

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК АЗЕРБАЙДЖАНА  
ИНСТИТУТ БОТАНИКИ**

*На правах рукописи*

**АНАР САХИБ ОГЛЫ ГОДЖАЕВ**

**ИССЛЕДОВАНИЕ НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ  
КСАНТИНОКСИДАЗЫ**

2406.02 – Биохимия

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

диссертации на соискание ученой степени доктора  
философии в области биологических наук

БАКУ – 2014

Работа выполнена на кафедре Биохимии и биотехнологии Бакинского Государственного Университета.

**Научный руководитель:** заслуженный деятель науки,  
доктор биологических наук  
**проф.А.А.КУЛИЕВ**  
доктор биологических наук  
**проф.Р.А.ГАСАНОВ**

**Официальные оппоненты:** заслуженный деятель науки,  
доктор химических наук  
**проф.С.В.САРКАРОВ**  
кандидат биологических наук  
старший научный сотрудник  
**Х.Ф.БАБАЕВ**

**Ведущая организация:** Азербайджанский медицинский университет, Кафедра биологической химии

Защита состоится « \_\_\_\_ » « \_\_\_\_\_ » 2014 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании Диссертационного Совета D.01.061 при Институте Ботаники НАН Азербайджана

*Адрес:* AZ 1073, г.Баку, Бадамдарское шоссе, 40

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института Ботаники НАН Азербайджана

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2014г.

**Ученый секретарь  
Диссертационного Совета D.01.061,  
доктор биологических наук, проф.**

**С.Д.ИБАДУЛЛАЕВА**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Ксантиноксидаза (КФ 1.1.3.22) – это фермент класса оксидоредуктаз, который катализирует метаболизм гипоксантина и ксантина до мочевой кислоты и в сопряжённой реакции восстанавливает кислород до супероксида. Иными словами, высокая активность указанного фермента может быть, с одной стороны, причиной повышения в сыворотке содержания мочевой кислоты, а с другой стороны, способствовать возникновению окислительного стресса. Повышенное содержание мочевой кислоты в сыворотке крови человека, в свою очередь, приводит к целому ряду патологий: гиперурикемия, подагра, сахарный диабет, заболевания сердечно-сосудистой системы, образование почечных камней и др.

Что же касается образования в результате каталитического действия ксантиноксидазы (КО) свободных радикалов, то и это является причиной развития целого спектра заболеваний, известных как опухольные заболевания, болезнь Паркинсона, Альцгеймера и др.

И в том и в другом случае, как следствие в организме человека развивается ряд заболеваний, предупредить возникновение которых можно, ингибируя активность КО.

На сегодняшний день с целью понижения активности КО уже применяется ряд синтетических ингибиторов (аллопуринол, фебуксостат, фитиновая кислота и др.). Среди таких препаратов уже более 40 лет широко используется аллопуринол, который метаболизируется КО до его активного метаболита – оксипуринола, являющимся также ингибитором КО. Но несмотря на все эти преимущества, аллопуринол обладает нежелательными побочными эффектами, такими как, тошнота, рвота, боль в области живота, диарея, гепатит, эозинофилия, гемолитическая анемия, лимфоцитоз и др.

В связи с этим поиск и изучение новых химических соединений, способных не только более эффективно подавлять каталитическую активность КО, но и обладающих в то же самое время гипоурикемическим действием, является одним из актуальных направлений современной медицинской биохимии.

Осуществление экспериментальных работ, посвященных изучению кинетических характеристик ингибирования КО представляет определенные трудности, связанные со структурными и функциональными особенностями фермента, чем и объясняется относительно ограниченное количество исследований такого характера. Необходимо также отметить и то, что, несмотря на это, эксперименты в данном направлении все-таки ведутся, хотя и не получен до сих пор желаемый результат (Khan, 2008; Falodun, 2009a; Falodun, 2009).

