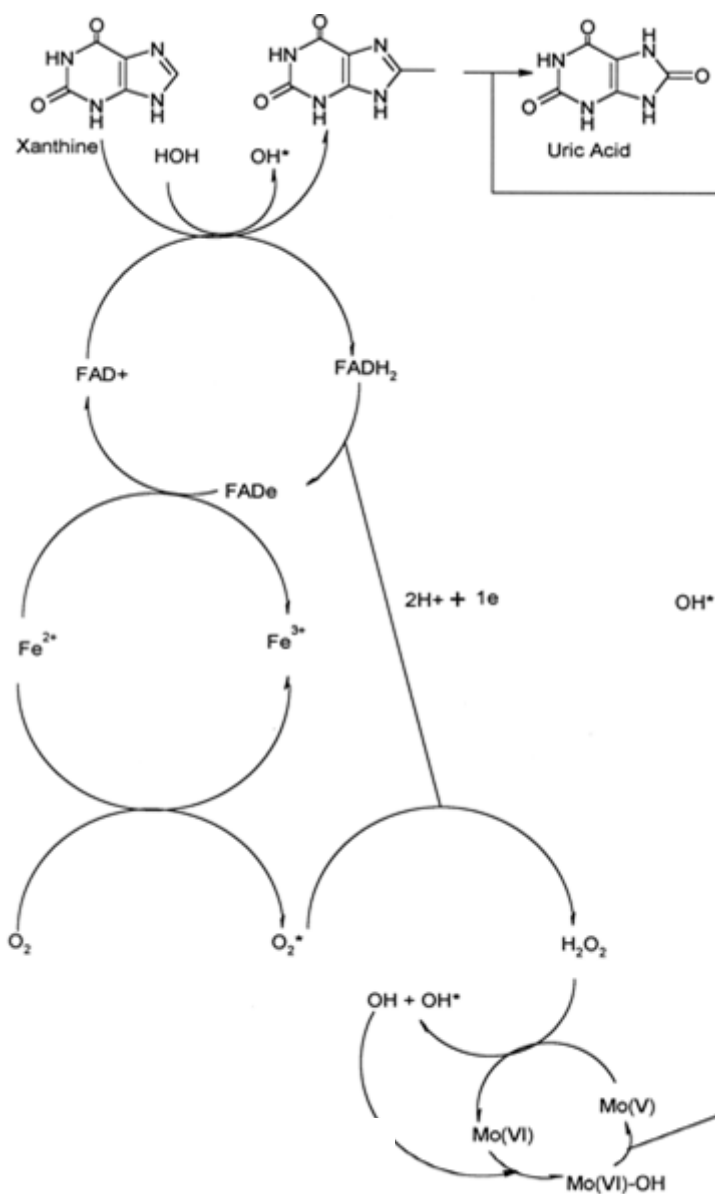


Рис. 1.1. Механізм дії ксантиноксидази [4].

Механізм дії ксантиндегідрогенази відносно простий у порівнянні з механізмом дії ксантиноксидази. Спочатку фермент атакує *p*-зв'язок в структурі субстрату. Відбувається це таким чином: Молибден віддає електрон, розриває *p*-зв'язок між N і C в положеннях 2 і 3 або 7 і 8 в структурі пуринового ядра субстрату з приєднанням електрона до Нітрогену. Активованій субстрат легко приєднує воду, вода дисоціює на  $\text{H}^+$  і  $\text{OH}^-$ , після чого протон приєднується до Нітрогену, а Молибден зв'язується з гідроксил-аніоном, забирає у нього втрачений електрон і гідроксильє субстрат, передаючи



останньому гідроксильний радикал. Таким чином, субстрат гідратується. Утворений гідрат субстрату легко дегідрується за участю ФАД, який тут же окиснюється, передаючи електрони і протони на НАД<sup>+</sup>, який є кінцевим акцептором електронів і протонів у зазначеній реакції. У випадку з ксантиндегідрогеназою ферумсульфурові центри не функціонують і супероксид не утворюється. У зв'язку з цим реакція йде по більш повільному дегідрогеназному шляху через стадію гідратації субстрату. У випадку з ксантиноксидазою утворюється супероксид, тому реакція повинна йти швидше, зважаючи на необхідність його знешкодження. З цієї причини гідратація субстрату не відбувається і субстрат негайно піддається дегідруванню [4].

Ксантиноксидаза – немікросомальний молібденовмісний фермент, який бере участь у катаболізмі пурину. Ксантиноксидаза окиснює гіпоксантин до ксантину, потім до сечової кислоти (рис. 1.1). Алопуринол є потужним інгібітором ксантиноксидази, його використовують для лікування гіперурикемії. Алопуринол конкурентно інгібує ксантиноксидазу, і він окиснюється до оксипуринолу, який, у свою чергу, є потужним псевдооборотним інгібітором ксантиноксидази [5]. Інгібування ксантиноксидази призводить до зменшення утворення сечової кислоти та зменшення опосередкованого утворення супероксид-аніонних радикалів при деяких патологічних умовах. Крім того, ксантиноксидаза також бере участь у біотрансформації протипухлинного препарату 6-меркаптопурин (6МР). Враховуючи той факт, що одночасне введення алопуринолу і 6МР уповільнює елімінацію останньої сполуки, сильне інгібування ксантиноксидази каталізованого окиснення 6МР може спричинити, навіть, серйозну мієлосупресію [6].

## 1.2. Функції ксантиноксидази в організмі людини

Основна функція ксантиноксидази полягає в утворенні сечової кислоти з первинних продуктів окислення аденіну і гуаніну. Ксантиноксидаза

(ксантиндегідрогеназа) займає, фактично, центральне місце в розпаді пуринів. Ці дві функціональні форми є основним фактором, що лімітує утворення сечової кислоти в тваринному організмі [4].

Шлях, по якому здійснюється перетворення гіпоксантину в ксантин, і далі, в сечову кислоту, залежить в першу чергу від умов, при яких функціонує фермент, що відповідає за цей процес. При дефіциті Оксигену, зниженні рН, а також надлишку нікотинамідних коферментів, ксантиноксидаза функціонує як НАД-залежна ксантиндегідрогеназа. Індукторами активності ксантиноксидази є інтерферон і молібдати. Інтерферон індукує експресію генів, що кодують субодиниці ксантиноксидази, а молібден (у складі молібдатів) активує вивільнення ксантиноксидазного апофермента з бульбашок апарату Гольджі, що призводить до збільшення кількості активних молекул ксантиноксидази.

Слід зауважити, що активність ксантиноксидази в значній мірі залежить від надходження в організм екзогенного Молібдену. Добова потреба людини в Молібдені становить 1-2 мг. Показано, що в ракових клітинах активність ксантиноксидази підвищується в 5-20 разів. Крім того, відновники, такі як аскорбінова кислота, глутатіон і дитіотреїтол, в концентраціях 0,15-0,4 мМ активують ксантиноксидазу, підтримуючи ФАД і ферумсульфурові центри в структурі ферменту у відновленому стані, що збільшують кількість утвореного ферментом супероксиду і, відповідно, кількість окиснених молекул субстрату [1].

Надмірна активність ксантиноксидази призводить до стану, відомого як подагра, поширеного ревматичного захворювання та гострого запального артрити [7]. Інгібування ксантиноксидази зменшує як судинний окиснювальний стрес, так і рівень циркулюючої сечової кислоти.

Крім того, ксантиноксидаза бере участь у розвитку різних серцево-судинних та запальних захворювань. Ці наслідки впливають з дисфункції ендотелію та окиснювальної травми через важливий факт, що фермент є не тільки внутрішньоклітинним. Було показано, що він зв'язується з ендотелієм судин з подальшим ендоцитозом у віддалених тканинах від джерела експресії.

Кілька досліджень також вказували на критичну роль ксантиноксидази при розвитку кардіоміопатії першого типу діабету, демонструючи профілактичний ефект алопуринолу, який є специфічним інгібітором ксантиноксидази [7].

Таким чином, регульована активність ксантиноксидази в організмі людини важлива для здоров'я та профілактики захворювань.

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

Пошук та вивчення інгібіторів ксантиноксидази є актуальним напрямком біоорганічних досліджень. На сьогодні значна кількість сполук описані як інгібітори цього ферменту, серед яких: похідні флавоноїдів [5], гетероциклів [7] і пептидів [8].

Два інгібітори ксантиноксидази, алопуринол та фебуксостат, були схвалені Food and Drug для введення та лікування подагри. Алопуринол – інгібітор ксантиноксидази, за хімічною будовою – піразолопіримідин і аналог гіпоксантину. Механізм уратзнижуючого ефекту цієї сполуки обумовлений зменшенням окиснення гіпоксантину до ксантину і ксантину до МК. Це перший лікарський препарат, офіційно зареєстрований для лікування подагри. Основна причина небезпеки прийому алопуринолу у високих дозах: навіть при незначному зниженні функції нирок спостерігається відносно частий розвиток важких алергічних реакцій, перш за все синдрому лікарської гіперчутливості (DRESS-синдрому - drug rash with eosinophilia and systemic symptoms) [9].

Дослідження J. Yun і співавт. встановлюють важливу синергічну роль концентрації лікарського засобу і алелі HLA-B \* 5801 в алопуринол- або оксипуринол- специфічних відповідях Т-клітин. Незважаючи на переважну аксіому про незалежність від дози побічних лікарських реакцій типу В, гіперчутливість до алопуринолу в основному обумовлена специфічною для оксипуринолу Т-клітинною відповіддю дозозалежним чином, особливо в присутності алелю HLA-B \* 5801 [10].

На відміну від алопуринолу, фебуксостат не впливає на інші ферменти пуринового і піримідинового метаболізму, що дозволяє називати його

селективним інгібітором ксантиноксидази. Фебуксостат дозволяє отримати клінічний ефект при значно меншій концентрації препарату в плазмі, порівняно з алопуринолом. Проведені клінічні дослідження показали, що фебуксостат в цілому добре переносився [11] і проявив себе як більш ефективний, ніж алопуринол [12]. Найбільш небажаними явищами при його прийомі були інфекційні захворювання верхніх дихальних шляхів (у дослідженнях APEX, CONFIRMS, FOCYS і EXCEL), за результатами дослідження FACT найбільш поширеними небажаними явищами були порушення функції печінки, і саме вони найчастіше призводили до припинення терапії [13]. Інші небажані явища – нудота, блювота та біль у суглобах відзначалися більш ніж у 1% пацієнтів, які отримували фебуксостат. При тривалому застосуванні фебуксостату у 5,5% пацієнтів спостерігалось підвищення концентрації тиреотропного гормону ( $> 5,5$  мкМЕ/мл), у зв'язку з чим, пацієнтам з порушенням функції щитовидної залози, фебуксостат слід призначати з обережністю [14].

Фебуксостат не рекомендується застосовувати пацієнтам з ішемічною хворобою серця або застійною серцевою недостатністю. В даний час проводиться оцінка безпеки з точки зору ризиків для серцево-судинної системи в рамках прискореного дослідження, яке почалося в 2011 р. за рекомендацією ЕМА [15]. Фебуксостат доповнює субстратний канал, що веде до активного центру ферменту і утворює багаторазові взаємодії з каналом (рис. 2.2).