**Цель и задачи исследования.** Целью настоящей диссертационной работы явилось исследование новых ингибиторов КО, которые могли бы служить прототипом для создания новых лекарственных препаратов, применяемых при лечении заболеваний, связанных с повышенным содержанием мочевой кислоты в сыворотке крови и воздействием свободных радикалов. Для достижения цели поставлены следующие задачи:

- изучить ингибиторное влияние ряда синтетических и природных соединений на активность КО в условиях *in vitro* (провести первичный скрининг);
- определить  $KI_{50}$  химических соединений, подавляющих каталитическую активность КО более чем на 50%;
- определить тип ингибирования для этих соединений;
- произвести молекулярный докинг ингибиторов с молекулой КО;
- вычислить квантово-химические показатели исследованных химических соединений;
- определить гипоурикемический эффект некоторых ингибиторов КО;
- определить ингибиторное влияние некоторых химических соединений на активность печеночной КО у крыс в условиях *in vivo*.

**Научная новизна работы.** Впервые изучено ингибиторное влияние синтетических производных хромана, индола, дегидроуксусной кислоты (Шиффовые основания), бензимидазолов, коммерчески доступных химических соединений, приобретенных из компании Sigma, экстрактов 3 растений, *Ficus mucosa*, *Klainedoxa gabonensis* и *Chythrantus clancianus*, а также их компонентов на активность КО в условиях *in vitro*. Установлено, что из 362 протестированных соединений, 281 из которых были синтетическими, 41 природными и 40 коммерчески доступными, 42 соединения по-

давливали каталитическую активность КО в значительной степени. Поскольку эти соединения понижали ферментативную активность более чем на 50%, для них также были вычислены значения  $KI_{50}$ .

Впервые исследована гипоурикемическая активность соединений **26**, **42** и **158** на модельных крысах, обработанных оксоном калия. Кроме того, изучена ингибиторная активность указанных выше соединений в отношении КО, выделенной из печени крыс. Выявлено, что соединения **42** и **158** понижали уровень мочевой кислоты в сыворотке крови крыс, и наряду с этим подавляли активность печеночной КО, в то время как соединение **26** проявляло относительно слабую активность в обоих случаях.

Впервые произведены квантово-химические вычисления исследованных соединений и установлена взаимосвязь между структурой ингибитора и его ингибиторной активностью. Подобраны наиболее коррелирующие молекулярные дескрипторы, хорошо описывающие данную взаимосвязь.

Помимо этого, был произведен молекулярный докинг для исследованных соединений и определены энергии связывания этих ингибиторов с ферментом. Также были установлены участки связывания указанных соединений на молекуле фермента.

**Практическая значимость работы.** На основе полученных результатов возможна разработка и изготовление новых лекарственных препаратов для лечения патологий, связанных с высоким содержанием мочевой кислоты в сыворотке крови и окислительным стрессом, отличающихся от известных на сегодняшний день препаратов более высокой эффективностью действия. Результаты диссертации внесут определенный вклад в понимание механизмов ингибирования КО, а также могут способствовать получению и оптимизации новых химических соединений с улучшенными ингибиторными свойствами. Кроме того, полученные данные позволяют расширить и углубить фундаментальные представления о новых синтетических и природных ингибиторах КО.

**Апробация работы.** Основные положения диссертации доложены на: III научно-практической конференции «Молодежь и наука: реальность и будущее» (Невинномысск-2010); XV Республиканской Научной Конференции Аспирантов и Молодых Исследователей (Баку-2011); Научно-практической конференции «Наука сегодня: теоретические аспекты и практика применения» (Тамбов-