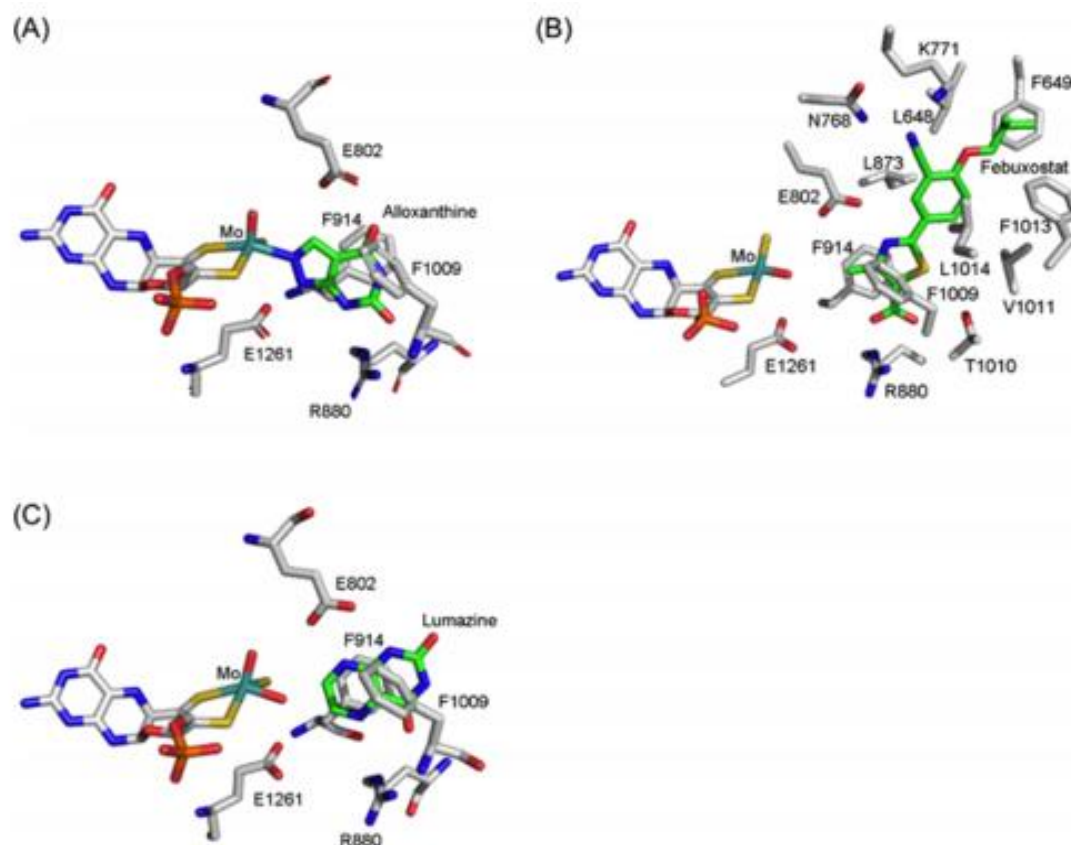


Рис. 2.2. Кристалічні структури бичачої ксантиноксидоредуктази в комплексі з алоксантином, фебуксостатом та люмазином (А), (В), (С).

Згідно рис.2.2. наведено, що (А) алоксантин утворює прямий зв'язок Мо-N з молібденовим центром ферменту на додаток до того, що має багаторазовий водневий зв'язок та взаємодії ван-дер-ваальса з залишками активних ділянок (код PDB:3BDJ). (В) Фебуксостат утворює численні нековалентні взаємодії з аміноактивним залишком активного центру і майже повністю заповнює субстратуочий канал, що веде до центру Молібдену (код PDB:1N5X). (С) Люмазин зв'язується в активному центрі Молібдену з C4=O, водень пов'язаний з Arg 880 (код PDB 3ETR) [16].

Вольфрам заміщає Молібден в активному центрі ферменту, що призводить до його необоротної інактивації. Крім того, багато похідних птеридину (в тому числі фолієва кислота) і імідазолу (гістидин) інгібують ксантиноксидазу.

При низьких концентраціях алопуринол є субстратом та конкурентним інгібітором ферменту; при більш високих концентраціях він є неконкурентним інгібітором. Оксипуринол є неконкурентним інгібітором ферменту, утворення цієї сполуки разом із тривалим зберіганням у тканинах відповідає за велику частину фармакологічної активності алопуринолу. З точки зору фармакокінетики, алопуринол швидко всмоктується, досягаючи пікових концентрацій у плазмі крові протягом 30–60 хв після перорального прийому. Оксипуринол має нижчу біодоступність для прийому всередину, ніж алопуринол (схема 1.1).

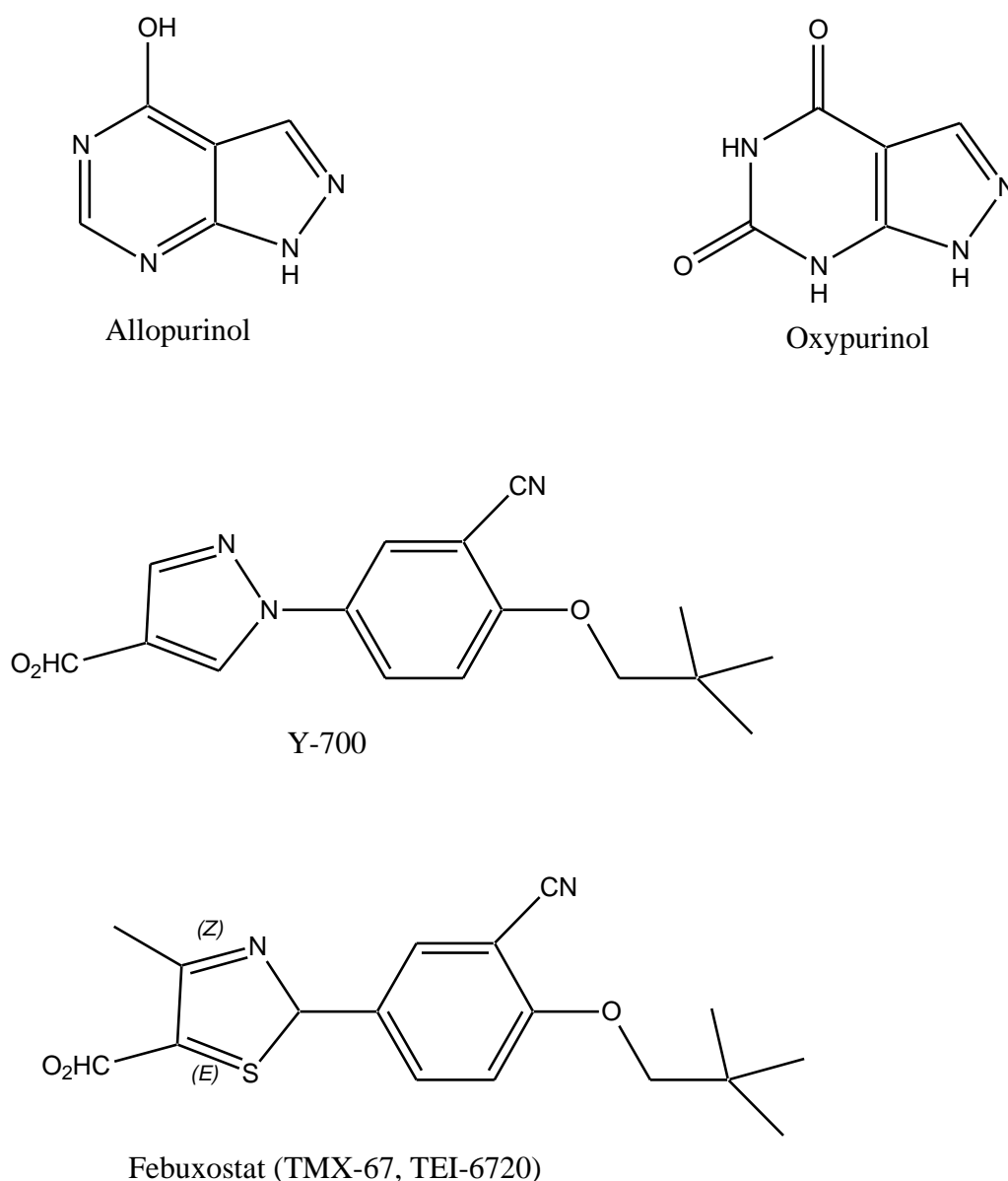


Схема. 1.1. Хімічні структури вибраних інгібіторів ксантиноксидази

Алопуринол має відносно короткий період напіввиведення в плазмі (2–3 год), тоді як період напіввиведення оксипуринолу набагато довший (14–30 год) через реабсорбцію нирками [17].

Найпоширенішими побічними ефектами алопуринолу є шлунково-кишковий дистрес, реакції гіперчутливості та шкірний висип. Реакція гіперчутливості може виникнути навіть після місяців або років прийому ліків. Ці ефекти, як правило, спостерігаються у осіб зі зниженою функцією нирок, для яких дозування алопуринолу не було зменшене. Алопуринол може посилювати дію циклофосфаміду та пригнічувати метаболізм пероральних коагулянтів та пробенециду. Симптомами токсичності алопуринолу є лихоманка, висип, васкуліт, еозинофілія та погіршення функції нирок, що може призвести до летального результату, особливо у пацієнтів літнього віку з нирковою недостатністю, які приймають тiazидні діуретики [18].

Знижуючи концентрацію сечової кислоти в плазмі нижче межі розчинності, алопуринол запобігає розвитку та прогресуванню хронічного подагричного артрити [19]. Утворення сечокислих каменів з терапією поступово зникає, а це запобігає розвитку нефропатії. На додаток до подагри та гіперурикемії, існує безліч потенційних терапевтичних застосувань алопуринолу та оксипуринолу при різних формах ішемічних та інших типів пошкоджень тканин та судин, запальних захворюваннях та хронічній серцевій недостатності.

Хоча алопуринол є дуже ефективним препаратом, він є відносно слабким інгібітором ксантинооксидази в аналізах *in vitro*, із зафіксованими значеннями  $IC_{50}$  від 0,2 до 50 мкМ. Ранні пошуки нових інгібіторів ксантинооксидази, що підсилювались успіхом алопуринолу, були зосереджені на синтетичних похідних пурину та піримідину. Однак структура препарату, що базується на мотивах пурину та піримідину, відповідає за деякі побічні ефекти, спричинені алопуринолом, тобто висипання (виникають у 2–8% пацієнтів), внаслідок метаболічного перетворення ліків у відповідні

нуклеотиди під дією фосфорибозилтрансферази. Це спонукало до пошуку нових інгібіторів ксантиноксидази, які структурно відрізняються від пуринів [20].

Дещо несподіваний, але корисний поворот відбувся в 1960-х роках, коли Е.К. Ходжсон та І.Фрідович [21] з'ясували роль ксантиноксидази у виробництві вільних радикалів. Пізніше вони ввели геніальний аналіз для утворення та виявлення супероксидних радикалів на основі виробництва ксантиноксидази / ксантину  $O_2$ . У міру посилення пошуків лікарських засобів, що поглинають вільні радикали, цей аналіз зазвичай використовувався для скринінгу активності гасіння вільних радикалів екстрактів та природних сполук, отриманих з рослин та інших джерел [22].

Авторами [20] був досягнутий певний прогрес у розумінні структури ферменту ксантиноксидази, і раціональні підходи до розробки лікарських засобів призвели до відкриття нових потужних інгібіторів ксантиноксидази різних класів, включаючи аналоги пурину, похідні імідазолу, триазолу та флавоноїди. Дві з них дуже потужні нові сполуки: 2-[3-ціано-4-(2-метилпропокси) феніл]-4-метилтіазол-5-карбонова кислота та Y-700 (схема 1.1) мають сприятливий токсикологічний профіль, високу біодоступність та більш потужну та довготривалу гіпоуремічну дію, ніж алопуринол. Наразі ці нові сполуки перебувають у клінічних випробуваннях на людях для лікування гіперурикемії та подагри [23].

У структурі ксантиноксидази є алостеричний центр, представлений одним залишком гістидину, одним залишком серину, двома залишками тирозину і одним залишком фенілаланіну. Алостеричними інгібіторами ксантиноксидази є кортикостероїди, поліхлорбіфеніли, поліхлордобензодіоксини, що зв'язуються з алостеричним центром ферменту. Цікаво відзначити, що алостеричні інгібітори ксантиноксидази знижують продукцію ферменту супероксиду. На рис. 1.3. показано розташування 4,9-дихлордобензодіоксину в алостеричному центрі ксантиноксидази.



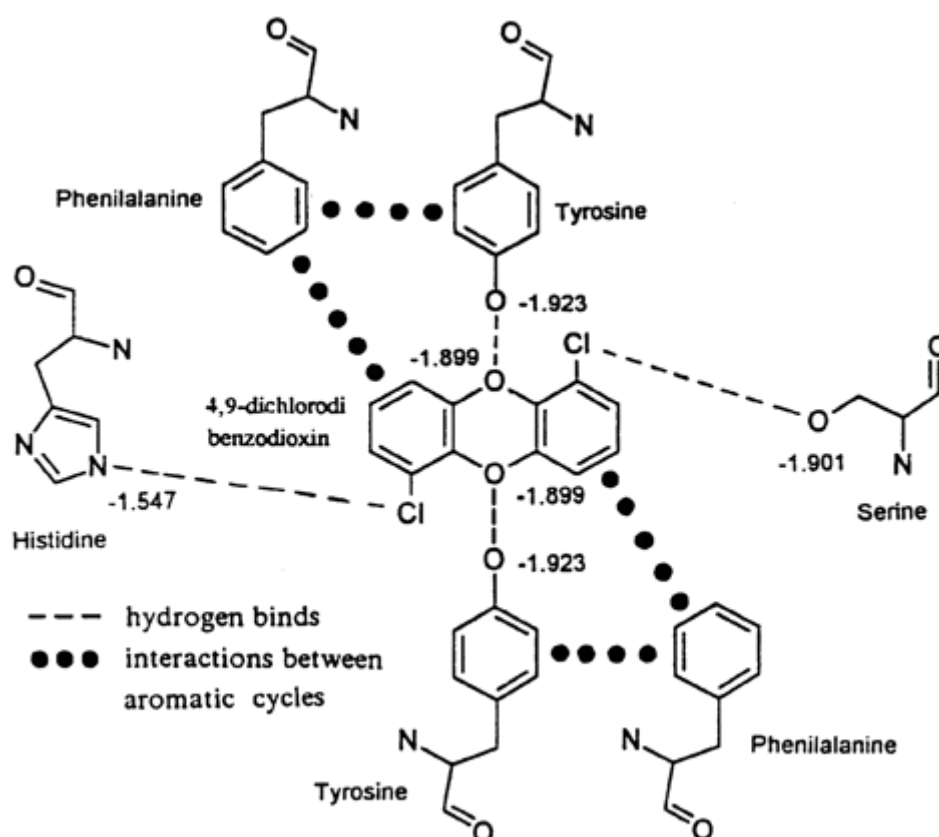


Рис.1.3. Розташування 4,9-дихлордібензодіоксину в алостеричному центрі ксантиноксидази

Наступними інгібіторами ксантиноксидази є основи Шиффа, які вивчаються як протигрибкові, антибактеріальні, противірусні, протизапальні і протипухлинні агенти [24]. Вони здатні до інгібування ферментативної активності холінестераз та деяких інших ферментів, а також проявляють антиоксидантні властивості [25]. АзOMETинові похідні *para*-амінобензойної кислоти можуть проявляти антиоксидантні властивості та інгібувати ксантиноксидазу зі значенням  $IC_{50}$  у мікромольному діапазоні. Аналіз залежності «структура–активність» вказує на те, що карбоксильна і гідроксильна групи в структурі азOMETинів мають істотне значення для закріплення інгібіторів у активному центрі ксантиноксидази [8]. АзOMETинові похідні *para*-амінобензойної кислоти наведені на схемі 1.2.

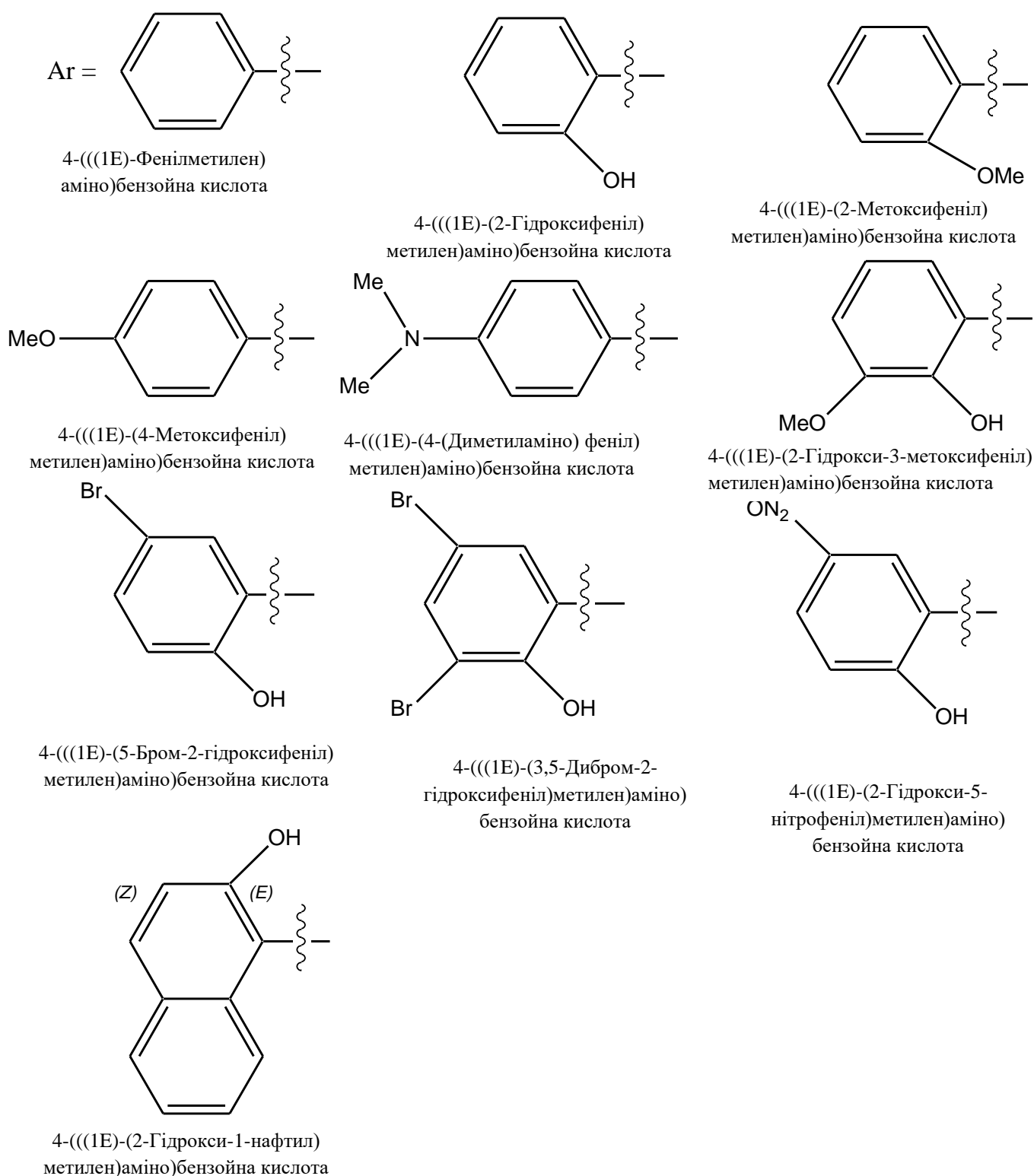


Схема 2.2. АзOMETинові похідні *para*-амінобензойної кислоти

Аналіз залежності активності від структури інгібіторів вказує на те, що наявність 2-гідроксифенільного фрагмента сприяє комплексоутворенню з ксантинооксидазою [8].

Пошук інгібіторів ксантиноксидази привів до ряду ефективно діючих *in vitro* похідних 1-фенілпіразолу [26], 6-(N-бензоїламіно)пурину [27], 2-заміщених 6-арилметиленгідразино-7H-пуринів [28] та інших сполук [29].

Інгібітори ксантиноксидази зазвичай використовуються для лікування нефропатії та нефролітіазу, пов'язаних з гіперурикемією. Останнім часом спостерігається інтерес до потенційної вигоди ксантиноксидази у профілактиці судинних захворювань через нові докази, які свідчать про роль сечової кислоти сироватки крові в розвитку серцево-судинних захворювань [30].

Інгібітори ксантиноксидази – це агенти, які безпосередньо пригнічують синтез сечової кислоти *in vivo*. Повідомляється [31], що деякі активні компоненти, які присутні в свіжих рослинних екстрактах, такі як флавоноїди та поліфенольні сполуки, мають інгібітори ксантиноксидази. Ці дослідження відкрили можливість виділення нових природних сполук, які можуть бути можливими інгібіторами ксантиноксидази, і призвели до зростаючого інтересу дослідження лікарських рослин.

Повідомлялося про активність флавоноїдів як інгібіторів ксантиноксидази *in vitro*. Відсутність гідроксильної групи при С-3 дещо посилює інгібуючий ефект на ксантиноксидазу [32]. У традиційній медицині використовуються багато рослин та їх екстрактів для лікування різних захворювань, які є результатом підвищеної активності ксантиноксидази. Вчені дослідили, чому деякі рослини та їх екстракти мають інгібуючу дію на активність цієї сполуки (табл. 1.1) [33].