2011); XVI Республиканской Научной Конференции Аспирантов и Молодых Исследователей (Баку-2012); II Международной Научной Конференции Молодых Ученых и Исследователей «Инновационные Проблемы Современной Биологии» (Баку-2012); Научной Конференции Молодых Ученых «Новые призывы: практические и прикладные основы научно-инновативных исследовательских работ в современных условиях» (Баку-2012); Международной Научной Конференции «Осенние научные чтения-2012» (Киев-2012); III Международной Научной Конференции Молодых Ученых и Исследователей «Инновационные Проблемы Современной Биологии» (Баку-2013); 4-ом Международном Симпозиуме по Молекулярной Медицине и Разработки Лекарств (Карачи-2013); 1-ом Международном Бакинском Форуме (Баку-2013); I Международной Научной Конференции Молодых Исследователей (Баку-2013); I Международной Конференции по Химии и Химической Инженерии (Баку-2013).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 20 работ.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложения. Работа изложена на 187 страницах компьютерного текста и содержит 23 таблицу и 63 рисунков. Список литературы включает 174 публикаций.

## I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературных данных составляет первую главу диссертации. В ней изложены накопленные к настоящему времени в литературе результаты исследований, имеющие отношение к теме диссертации, а также проблемы и вопросы, вытекающие из них.

## II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом исследования служил фермент ксантиноксидаза, который был приобретен из компании Sigma Aldrich. Фермент хранили при температуре 2-8<sup>0</sup>С, а остальные реактивы при комнатной температуре. Субстрат (ксантин) вначале растворяли в небольшом объеме щелочи, а затем в фосфатном буфере.

Ингибирующее действие испытуемых веществ на каталитическую активность фермента КО определяли согласно методу Ли и его сотр. с определенными модификациями, по вычислению скорости гидроксирования ксантина с образованием мочевой кислоты, которая является неокрашенным конечным продуктом реакции и поглощается при длине волны 295 нм [Lee, 1998]. Для определения коэффициента 50%-го ингибирования ( $KI_{50}$ ) активных веществ использовали различные концентрации исследуемого вещества в диапазоне 100-1000 мкМ.  $KI_{50}$  вычислялся с помощью программы EZ-Fit (Perrella Scientific Inc., США). С целью определения типа ингибирования использовали четыре разные концентрации ингибитора и субстрата. С помощью программы Autodock Vina исследовали структуру активного центра КО, изучили возможность связывания ингибиторов с КО, оценили комплементарность (структурную и химическую) исследованного фермента и лигандов, нашли энергию связывания ингибиторов в комплексе с КО [Trott O., 2010]. Для выяснения связи между молекулярными дескрипторами и биологической активностью исследованных ингибиторов были использованы два метода: анализ главных компонентов и метод кластерного анализа с помощью программы XLSTAT. Вначале структуры были построены и затем оптимизированы на программе HyperChem. Оптимизирование проводили вначале с помощью метода молекулярной механики AMBER по алгоритму Поляк-Рибьер, а затем с помощью полуэмперического метода AM1 и при этом также использовали алгоритм Поляк-Рибьер.

Гипоурикемическую активность соединений определяли согласно методу Zhao и его сотрудников с небольшими изменениями [Zhao et al., 2008]. Для получения гиперурикемических крыс использовали ингибитор фермента уриказы оксонат калия, который растворяли в 0,9% физиологическом растворе и вводили внутривенно [Stavric et al., 1995]. Уровень мочевой кислоты в сыворотке крови определяли методом фосфорновольфрамовой кислоты [Carroll et al., 1971]. Белок в супернатанте, полученном из печени гиперурикемических крыс, определяли по Бредфорду [Bradford M.M., 1976].

### III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Первичный скрининг химических соединений на ингибиторную активность в отношении КО и определение их $KI_{50}$

С целью поиска химических соединений, способных существенно подавлять ферментативную активность КО, было исследовано 362 химических соединения. Среди исследованных соединений синтетических было 281, природных - 41, коммерчески приобретенных - 40. К соединениям, полученным с помощью химического синтеза, относятся производные индола, хромана, дегидроукусной кислоты, бензимидазола и 5-арилиден *N,N'*-диметилбарбитуровой кислоты. Исследованные природные соединения представлены терпеноидами, флавоноидами, танинами, стеролами, кумаринами, а также их производными. Коммерчески доступные соединения были отобраны целенаправленно. Они содержат либо ароматическое кольцо, либо атомы азота, кислорода, серы и галогенов, так как именно химические соединения, имеющие такую структуру проявляют ингибиторное действие на активность КО.