Таблиця 1.1. Значення  $IC_{50}$  флавоноїдів та алопуринолу для інгібування ксантиноксидази.

| Природні сполуки<br>та лікарські засоби | Значення $IC_{50}$ ,<br>(мкМ) $\pm$ стандартне відхилення |
|---|---|
| ( $\pm$ )-Таксіфолін                    | >100  |
| (+)-Катехін                             | >100  |

|                                   |             |
|-----------------------------------|-------------|
| (-)-Епікатехін                    | >100        |
| (-)-Епігалокатехін                | >100        |
| Нарингенін                        | >50         |
| 7-Гідроксифлаванони               | 38,0 ± 7,0  |
| 5,7-Дигідроксифлаванон            | 0,84 ± 0,13 |
| Апігенін                          | 0,70 ± 0,23 |
| Лютеолін                          | 0,55 ± 0,04 |
| Байкалін                          | 2,79 ± 0,01 |
| 3-Гідроксифлаванон                | >100        |
| Галангін                          | 1,80 ± 0,07 |
| Кемпферол                         | 1,06 ± 0,03 |
| Кверцетин                         | 2,62 ± 0,13 |
| Фізетин                           | 4,33 ± 0,19 |
| Морин                             | 10,1 ± 0,70 |
| Міріцетин                         | 2,38 ± 0,13 |
| Алопуринол                        | 0,24 ± 0,01 |
| Лютеолін + Епігалокатехін (1 : 1) | 0,76 ± 0,08 |

У таблиці 1.1. наведені рослинні екстракти та чисті сполуки як потужні інгібітори ксантиноксидази. Досліджено взаємозв'язок структури та активності флавоноїдів як інгібіторів зазначеної сполуки та як поглиначів супероксидного радикала, що утворюються під дією ферменту ксантиноксидази. Гідроксильні групи при С-5 і С-7 і подвійний зв'язок між С-2 і С-3 були необхідними для високої інгібуючої активності на ксантиноксидазу. Флаволи виявляли дещо вищу інгібуючу активність, ніж флавоноли [32].

Додатковим, важливим показанням для клінічного застосування алопуринолу та, можливо, майбутніх інгібіторів ксантиноксидази є синдром лізису пухлини, пов'язаний з хіміотерапією пухлини [34]. Зрозуміло, що за

обох показань інгібування ксантиноксидази є дуже ефективним. Алопуринол, який отримує активний метаболіт оксипуринолу *in vivo*, незворотно інгібує ксантиноксидазу. Незважаючи на те, що терапевтична доза алопуринолу досить висока, самостійне введення такої дози не обов'язково представляє проблему.

Отже, проблема і потреба в нових, вдосконалених інгібіторах ксантиноксидази головним чином пов'язані з відносно високою частотою побічних ефектів, що спостерігаються при застосуванні алопуринолу у пацієнтів з подагрою. Ці ефекти включають гострі проблеми, такі, як: прогресуючий лейкоцитоз, асептичний менінгіт, нефрит, ниркова дисфункція та порушення функції печінки [35].

Так званий «синдром гіперчутливості до алопуринолу» іноді може призвести до летального результату. Альтернативи алопуринолу досить обмежені. Терапевтичні варіанти у тих пацієнтів, яким традиційні урикозуричні препарати (алопуринол, етамід, уродан та ін.) протипоказані, неефективні або погано переносяться, включають повільну пероральну десенсибілізацію до алопуринолу та обережне введення оксипуринолу. Десенсибілізація до алопуринолу корисна, особливо тим, у кого інші способи лікування зазнали невдачі. Бензбромарон може бути ефективним для пацієнтів із подагрою та нирковою недостатністю легкої та середньої тяжкості. Рекомбінантна уратова оксидаза не є широко доступною, але вона, безумовно, показала перспективу для короткочасної профілактики та лікування хіміотерапевтичної гіперурикемії у пацієнтів з лімфопроліферативними та мієлопроліферативними розладами [36].

У роботі [15] продемонстрували, що ішемічна травма кишечника мала місце лише при реперфузії. На основі цього спостереження було висунуто гіпотезу про те, що похідні ксантиноксидази сприяють ішемічному пошкодженню внаслідок катаболізму АТФ під час гіпоксії та збільшення доступності електронних акцепторів при реперфузії.

Одна з найбільш суперечливих напрямів дослідження щодо ксантиноксидази пов'язана з патогенетичною роллю ксантиноксидази в інфаркті міокарда. Дослідження, що проведені біля двох десятиліть тому, показали, що введення алопуринолу має оздоровчий ефект на ішемізовані та реперфузійні аритмії серця. Кардіопротекторні ефекти алопуринолу є клінічно придатними для використання [37]. За аналогією з кардіопротекторними ефектами алопуринолу сполука також була випробувана на різних моделях ішемізованого та реперфузованого мозку [38].

Попередня обробка алопуринолом є захисною в ішемізованій та реперфузованій кишці, тому сприятливо впливає на зміни судинної проникності [39], нейтрофільної інфільтрації [40], транслокації бактерій [41], кишкового запального рівня хемокіну [42], моторики [43] та смертності [44].

Існують значні експериментальні дані про роль ксантиноксидази у ішемізованій та реперфузованій печінці та нирках. В дослідженні [45] пропофол (знеболюючий засіб) ослаблював ішемічно-реперфузійну травму печінки у пацієнтів, які перенесли операцію за рахунок зменшення супероксиддисмутази та активності ксантиноксидази.

Проаналізовано, що додаткові захисні режими дії алопуринолу включають захист від пошкодження судин та прогресуючу гемодинамічну декомпенсацію і зменшення транслокації бактерій в кишечнику. Існують також деякі експериментальні дані щодо збільшення експресії ксантиноксидази та обмеженого корисного впливу алопуринолу при інших формах шоку (ендотоксичному, септичному, травматичному, анафілактичному) [46].

Дослідження *in vitro* на ізольованих серцях продемонстрували, що прогресуючий розвиток серцевої недостатності пов'язаний із підвищенням рівня ксантиноксидази міокарда, що сприяє посиленню окисного стресу в серці [47]. У пацієнтів з ідіопатичною дилатаційною кардіоміопатією, внутрішньокоронарне введення алопуринолу призвело до різкого, значного поліпшення ефективності міокарда за рахунок зменшення споживання кисню

за наявності стандартної підтримуючої терапії. Гостра внутрішньовенна інфузія алопуринолу або хронічне лікування препаратом протягом 1 місяця покращили функцію ендотелію у пацієнтів [48].

Інгібування ксантиноксидази за допомогою алопуринолу змінює NO-залежну дисфункцію ендотелію у завзятих курців [49]. Цікаво, що конденсат тютюнового диму регулює ксантиноксидазу і підвищує його активність в клітинах ендотелію легенів. У хворих на цукровий діабет I типу, алопуринол знижує ступінь окисного стресу (глікація гемоглобіну, окислення глутатіону та перекисне окислення ліпідів), тоді як у хворих на цукровий діабет II типу з легкою гіпертензією, тривале лікування алопуринолом привело до значного поліпшення функції вазорелаксанта, що залежить від периферичного ендотелію [50].

Повідомляється, що природні інгібітори ксантиноксидази широко використовуються в традиційній індійській медицині для лікування запальних розладів та подагри [51].

У народній медицині папороть деревна застосовувалася при подагрі, але її найактивніший компонент, кофеїнова кислота, виявилася лише слабким інгібітором ксантиноксидази [52].

Фітинова кислота є високофосфорильованою молекулою, яка міститься в рослинах, що включає 1-5% по масі їстівних бобових, злакових та олійних насінин, має інгібуючу активність ксантиноксидази [53].

Літоспермова кислота (LSA), виділена з коренів *Salvia miltiorrhiza*, пригнічує утворення сечової кислоти та супероксидних радикалів, і демонструє конкурентне інгібування ксантиноксидази. LSA має протизапальну дію на моделі подагричного артриту [54].

Відомо, що ефірна олія з листя *Cinnamomum topiloeum* володіє сильною інгібуючою активністю ксантиноксидази [55].

Висушені зрілі листя папайї *Carica* екстрагують дистильованою водою та оптимізують для отримання вищої інгібуючої активності ксантиноксидази. Далі екстракт піддають флеш-хроматографії з оберненою фазою (RPFCC) і

високоєфективною тонкошаровою хроматографією (HPTLC) для очищення. Попередня ідентифікація за допомогою хімічного скринінгу виявляє наявність кількох вторинних метаболітів, головним чином, флавоноїдів, алкалоїдів, сапонінів, алкалоїдів ксантину, терпеноїдів та антранольних глікозидів, які можуть бути відповідальними за фармакологічні властивості цієї рослини та її значення у щоденному споживанні, особливо для пацієнтів із подагрою [56].

Поліфенольні сполуки, що присутні в бобових, мають корисні властивості для здоров'я. Дієтичні поліфенольні сполуки, переважно флавоноїди, мають антиоксидантні властивості та є потужними інгібіторами активності ксантиноксидази. З метою відкриття нових природних дієтичних інгібіторів ксантиноксидази, деякі поліфенольні фракції та чисті сполуки, виділені з двох екстрактів рослин бобових культур, були перевірені на їх вплив активності ксантиноксидази. Фракції, виділені з рослинних екстрактів *Vicia faba* та *Lotus edulis*, були потужними інгібіторами ксантиноксидази зі значеннями  $IC_{50}$  в діапазоні від 40-135 мкг/мл та 55-260 мкг/мл, відповідно. Усі чисті поліфенольні сполуки інгібували ксантиноксидазу. Десять сполук наслідували неконкурентну інгібіторну модель, тоді як одна з них була конкурентним інгібітором. Ці висновки вказують на те, що флавоноїдні ізоляти з екстрактів рослин бобових є новими, природними інгібіторами ксантиноксидази [57].

Авторами [58] проведено оцінку потенціалу видів *Caulerpa* як природного засобу від подагри. Серед морських водоростей каулерпа викликала інтерес у багатьох вчених через її домінуючий метаболіт сесквітерпеноїдів.

Етанольний екстракт *Lonicera hypoglausa* (ЛН) досліджено [59] на інгібування ксантиноксидази. Екстракт етанолу та його розчинні підфракції суттєво пригнічують активність ксантиноксидази, значення  $IC_{50}$  для ЛН-сирої та ЛНЕА становлять 48,8 та 35,2 мкг/мл. Виділені біофлавоноїди демонстрували значне пригнічення ксантиноксидази ( $IC_{50} = 0,85$  мкг/мл). Ці результати дозволяють припустити, що *L. Hypoglausa* та її екстракти можуть



мати практичний інтерес для розробки та клінічного застосування в якості протигіперурикемічного засобу.

Загалом виявлено, що флавоноїди мають дуже добру інгібуючу активність ксантиноксидази. Серед них апігенін виявився найбільш активним. Кверцетин, мірецетин і геністеїн також демонстрували гарні конкурентні інгібуючі властивості. Слід зазначити, що нарингенін взагалі не виявляв активності, що може свідчити про необхідність площинної структури для цієї діяльності [60].

Розглянуто, що похідні кумарину, такі як ескулетин та 4-метилескулетин, мають також гарну активність інгібіторів ксантиноксидази [61].

Авторами [62] досліджена антиоксидантна активність субфракцій (метанол (СЕ), хлороформ (СНЕ) та етилацетат (ЕАЕ) аналізували на їх фітокомпоненти методом ВЕРХ). Знайдено проціанідини В<sub>1</sub> та В<sub>2</sub>, галову кислоту, катехін та епікатехін. Усі екстракти виявляють інгібуючі властивості на ксантиноксидазу з ІС<sub>50</sub> у діапазоні від  $0,80 \pm 0,07$  до  $11,76 \pm 0,50$  мкМ.

Досліджено [63] ферменти в якості інгібіторів ксантиноксидази, що виділені з екстрактів коренів *Tephrosiapurpurea* Linn. Дослідження проводили на очищеній молочній ксантиноксидазі. Екстракти коренів та фітохімікати, отримані в дистильованій воді, інгібували молочну ксантиноксидазу залежно від концентрації. Фітохімічний аналіз виявив значну кількість поліфенолів та флавоноїдів (90% та 80% відповідно). Скринінг інгібуючої активності ксантиноксидази екстрактом, з точки зору кінетичних параметрів, виявив неконкурентний режим інгібування. Ці результати свідчать про те, що екстракт кореня *T. purpurea* має видатні лікувальні властивості.

Авторами [64] проведено дослідження *in vitro* щодо інгібування ксантиноксидази кремнієм та такими комерційно доступними терпеноїдами, як бісаболол, β-каріофілен, лімонен та α-терпінен. Програму AutoDock 4.2 використовували для досліджень молекулярного стикування, а інгібуючу активність ксантиноксидази *in vitro* проводили з використанням ксантину в

якості субстрату. Стандартним був алопуринол. Результати показали, що бісаболол виявляв найнижчу енергетичну цінність близько 7,33 ккал/моль. Усі інші сполуки демонстрували значення енергії зв'язування в діапазоні від 7,33 до 5,87 ккал/моль, що було менше, ніж стандарт (4,78 ккал/моль). В аналізі ксантиноксидази було встановлено, що значення  $IC_{50}$  бісабололу становить 34,70 мкг/мл, тоді як значення алопуринолу – 8,48 мкг/мл. Усі інші сполуки демонстрували значення  $IC_{50}$  в діапазоні від 34,70 до 68,45 мкг/мл за результатами дослідження.

Таким чином, терпеноїди можуть бути перспективними засобами для лікування подагри та супутніх запальних розладів.

#### **1.4. Заключення. Постановка задачі**

Аналіз літературних джерел щодо інгібіторів ксантиноксидази, дозволяє константувати, що вони можуть використовуватися як лікарські засоби. Тому, дослідження 6-(*N*-ациламіно)пуринів та метоксизаміщених похідних *N*6-бензоїладеніну в якості інгібіторів ксантиноксидази має не лише науковий, а й практичний інтерес. Методи та результати дослідження зазначених речовин в якості інгібіторів ксантиноксидази розглянуто в розділах II та III.

## РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

### 2.1. Матеріали

В роботі використовували ксантиноксидазу з коров'ячого молока (Sigma-Aldrich). Модельна система вміщувала 50 мМ натрій-фосфатний буфер (рН 7,4), 50 мкМ ксантин, інгібітор, 0,1 мМ ЕДТА і 1 об. % диметилсульфоксиду.

### 2.2. Вивчення *in vitro* дослідження 6-(*N*-ациламіно)пуринів

Після термостатування модельної системи впродовж 5 хвилин при 25 °С ферментативну реакцію розпочинали додаванням ксантиноксидази (0,156 од/мл). У випадку ініціювання реакції субстратом до реакційної суміші, яка вміщувала інгібітор з ферментом, після термостатування додавали ксантин. Швидкість реакції контролювали спектрофотометрично при довжині хвилі 293 нм. Значення  $IC_{50}$  визначали з графіку співвідношення залишкової активності ферменту від концентрації інгібітора.

### 2.3. Моделювання способу зв'язування *N*6-(3,4-диметоксибензоїл)аденіну в активному центрі ксантиноксидази

Спосіб зв'язування *N*6-(3,4-диметоксибензоїл)аденіну в активному центрі ксантиноксидази моделювали за допомогою модифікованої версії програми Autodock 4.2 [65]. Сполуку було орієнтовано пуриновим фрагментом в область активного центру ланцюга С кристалічної структури ксантиноксидази з PDB кодом 3B9J [66], що в якості ліганда в активному центрі вміщувала 2-гідрокси-6-метилпурин. З метою орієнтації інгібітора для атома С8 пуринового фрагменту було задано область закріплення з радіусом 3 Å та центром з координатами  $x$ ,  $y$  та  $z$  -57,055, -18,200 та 19,928, відповідно. Перед початком моделювання з файлу ферменту, завантаженого з PDB

серверу ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)), вилучено ліганди, молекули води та зайві субодиниці ферменту. Однак, молекула води НОН1365, що бере участь в каталітичному перетворенні субстрату та є важливою для закріплення 2-гідрокси-6-метилпурину, не була вилучена [67]. Крім того, атом Оксигену каталітично важливої гідроксильної групи молібденового кофактору було заміщено атомом Оксигену молекули води з відповідною назвою НОН(MOS1334). Структуру інгібітора оптимізовано у силовому полі MMFF94s програмою Avogadro [68] та підготовлено до докінгу програмою MGLTools. Режими зв'язування передбачено генетичним алгоритмом Ламарка (LGA). Отримані моделі фермент-інгібіторних комплексів з найнижчою енергією зв'язування проаналізовано за допомогою програми Discovery Studio.

#### **2.4. Моделювання способу зв'язування 4-((9H-пурин-6-іл)аміно)- N-(9H-пурин-6-іл)бензаміду в активному центрі ксантиноксидази**

Моделювання способу зв'язування  $N^1, N^4$ -біс(9H-пурин-6-іл)бензен-1,4-дикарбоксамід в області активного центру ксантиноксидази виконано за допомогою програми Autodock 4.2 з використанням генетичного алгоритму Ламарка (LGA). Докінг сполуки було здійснено в ланцюг C кристалічної структури ксантиноксидази з кодом 3B9J [66]. Підготовка файлу фермента, завантаженого з PDB серверу ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)), включала видалення лігандів, молекул води та зайвих субодиниць ксантиноксидази. Проте молекула води НОН1365, що може брати участь в ферментативному процесі і є важливою для закріплення 2-гідрокси-6-метилпурину у кристалічній структурі ферменту, не була вилучена [67]. Каталітично важливу гідроксильну групу молібденового кофактору було замінено молекулою води з відповідною назвою НОН(MOS1334). Структуру сполуки оптимізовано з використанням силового поля MMFF94s у програмі Avogadro [68]. Підготовку файлів для докінгу здійснено програмою MGLTools. Модель зв'язування сполуки  $N^1, N^4$ -біс(9H-

пурин-6-іл)бензен-1,4-дикарбоксамід в області активного центру ксантинооксидази було розглянуто за допомогою програми Discovery Studio.

Таким чином, нами вивчено *in vitro* дослідження 6-(N-ациламіно)пуринів, моделювання способу зв'язування N6-(3,4-диметоксибензоїл)аденіну в активному центрі ксантинооксидази та моделювання способу зв'язування 4-((9H-пурин-6-іл)аміно)-N-(9H-пурин-6-іл)бензаміду в активному центрі ксантинооксидази.

## РОЗДІЛ III. ВИВЧЕННЯ ПОХІДНИХ 6-(N-АЦИЛАМІНО)ПУРИНУ ЯК ІНГІБІТОРІВ КСАНТИНОКСИДАЗИ

### 3.1. Метоксизаміщені похідні N6-бензоїладеніну як інгібітори ксантинооксидази

Нами [69] досліджено N6-(2-метоксибензоїл)аденіну, N6-(3,4-диметоксибензоїл)аденіну і N6-(2,4,5-триметоксибензоїл)аденіну (сполуки **3.1-3.3**, рис. 3.1) в якості інгібіторів ксантинооксидази.

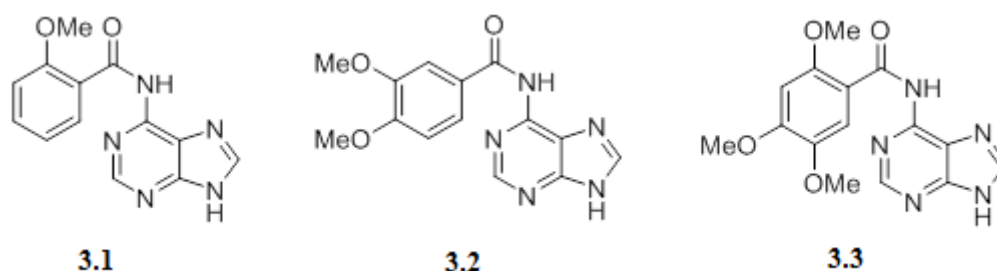


Рис. 3.1. Структури метоксизаміщених похідних N6-бензоїладеніну.

Результати досліджень *in vitro* вказують на те, що інгібувальний ефект сполук **3.1-3.3** на активність ксантинооксидази характеризується повільним облаштуванням інгібітора в активному центрі ферменту. Тому для кількісної оцінки впливу інгібіторів було використано два методичних підходи, перший з яких передбачав ініціювання ферментативної реакції додаванням ферменту, а другий – субстрату, тобто, інгібітор попередньо витримувався або з субстратом, або з ферментом. При ініціюванні ферментативної реакції додаванням ксантинооксидази до суміші субстрату з інгібітором наявність метоксигруп у структурі сполук **3.1-3.3** приводила до зменшення інгібувального впливу у порівнянні з N6-бензоїладеніном, для якого значення  $IC_{50}$  становить 0,55 мкМ (табл. 3.1). При цьому найслабший інгібувальний ефект відслідковувався для N6-(2,4,5-триметоксибензоїл)аденіну (**3.3**). Значно меншу залишкову активність ксантинооксидази реєстрували при попередньому інкубуванні ферменту з інгібітором з подальшим додаванням субстрату.

Залежність активності ферменту від концентрації інгібіторів **3.1-3.3** за цих умов демонструє рис. 3.2.

Таблиця 3.1. Інгібування активності ксантиноксидази сполуками **3.1-3.3**<sup>а</sup>

| Сполука    | IC <sub>50</sub> , мкМ <sup>б</sup> | IC <sub>50</sub> , мкМ <sup>в</sup> |
|------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>3.1</b> | 1,32 ± 0,49                         | 0,2 ± 0,013                         |
| <b>3.2</b> | 1,04 ± 0,02                         | 0,6 ± 0,12                          |
| <b>3.3</b> | 21,04 ± 1,58                        | 1,57 ± 0,46                         |

<sup>а</sup>значення IC<sub>50</sub> є середнім з двох-трьох вимірювань ± стандартне відхилення; <sup>б</sup>реакцію ініціювали додаванням ферменту; <sup>в</sup>реакцію ініціювали додаванням субстрату.

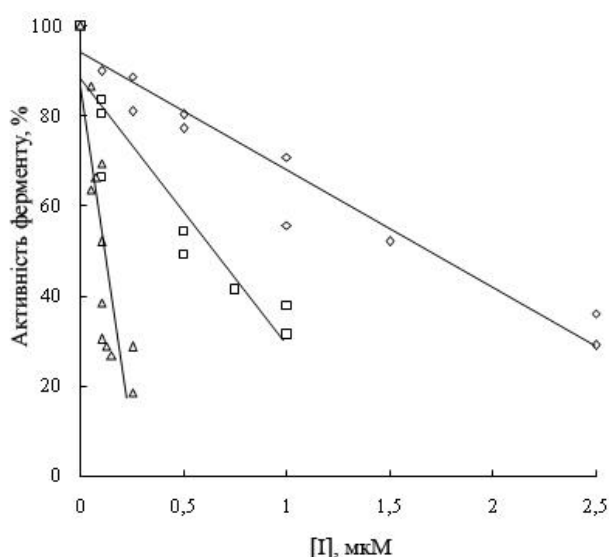


Рис. 3.2. Інгібування ксантиноксидази сполуками **3.1** (Δ), **3.2** (□) та **3.3** (◇) при інкубуванні ксантиноксидази з інгібітором з подальшим додаванням субстрату.