Порядковый номер, процент ингибирования и  $KI_{50}$  исследованных производных хромана представлены в таблице 3.1. Хотя и большинство исследованных соединений из этой серии умеренно понижало образование мочевой кислоты, лишь четыре из них, а именно, соединения **25**, **26**, **27** и **34** подавляли каталитическую активность КО более, чем в два раза.

Таблица 3.1

Порядковый номер, процент ингибирования и  $KI_{50}$  синтетических производных хромана, изученных в работе

№	Ингибирование, в %	$KI_{50}$ , мкМ	№	Ингибирование, в %	$KI_{50}$ , мкМ
<b>25</b>	88.1	$15 \pm 0.41$	<b>31</b>	14.5	
<b>26</b>	93.8	$11 \pm 0.38$	<b>32</b>	23.9	
<b>27</b>	76.7	$47 \pm 0.95$	<b>33</b>	30.6	
<b>28</b>	20.4		<b>34</b>	70.5	$23 \pm 0.67$
<b>29</b>	25.3		<b>35</b>	45.0	
<b>30</b>	17.3		<b>36</b>	31.2	



В следующей серии экспериментов, нами были определены значения  $KI_{50}$  для этих четырех соединений, проявивших ингибиторную активность. Как видно из таблицы 3.1, значения  $KI_{50}$  для этих соединений составили  $15 \pm 0.41$  мкМ,  $11 \pm 0.38$  мкМ,  $47 \pm 0.95$  мкМ и  $23 \pm 0.67$  мкМ, соответственно.

В заключении можно сказать, что протестированных 362 соединений, только 45 характеризовались относительно значительным ингибиторным эффектом на каталитическую активность фермента КО, что составляет 12.4% от общего числа исследованных соединений. Среди соединений, проявляющих ингибиторную активность лишь 6 являются природными, а остальные химически синтезированными соединениями. Поскольку, относительно ингибиторной активности трех природных соединений в отношении КО, а именно соединений **142**, **151** и **152**, имеются данные в литературе, то мы в дальнейших исследованиях их не изучали.

### **3.2. Определение типа ингибирования ферментативной активности КО исследуемыми соединениями**

В целях определения механизма ингибирования КО, исследуемых в данной работе, соединений использовали несколько методов. Во-первых, изучали влияние различных концентраций ингибитора на значения максимальной скорости ( $V_{max}$ ) и константы Михаэлиса ( $K_m$ ) фермента. Для этого были построены кривые Лайнуивера-Берка. Во-вторых, с целью определения типа ингибирования были построены графики Диксона. Их использовали также для вычисления значений ингибиторной константы ( $K_i$ ). Данный кинетический параметр определяли еще двумя способами: во-первых, по оси ординат выстраивали значения  $1/V_{max}$  кажущейся, полученные для каждой концентрации ингибитора против концентраций ингибиторов, а второй способ заключался в построении наклон каждой линии, полученной в системе Лайнуивера-Берка напротив концентраций ингибиторов.

Вначале определяли значение максимальной скорости и константы Михаэлиса фермента в отношении субстрата, который выступает в роли субстрата, в отсутствие ингибитора. Известно, что  $V_{max}$  показывает поведение фермента при максимальной концентрации субстрата, а  $K_m$  численно равна концентрации субстрата (моль/л), при которой скорость данной ферментативной реакции

составляет половину от максимальной. С этой целью был построен график Лайнуивера-Берка. Известно, что пересечение трендовой линии с осью ординат равно обратному значению максимальной скорости ( $1/V_{\max}$ ), а с осью абсцисс равно отрицательному обратному значению константы Михаэлиса ( $-1/K_m$ ). Установлено, что значение  $V_{\max}$  соответствовало 0.1 мкМ/мин, а  $K_m$  равнялось приблизительно 8.33 мкМ.

Особый интерес также представляет отношение  $V_{\max}/K_m$ . Оно характеризует фермент при низких концентрациях субстрата. Определено, что в наших экспериментах в системе Лайнуивера-Берка этот кинетический параметр равен  $0.012 \text{ мин}^{-1}$ , в то время как по методу Эди-Хофсти отношение  $V_{\max}/K_m$  было равно  $0,0119 \text{ мин}^{-1}$ .

Как известно, при конкурентном ингибировании субстрат и ингибитор связываются с одним и тем же участком - активным центром фермента. Конкурентный ингибитор обычно по структуре похож на субстрат и в присутствии такого ингибитора снижается сродство фермента к субстрату. Величина  $V_{\max}$  не изменяется, так как при увеличении концентрации субстрат вытесняет ингибитор из комплекса с ферментом. При этом величина константы Михаэлиса увеличивается. Конкурентным ингибитором КО является аллопуринол, который метаболизируется в оксипуринол, также являющимся ингибитором КО.

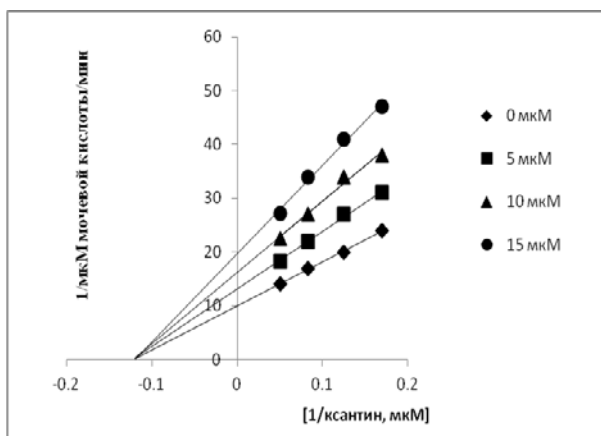
Следует отметить, что при неконкурентном ингибировании ингибитор и субстрат связываются с разными участками фермента, поэтому ингибитор может связываться со свободным ферментом и фермент-субстратным комплексом. При этом значения  $K_m$  не изменяется, а величина  $V_{\max}$  снижается.

При бесконкурентном ингибировании специфический ингибитор может связываться только с фермент-субстратным комплексом и при этом величина константы Михаэлиса и максимальной скорости уменьшаются в равной степени.

Встречается также смешанный тип ингибирования, например, когда ингибитор связывается не со свободным ферментом, а с фермент-субстратным комплексом, как в случае бесконкурентного ингибирования, при котором изменяются оба кинетических параметра.

Установлено, что все исследованные бромпроизводные хромана (соединения **25**, **26**, **27** и **34**) подавляли активность КО по типу неконкурентного ингибирования, то есть они связывались и с фермент-субстратным комплексом и со свободным ферментом.

Это подтверждают кинетические параметры исследованных ингибиторов. В присутствии вышеперечисленных четырех ингибиторов значение кажущейся  $K_m$  было равно 8.33 мкМ, то есть не изменялось. Значение  $K_i$  определяли по методу Диксона, в котором по оси абсцисс размещали значения концентраций ингибитора, а по оси ординат обратные значения начальных скоростей. Точка пересечения кривых с осью абсцисс соответствовала константе ингибирования. Мы разберем тип ингибирования соединений из этой серии на примере соединения **26**. На рис. 3.1 представлены данные, позволяющие графически определить тип ингибирования активности КО в условиях *in vitro* соединением **26**.



**Рис. 3.1.** Графическое определение типа ингибирования активности КО соединением **26** методом обратных величин Лайнуивера-Берка.

Таким образом, проведенные нами исследования позволили выявить механизм ингибирования активности КО исследованными соединениями. Оказалось, что из 42 протестированных ингибиторов 6 являются конкурентными, 25 неконкурентными, 8 бесконкурентными и 3 смешанными ингибиторами КО.