Із табл. 3.1 видно, що різниця в активності інгібіторів, яка визначалася за першою або за другою методикою, найбільшою мірою проявляється для сполук **3.1** та **3.3**. Спільною рисою у структурі цих сполук є наявність метоксигрупи в *орто*-положенні бензоїльного фрагменту, що, очевидно,

перешкоджає вільному розташуванню інгібітора в активному центрі ксантинооксидази.

Відомо, що аденін характеризується можливістю існування кількох таутомерних форм. Відповідно до комп'ютерних розрахунків та даних ЯМР спектроскопії, 9NH-таутомер є найбільш енергетично вигідним. Це обумовлено стеричними перешкодами при розташуванні протону біля атома нітрогену в положенні 7 внаслідок впливу аміногрупи аденіну [70, 71]. Проте кристалічна структура *N*6-бензоїладеніну свідчать про існування 7NH-таутомерної форми, що обумовлено внутрішнім міжмолекулярним зв'язком поміж атомом кисню карбонільної групи та протоном, що розміщений біля атому нітрогену в положенні 7 пуринового фрагменту [72, 73]. Тому для докінгу було обрано структури *N*6-(3,4-диметоксибензоїл)аденіну (**3.2**) в 7NH- та 9NH-таутомерних формах.

Відповідно до результатів молекулярного докінгу, 7NH-таутомер *N*6-(3,4-диметоксибензоїл)аденіну (**3.2**) має вільну енергію зв'язування в активному центрі ксантинооксидази -8,41 ккал/моль, тоді як майже ідентичне положення 9NH-таутомеру має енергію зв'язування -8,16 ккал/моль. Розміщуючись в області активного центру ксантинооксидази (рис. 3.3А) 7NH-таутомер сполуки **3.2** займає місце субстрату – 2-гідрокси-6-метилпурину (рис. 3.3Б). Закріплення положення пуринового фрагменту інгібітора забезпечується за рахунок водневих зв'язків з амінокислотними залишками Glu802 та Ser876,  $\pi$ -стекинг-взаємодією з Phe914 та Phe1009, а також гідрофобними та електростатичними взаємодіями з Ala910, Ala1078 і Ala1079. Крім того, є контакт пуринового фрагменту з Glu1261 через молекулу води НОН1336. 3,4-Диметоксизаміщений бензоїльний фрагмент інгібітора розташовується на виході з активного центру ксантинооксидази у гідрофобній області, що оточена амінокислотними залишками Leu648, Leu873, Leu1014 та Pro1076. Необхідно зазначити, що відстань від каталітично важливого атома кисню молібденового кофактору, що в моделі представлений молекулою води НОН(МОS1334), до атома С8 пуринового фрагмента інгібітора складає



2,82 Å, тоді як відстань до цього атома в структурі субстрату 2-гідрокси-6-метилпурину становить 2,23 Å (рис. 3.3Б).

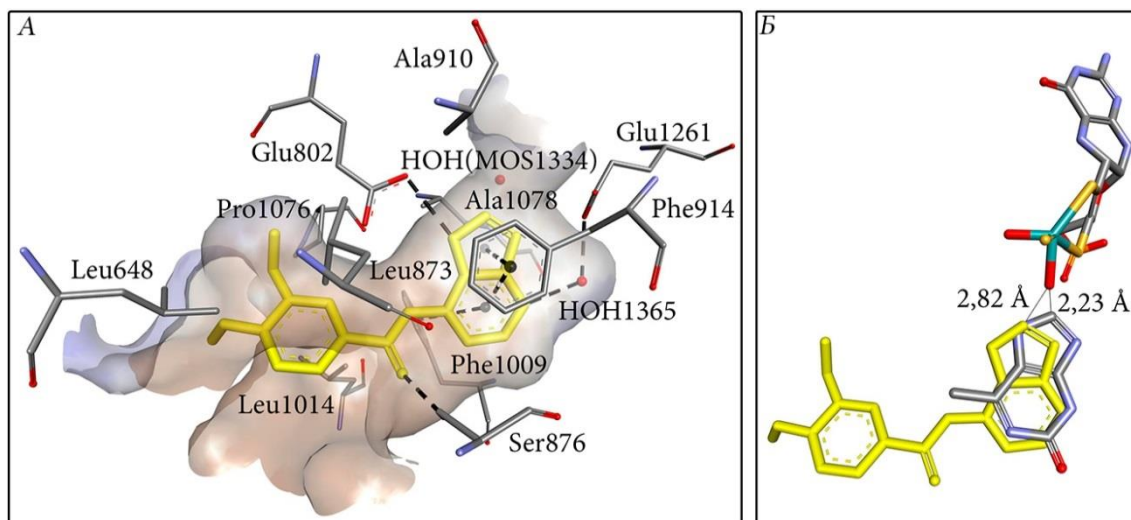


Рис. 3.3. Модель зв'язування сполуки **3.2** в активному центрі ксантиноксидази (А) та порівняння положення пуринового фрагменту цієї сполуки з позицією 2-гідрокси-6-метилпурину в PDB кристалі (Б).

Таким чином, метоксизаміщені похідні *N*6-бензоїладеніну, які є інгібіторами BRD4, здатні інгібувати активність ксантиноксидази, повільно зв'язуючись з ферментом. Отримані результати молекулярного моделювання вказують на те, що *N*6-бензоїлзаміщені похідні аденіну можуть закріплюватися в активному центрі ксантиноксидази, конкуруючи за місце зв'язування з субстратом.

### 3.2. Оцінка впливу похідних 6-(*N*-ациламіно)пурину на ферментативну активність ксантиноксидази

Зважаючи на потенціал похідних 6-(*N*-бензоїламіно)пурину як мультитаргетних біоактивних сполук, нами також [74] проведено оцінку нових 6-(*N*-ациламіно)пуринів 3.5-3.9 в якості інгібіторів ксантиноксидази (рис. 3.4).

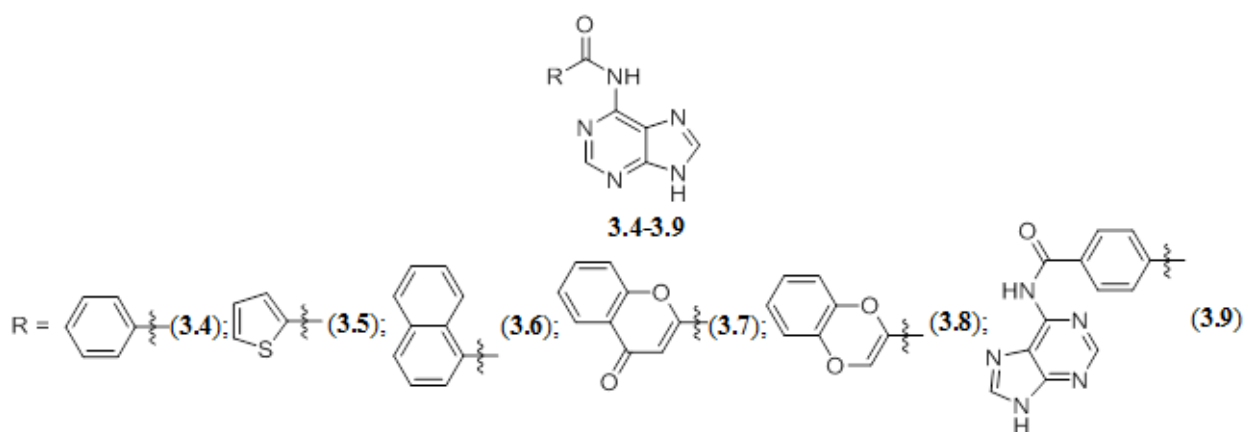


Рис. 3.4. Структури досліджених 6-(*N*-ациламіно)пуринів **3.4-3.9**.

Вивчення *in vitro* 6-(*N*-ациламіно)пуринів **3.4-3.9** проведено з використанням ксантиноксидази з коров'ячого молока, яка має значну амінокислотну ідентичність з ксантиноксидазою з печінки людини [75]. Значення  $IC_{50}$ , наведені в табл. 3.2, є концентраціями сполук, за яких активність ферменту знижується на 50%. Аналіз залежності структура-активність вказує на те, що заміна бензоїльного фрагменту в структурі референс-сполуки **3.4** на залишок тіофенкарбонової кислоти не має значного впливу на інгібування ксантиноксидази сполукою **3.5**, тоді як залишок  $\alpha$ -нафтоїної кислоти в структурі сполуки **3.6** на порядок знизив значення  $IC_{50}$ . Зростання інгібування спостерігалось для сполуки **3.7**, що містила в положенні 6 пуринового фрагменту залишок 4-оксо-4*H*-хромен-2-карбонової кислоти. Структурно близький до цього фрагменту залишок бензо[*b*][1,4]діоксан-2-карбонової кислоти знижував значення  $IC_{50}$  для сполуки **3.8** на два порядки. Сполука **3.9**, яка містила два фрагменти пурину, продемонструвала значення  $IC_{50}$  0,20 мкМ, яке було вдвічі кращим, ніж для референс-сполуки **3.4**, та співмірним зі значенням  $IC_{50}$ , отриманим для сполуки **3.7**.

Таблиця 3.2. Значення  $IC_{50}$  для похідних 6-(*N*-ациламіно)пурину **3.4-3.9** як інгібіторів ксантинооксидази<sup>a</sup>

| Сполука    | $IC_{50}$ , мкМ  |
|------------|------------------|
| <b>3.4</b> | 0,55 ± 0,04 [69] |
| <b>3.5</b> | 0,82 ± 0,18      |
| <b>3.6</b> | 5,03 ± 0,49      |
| <b>3.7</b> | 0,17 ± 0,03      |
| <b>3.8</b> | 16,81 ± 8,05     |
| <b>3.9</b> | 0,20 ± 0,06      |

<sup>a</sup>Значення  $IC_{50}$  є середнім з двох-трьох вимірювань ± стандартне відхилення.

Отримана модель зв'язування сполуки **3.9** в області активного центру ксантинооксидази, що представлена на рис. 3.5, характеризується енергією докінгу -9,38 ккал/моль. У цій моделі один з пуринових фрагментів сполуки **3.9** формує водневі зв'язки з амінокислотним залишком Glu802, Thr1010, а також з Glu1261 через молекулу води НОН1365. Додатково положення цього пуринового фрагменту стабілізовано за рахунок  $\pi$ -стекінг взаємодій з амінокислотним залишком Phe914 та гідрофобними взаємодіями з залишком Phe1009. Бензоїльний фрагмент інгібітора розміщується на виході з активного центру ксантинооксидази і оточений гідрофобними амінокислотними залишками Leu648, Leu873, Val1011 та Leu1014. Положення іншого пуринового фрагменту в представленій моделі фермент-інгібіторного комплексу характеризується  $\pi$ -катіонною взаємодією з амінокислотним залишком Lys771.