### 3.3. Молекулярное моделирование взаимодействия фермент-ингибитор

Для предотвращения и излечения заболеваний следует ингибировать деятельность белков, с функционированием которых связано их развитие. С этой целью используются обычно низкомолекулярные химические соединения, которые селективно связываются с этими белками в организме и тем самым препятствуют возникновению заболеваний. Поиск и разработка ингибиторов, являющихся соединениями, которые составляют основу лекарственных препаратов, представляют собой первую стадию в процессе производства нового лекарства.

В последнее время с целью значительного сокращения затрат времени и средств на стадии поиска эффективных ингибиторов широко пользуются методом молекулярного докинга. Этот и другие методы молекулярного моделирования дают возможность предсказать новые молекулы, которые будут наиболее прочно и селективно связываться с белком-мишенью, а это, в свою очередь, позволяет получить лучшие прототипов в ингибиторы и, тем самым, а также улучшить свойства известных ингибиторов.

Молекулярный докинг — это метод молекулярного моделирования, который используется для прогнозирования наиболее эффективного положения одной молекулы по отношению к другой для образования устойчивого комплекса белок-ингибитор. Для проведения молекулярного докинга пользуются различными программами, такими как, Gold, Surflex, FlexX, Dock, Fred, HADDOCK, Glide, Autodock Vina, PLANTS, Lead Finder и др.

Для осуществления молекулярного докинга мы пользовались программой Autodock Vina. В настоящее время данная программа является наиболее скоростной и позволяет быстро докирывать рецептор с лигандой и предоставляет как минимум 9 оптимальных положений с минимальной энергией связывания. Трёхмерные структуры изученных соединений строились и оптимизировались программой Hyperchem.

Результаты молекулярного докинга 4 ингибиторов (соединения **25**, **26**, **27** и **34**), являющихся бромпроизводными хромана, с молекулой КО показали, что энергии связывания для них составляет -8,7, -9,2, -7,8 и -7,9 ккал/моль, соответственно. Также было

установлено, что все эти соединения связываются с аминокислотами В цепи фермента.

### **3.4. Взаимосвязь между химической структурой исследуемых соединений и их ингибиторной активностью**

Изучение количественной связи между химической структурой и ингибиторной активностью соединения, в частности в отношении КО, представляет особый интерес по некоторым причинам. Во-первых, исследования такого рода, помогают выяснить какие именно атомы или группы атомов принимают непосредственное участие в процессе ингибирования. Это, в свою очередь, дает возможность заранее оценивать ингибиторные свойства новых химических соединений, еще не изученных экспериментальным путем. Во вторых, выяснение данной связи позволит в будущем оптимизировать структуру ингибиторов, изменяя те или иные функциональные группы, играющие важную роль при ингибировании КО.

Для выяснения связи между химической структурой и ингибиторной активностью исследуемого соединения применялся двойной подход. Во-первых, структуры соединений визуально сравнивались с экспериментально полученными результатами ингибиторной активности. Во-вторых, были произведены вычисления некоторых молекулярных дескрипторов испытуемых соединений, а именно квантово-химические и физико-химические, такие как, орбитальная энергия последней занятой молекулярной орбитали ( $E_{\text{HOMO}}$ ), орбитальная энергия первой вакантной орбитали ( $E_{\text{LUMO}}$ ), энергетический пробел (Energy gap), жесткость ( $\eta$ ), мягкость ( $S$ ), электроотрицательность ( $\chi$ ), химический потенциал ( $\mu$ ), индекс электрофильности ( $\omega$ ), дипольный момент и молекулярная поляризуемость. В свою очередь, эти дескрипторы можно разделить на три группы: электронные, стерические и гидрофобные. Результаты метода главных компонент производных хромана представлены на рис. 3.2.