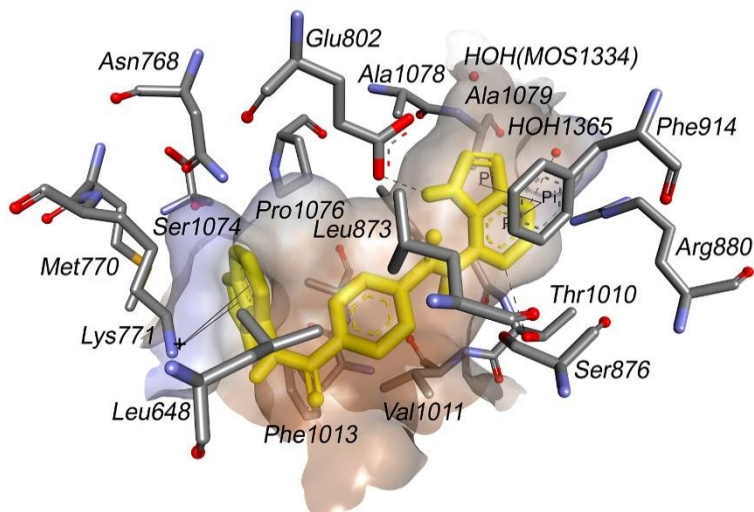


Рис. 3.5. Модель зв'язування сполуки **3.9** в області активного центру ксантиноксидази.

Таким чином, зростання інгібування спостерігалось для сполуки **3.7**, що містила в положенні 6 пуринового фрагменту залишок 4-оксо-4*H*-хромен-2-карбонової кислоти. Сполука **3.9**, яка містила два фрагменти пурину, продемонструвала значення  $IC_{50}$  0,20 мкМ, яке було вдвічі кращим, ніж для референс-сполуки **3.4**, та співмірним зі значенням  $IC_{50}$ , отриманим для сполуки **3.7**.

Отже, нами вивчено сполуки *N*6-(2-метоксибензоїл)аденіну, *N*6-(3,4-диметоксибензоїл)аденіну і *N*6-(2,4,5-триметоксибензоїл)аденіну нові похідні пурину в якості інгібіторів ксантиноксидази. Результати досліджень *in vitro* показали, що інгібувальний ефект даних сполук **3.1-3.3** на активність ксантиноксидази характеризується повільним облаштуванням інгібітора в активному центрі ферменту. Також вивчено 6-(*N*-ациламіно)пурини **3.4-3.9** де показано, що заміна бензоїльного залишку підвищує спорідненість сполук до ксантиноксидази.

## ВИСНОВКИ

1. Здійснено аналіз наукової літератури стосовно структури та механізму дії ксантинооксидази.

2. Наведено функції ксантинооксидази в організмі людини та виявлено, що основна функція ксантинооксидази полягає в утворенні сечової кислоти з первинних продуктів окислення аденіну і гуаніну.

3. Проаналізовано інгібітори ксантинооксидази та їх значення у медицині. Серед багатьох відомих інгібіторів ксантинооксидази алопуринол, оксипуринол та фебуксостат широко використовувались для лікування гіперурикемії та подагри.

4. Встановлено, що *N*6-(2-метоксибензоїл)аденін, *N*6-(3,4-диметоксибензоїл)аденін і *N*6-(2,4,5-триметоксибензоїл)аденін інгібують ксантинооксидазу, демонструючи властивості інгібіторів, що повільно зв'язуються. За результатами молекулярного докінгу проаналізовано можливий спосіб закріплення інгібіторів в активному центрі ксантинооксидази.

5. Здійснено оцінку деяких 6-(*N*-ациламіно)пуринів як інгібіторів ксантинооксидази. Показано, що заміна бензоїльного залишку в структурі 6-(*N*-ациламіно)пурину на залишок 4-оксо-4*H*-хромен-2-карбонової кислоти та функціоналізація 6-(*N*-бензоїламіно)пурину додатковим фрагментом пурину підвищує спорідненість сполук до ксантинооксидази. На основі результатів молекулярного докінгу запропоновано можливий спосіб зв'язування сполуки **3.9** в області активного центру ферменту.

6. Матеріали кваліфікаційної роботи можуть бути використані при проведенні факультативних занять з хімії у закладах середньої освіти (ліцеях з профільного навчання та спеціалізованих школах з поглибленим вивченням природничих дисциплін).

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Желябина О.В., Елисеєв М.С. Некоторые потенциальные возможности применения ингибиторов ксантиноксидазы. *Современная ревматология*. 2019. № 13(1). С. 114–120.
2. Schardinger F. Ueber das Verhalten der Kuhmilch gegen Methylenblau und seine Verwendung zur Unterscheidung von ungekochter und gekochter Milch. *Zeitschrift für Untersuchung der Nahrungs und Genussmittel*. 2015. Vol. 5. No. 22. P. 1113–1121.
3. Morgan E. J., Stewart C. P., Hopkins F. G. On the anaerobic and aerobic oxidation of xanthin and hypoxanthin by tissues and by milk. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*. 1992. No. 657, Vol. 94. P. 109–131.
4. Сумбаєв В.В., Розанов А.Я. Ксантиноксидаза как компонент системы генерирования активных форм кислорода. *Современные проблемы токсикологии*. 2001. № 1. С. 16–22.
5. Inhibitory Effects of Quercetin and Its Human and Microbial Metabolites on Xanthine Oxidase Enzyme / Mohos, V.; Pánovics, A.; Fliszár-Nyúl, E.; Schilli, G.; Hetényi, C.; Mladěnka, P.; Needs, P.W.; Kroon, P.A.; Pethő, G.; Poór, M. *Int. J. Mol. Sci.* 2019. № 20. P. 2681.
6. Leong R.W., Geary R.B., Sparrow M.P. Thiopurine hepatotoxicity in inflammatory bowel disease: The role for adding allopurinol. *Expert Opin. Drug Saf.* 2008. № 7. P. 607–616.
7. Xanthine oxidase inhibitory activity of some Indian medical plants / M. Umamaheswari, K. AsokKumar, A. Somasundaram, T. Sivashanmugam, V. Subhadradevi, T. K. Ravi. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007. Vol. 109, No. 3. P. 547–551.
8. АзOMETинові похідні п-амінобензойної кислоти як антиоксиданти та інгібітори ксантиноксидази / Кобзар О.Л., Татарчук А.В., Качаєва М.В., Пільо С.Г., Суховєєв О.В., Суховєєв В.В., Броварець В.С., Вовк А.І. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2020. № 6. С. 74–82.

9. Желябина О. В., Чикина М. Н., Елисеев М. С. Применение аллопуринола при подагре. *Кардиология Терапия*. 2017. № 10 (139). С. 57–62.
10. Allopurinol hypersensitivity is primarily mediated by dose-dependent oxypurinol-specific T cell response / Yun J., Mattsson J., Schnyder K., Fontana S., Largiadè C. R., Pichler W. J. et al. *Clin. Exp. Allergy*. 2013. №43(11). P. 1246–55.
11. An allopurinol-controlled, randomized, double-dummy, double-blind, parallel between-group, comparative study of febuxostat (TMX-67), a nonpurine-selective inhibitor of xanthine oxidase, in patients with hyperuricemia including those with gout in Japan: phase 3 clinical study / Kamatani N, Fujimori S, Hada T et al. *J Clin Rheumatol*. 2011. № 17 (4 Suppl 2). P.13–18.
12. Placebocontrolled, double-blind study of the nonpurine-selective xanthine oxidase inhibitor Febuxostat (TMX-67) in patients with hyperuricemia including those with gout in Japan: phase 3 clinical study / Kamatani N, Fujimori S, Hada T et al. *J Clin Rheumatol*. 2011. № 17(4 Suppl 2). P. 19–26.
13. Tayar J.H., Lopez-Olivo M.A., Suarez-Almazor M.E. Febuxostat for treating chronic gout. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012. № 14. P. 8653.
14. Петрова М.С., Мазуров В.И., Инамова О.В. Фебуксостат для лечения хронической гиперурикемии у пациентов, страдающих подагрой. *Медицинский совет*. 2017. №17. С. 114–122.
15. Annual Report The European Medicines Agency's contribution to science. *Medicines and health*. 2018. 100 p.
16. Hongnan Cao, James M. Pauff, Russ Hille. X-ray crystal structure of a xanthine oxidase complex with the flavonoid inhibitor quercetin. *J. Nat. Prod*. 2014. № 77. P. 1693–1699.
17. Pea F. Pharmacology of drugs for hyperuricemia: mechanisms, kinetics and interactions. *Contrib Nephrol*. 2005. № 147. P. 35– 46.
18. Rott K.T., Agudelo C.A. Gout. *JAMA*. 2003. № 289 (21). P. 2857–2860.
19. Bieber J.D., Terkeltaub R.A. Gout: on the brink of novel therapeutic options for an ancient disease. *Arthritis Rheum*. 2004. № 50. P. 2400–2414.

20. Borges F., Fernandes E., Roleira F. Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Curr Med Chem*. 2002. № 9. P. 195–217.
21. Hodgson E.K., Fridovich I. The role of O<sub>2</sub> in the chemiluminescence of luminol. *Photochem Photobiol*. 1973. № 18. P. 451–455.
22. Xia M., Dempski R., Hille R. The reductive half-reaction of xanthine oxidase: reaction with aldehyde substrates and identification of the catalytically labile oxygen. *J Biol Chem*. 1999. № 274. P. 3323–3330.
23. Selectivity of febuxostat, a novel non-purine inhibitor of xanthine oxidase / Takano Y., Hase-Aoki K., Horiuchi H., Zhao L., Kasahara Y., Kondo S., Becker M.A. *Xanthine dehydrogenase*. *Life Sci*. 2005. № 76. P. 1835–1847.
24. Prakash A., Adhikari D. Application of Schiff bases and their metal complexes-A review. *Int. J. Chem. Tech. Res*. 2011. Vol. 3, № 4. P. 1891–1896.
25. Paşa S., Tunež M., Boğa M. Biological surveying of diverse Schiff base compounds: antiproliferative, antiradical and enzyme inhibition activity. *Pharm. Chem. J*. 2019. Vol. 53, № 4. P. 302—311.
26. Synthesis and structure - Activity relationships of 1-phenylpyrazoles as xanthine oxidase inhibitors / Ishibuchi S., Morimoto H., Oe T. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2001. Vol.11, No. 7. P. 879–882.
27. 6-(N-benzoylamino)purine as a novel and potent inhibitor of xanthine oxidase: Inhibition mechanism and molecular modeling studies / Hemlata Tamta, Ramasamy Thilagavathi, Asit K. Chakraborti, Anup K. Mukhopadhyay. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2005. № 20 (4). P. 317–324.
28. Okamoto K., Nishino T. Mechanism of inhibition of xanthine oxidase with a new tight binding inhibitor. *J. Biol. Chem*. 1995. Vol. 270. No. 14. P. 7816–7821.
29. Synthesis and anticonvulsant activity of some substituted 1,2,4-thiadiazoles / Gupta S., Rodrigues L.M., Esteves A.R. et al. *Eur.J.Med.Chem*. 2008. Vol. 43, No. 4. P. 771–780.
30. Higgins P., Dawson J., Walters M. The potential for xanthine oxidase inhibition in the prevention and treatment of cardiovascular and cerebrovascular



disease. *Cardiovascular Psychiatry and Neurology*. 2009. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2790135/> (дата звернення: 25.10.2020)

31. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase / W. S. Chang, Y. J. Lee, F. J. Lu, H. C. Chiang. *Anticancer Research*. 1993. Vol. 13, No. 6, P. 2165–2170.

32. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers / P. Cos, L. Ying, M. Calomme et al. *Journal of Natural Products*. 1998. Vol. 61, № 1. P. 71–76.

33. Xanthine oxidase inhibitors from the flowers of *Chrysanthemum sinense* / M. T. Nguyen, S. Awale, Y. Tezuka, J. Y. Ueda, Q. Tran, and S. Kadota. *Planta Medica*. 2006. Vol. 72, № 1. P. 46–51.

34. The effect of initial management of hyperleukocytosis on early complications and outcome of children with acute lymphoblastic leukemia / Maurer H.S., Steinherz P.G., Gaynon P.S., Finklestein J.Z., Sather H.N., Reaman G.H., Bleyer W.A., Hammond G.D. *J Clin Oncol*. 1988. № 6. P. 1425–1432.

35. Greenberg L.E., Nguyen T., Miller S.M. Suspected allopurinol-induced aseptic meningitis. *Pharmacotherapy*. 2001. № 21. P. 1007–1009.

36. Fam A.G. Difficult gout and new approaches for control of hyperuricemia in the allopurinol-allergic patient. *Curr Rheumatol Rep*. 2001. № 3. P. 29–35.

37. Berry C.E., Hare J.M. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol (Lond)*. 2004. № 555. P. 589–606.

38. Effect of ischemiareperfusion on xanthine oxidase activity in fetal rat brain capillaries / Wakatsuki A., Okatani Y., Izumiya C, Ikenoue N. *Am J Obstet Gynecol*. 1999. № 181. P. 731–735.

39. The effects of verapamil vs. allopurinol on intestinal ischemia/reperfusion injury in rats: “an experimental study” / Kulah B., Besler H.T., Akdag

M., Oruc T., Altinok G., Kulacoglu H., Ozmen M.M., Coskun F. *Hepatogastroenterology*. 2004. № 51. P. 401–407.

40. Allopurinol and superoxide dismutase protect against leucocyte-endothelium interactions in a novel model of colonic ischaemia-reperfusion / Riaz A.A., Wan M.X., Schafer T., Dawson P., Menger M.D., Jeppsson B., Thorlacius H. *Br J Surg*. 2002. № 89. P. 1572–1580.

41. Hemorrhagic shock-induced bacterial translocation is reduced by xanthine oxidase inhibition or inactivation / Deitch E.A., Bridges W., Baker J, Ma J.W., Ma L., Grisham M.B., Granger D.N., Specian R.D., Berg R. *Surgery*. 1988. № 104. P. 191–198.

42. Oxygen radical-dependent expression of CXC chemokines regulate ischemia/reperfusion-induced leukocyte adhesion in the mouse colon / Riaz A.A., Schramm R., Sato T., Menger M.D., Jeppsson B., Thorlacius H. *Free Radic Biol Med*. 2003. № 35. P. 782–789.

43. Short-term intestinal ischemia-reperfusion alters intestinal motility that can be preserved by xanthine oxidase inhibition / Hakguder G., Akgur F.M., Ates O., Olguner M., Aktug T., Ozer E. *Dig Dis Sci*. 2002. № 47. P. 1279–1283.

44. High dose versus low dose enteral allopurinol for prophylaxis in mesenteric ischemia / Megison S.M., Horton J.W., Chao H., Walker P.B. *Circ Shock*. 1990. № 30. P. 323–329.

45. Protective effect of propofol on liver during ischemia-reperfusion injury in patients undergoing liver surgery / Lin L.N., Wang W.T., Wu J.Z., Hu Z.Y., Xie K.J. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2004. № 16. P. 42–44.

46. Enhanced NO and superoxide generation in dysfunctional hearts from endotoxemic rats / Khadour F.H., Panas D., Ferdinandy P., Schulze C., Csont T., Lalu M.M., Wildhirt S.M., Schulz R. *Am J Physiol*. 2002. № 283. P. 108–115.

47. Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure / Ferdinandy P., Danial H., Ambrus I., Rothery R.A., Schulz R. *Circ Res*. 2000. № 87. P. 241–247.

48. Effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol on endothelial function and peripheral blood flow in hyperuricemic patients with chronic heart failure: results from 2 placebocontrolled studies / Doehner W., Schoene N., Rauchhaus M., Leyva-Leon F., Pavitt D.V., Reaveley D.A., Schuler G., Coats A.J., Anker S.D., Hambrecht R. *Circulation*. 2002. № 105. P. 2619–2624.
49. Role of xanthine oxidase in conduit artery endothelial dysfunction in cigarette smokers / Guthikonda S., Woods K., Sinkey C.A., Haynes W.G. *Am J Cardiol*. 2004. № 93. P. 664–668.
50. Allopurinol normalizes endothelial dysfunction in type 2 diabetics with mild hypertension / Butler R., Morris A.D., Belch J.J., Hill A., Struthers A.D. *Hypertension*. 2000. № 35. P. 746–751.
51. Tomonori U., Akio S., Takami K. Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers. *J Ethnopharmacol*. 2004. № 93. P. 391–395.
52. Chiang H.C., Lo Y.J., Lu F.J. Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Alsophilaspinulosa* (Hook) Tryon. *J Enz Inhib*. 1994. № 8. P. 61–71.
53. Muraoka S., Miura T. Inhibition of xanthine oxidase by phytic acid and its anti-oxidative action. *Life Sci*. 2004. № 74. P. 1691–1700.
54. Chen L., Wang W., Wang Y. Inhibitory effects of lithospermic acid on proliferation and migration of rat vascular smooth muscle cells. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2009. № 30. P. 1245–1252.
55. Essential oil from leaves of *Cinnamomum mosmophloeum* acts as a xanthine oxidase inhibitor and reduces the serum uric acid levels in oxonate-induced mice / Wang S.Y., Yang C.W., Liao J.W., Zhen W.W. Chu F.H, Chang S.T. *Phytomed*. 2008. №15. P. 940–945.
56. Azmi Saiful M.N., Jamal P., Amid A. Purification of Xanthine Oxidase Inhibitor from *Carica papaya* Leaves using Reversed Phase Flash Column Chromatography (RPFCC) - High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC). *Australian J Basic App Sci*. 2012. № 6. P. 117.

57. Flavonoid Glycosides Isolated from Unique Legume Plant Extracts as Novel Inhibitors of Xanthine Oxidase / Spanou C., Veskoukis A.S., Kerasioti T., Kontou M., Angelis A., et al. *PLoS One*. 2012. № 7. P. 32214.
58. Sevilay C., Levent C., Kadir T. A Inhibition of xanthine oxidase by Caulerpenynefrom Caulerpprolifera. *Turk J Biochem*. 2012. № 37. P. 445–451.
59. Lonicera hypoglauca inhibits xanthine oxidase and reduces serum uric acid in mice / Yang C.W., Tseng Y.H., Tsay H.S., Kuo Y.H., Yang S. *Planta Med*. 2009. Vol. 75, № 4. P. 302–306.
60. Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase / Lin C.M., Chen C.S., Chen C.T., Liang Y.C., Lin J.K. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002. № 294. P. 167–72.
61. Relationship between quantum-chemical descriptors of proton dissociation and experimental acidity constants of various hydroxylatedcoumarins. Identification of the biologically active species for xanthine oxidase inhibition / Ferrari A.M., Sgobba M., Gamberini M.C., Rastelli G. *European J Med Chem*. 2007. Vol. 42, № 7. P. 1028–31.
62. Inhibitory Activity on Xanthine Oxidase and Antioxidant Properties of Teucriumpolium / Boumerfeg S., Baghiani A., Djarmouni M., Amen D., Adjadj M., Belkhiri F., et al. *Chinese Medi*. 2012. № 3. P. 30–41.
63. Nile S.H., Khobragade C.N. Phytochemical analysis, antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activity of Tephrosiapurpurea Linn. root extract. *Indian J Nat Prod Res*. 2011. №.2. P. 52–58.
64. In silico docking studies and in vitro Xanthine oxidase inhibitory activity of commercially available Terpenoids / Muthuswamy U., Prabhu R., Asokkumar K., Sivashanmugam T., Subhadradevi V., Jagannath P., Madeswaran A.. *Int J Phytopharm Res*. 2012. № 2. P. 135–142.
65. Tanchuk V. Yu., Tanin V. O., Vovk A. I. Multithreaded version of AutoDock 4.2 suitable for massive virtual screening of potential biologically active compounds (enzyme inhibitors). *Third International Conference "High Performance Computing" HPC-UA*. 2013. P. 399–401.

66. Substrate orientation in xanthine oxidase: crystal structure of enzyme in reaction with 2-hydroxy-6-methylpurine / Pauff J. M., Zhang J., Bell C. E., Hille R. *Journal of Biological Chemistry*. 2008. Vol. 283. P. 4818–4824.

67. A structure-based catalytic mechanism for the xanthine oxidase family of molybdenum enzymes / Huber R., Hof P., Duarte R. O., Moura J. J., Moura I., Liu M. Y., LeGall J., Hille R., Archer M., Romão M. J. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1996. Vol. 93. P. 8846–8851

68. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform / Hanwell M. D., Curtis D. E., Lonie D. C., Vandermeersch T., Zurek E., Hutchison G. R. *Journal of Cheminformatics*. 2012. Vol. 4. P. 17.

69. Музичка О.В., Кобзар О.Л., Глушко О.І., Суховеєв В.В., Шабликін О.В. Метоксизаміщені похідні N6-бензоїладеніну як інгібітори ксантиноксидази. *Фундаментальні та прикладні дослідження в сучасній хімії та фармації*: матер. VII Міжнар. заоч. наук.-практ. конф. молодих учених: Ніжин, 2020. С. 75–80.

70. (<sup>15</sup>N5)-labeled adenine derivatives: synthesis and studies of tautomerism by <sup>15</sup>N NMR spectroscopy and theoretical calculations / Laxer A., Major D. T., Gottlieb H. E., Fischer B. *The Journal of Organic Chemistry*. 2001. Vol. 66. P. 5463–5481.

71. Adenine eautomers: relative stabilities, ionization energies, and mismatch with cytosine / Guerra C. F., Bickelhaupt F. M., Saha S., Wang F. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2006. Vol. 110. P. 4012–4020.

72. Raghunathan S., Pattabhi V. Structure of N6-Benzoyladenine. *Acta Crystallographica*. 1981. Vol. B37. P. 1670–1673.

73. Supramolecular hydrogen-bonding patterns in the N(9)-H protonated and N(7)-H tautomeric form of an N6-benzoyladenine salt: N6-benzoyladeninium nitrate / Karthikeyan A., Jasmine N. J., Muthiah P. T., Perdihi F. *Acta Crystallographica*. 2016. Vol. E72. P. 140–143.

74. Кобзар О.Л., Музичка О.В., Шабликін О.В., Суховеєв О.В., Глушко О.І., Суховеєв В.В. Оцінка похідних 6-(N-ациламіно)пурину як

інгібіторів ксантинооксидази. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії*: матер. V Міжнар. наук.-практ. ін-т-конф: Харків, 2020. С. 229–233.

75. Enroth, Cristofer, et al. Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000. Vol. 97, № 20. P. 10723–10728.