Обнаружено, что для производных хромана наблюдалась сильная корреляция для многих квантово-химических дескрипторов, таких как, липофильность, поверхность, объем и поляризуемость исследованных соединений. Соединения с более высокими

значениями указанных дескрипторов характеризовались относительно большей ингибиторной активностью. Исключение составляло активное соединение **34**, для которого эти значения были низкими. В то время как для  $E_{\text{НОМО}}$ ,  $E_{\text{ЛУМО}}$  и дипольного момента наблюдалась очень слабая связь.

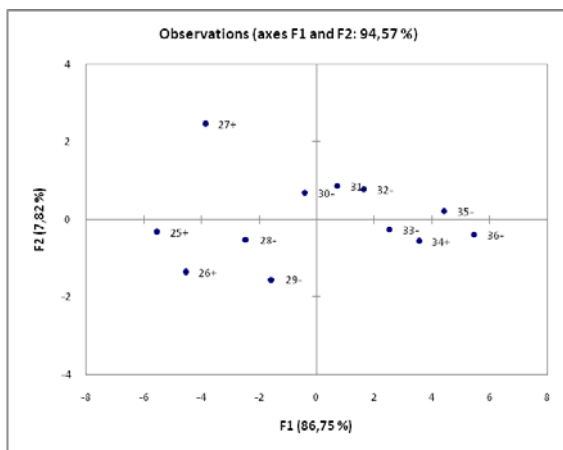


Рис. 3.2. Результаты метода главных компонент производных хромана.

### 3.5 Влияние исследуемых соединений на уровень мочевой кислоты в сыворотке крови и активность печеночной КО у крыс

В результате ксантиноксидазной реакции, наряду с супероксид анион радикалом, образуется мочевая кислота, которая, с одной стороны, может предохранять ДНК от свободно-радикального окисления [Singh S., 1998], в то время как с другой стороны, избыточное ее образование может привести к развитию гиперурикемии. Повышение содержания мочевой кислоты приводит к развитию тяжелых заболеваний: артритам, почечной недостаточности, обостряет течение мочекаменной болезни, артериальной гипертонии и кожных заболеваний.

В проведенных нами исследованиях гипоурикемическую активность тестируемых соединений определяли на крысах, обработанных оксонатом калия (ОК). Дело в том, что для грызунов характерно наличие фермента уриказы, функция которого сводится к

понижению количества мочевой кислоты вследствие превращения ее в аллантаин. ОК же выступает в роли специфического конкурентного ингибитора этого фермента, чем и объясняется повышение уровня мочевой кислоты в сыворотке крови крыс после его введения. Таким образом, нам удалось получить модель гиперурикемических крыс, используемую нами в целях определения способности тестируемых соединений понижать уровень мочевой кислоты.

Для этих исследований были отобраны наиболее потенциальные ингибиторы: 5-бром-2-(2, 4-диэтил-6- метил-3-пропилфенил)-6, 7, 8-триметилхроман-4-он (**26**), (*Z*)-4-гидрокси-6-метил-3-(1-(2-(4-нитрофенил) гидразон) этил)-2Н-пиран-2-он (**42**) и 24-метиленланост-8-ен-3 $\beta$ -ол (**158**),  $KI_{50}$  для которых составил  $11 \pm 0.38$  мкМ,  $6.76 \pm 0.3$  мкМ и  $16.96 \pm 0.69$  мкМ, соответственно.

В таблице 3.2, представлены результаты гипоурикемического действия исследованных ингибиторов на гиперурикемических крыс.

**Таблица 3.2**

**Уровень мочевой кислоты в сыворотке крови крыс**

№ группы	Уровень мочевой кислоты, мг/дЛ		
	1-ый день	3-ий день	7-ой день
A	$1.63 \pm 0.05$	$1.60 \pm 0.05$	$1.65 \pm 0.06$
B	$3.03 \pm 0.15$	$3.19 \pm 0.15$	$3.37 \pm 0.18$
C1	$3.02 \pm 0.12$	$3.01 \pm 0.13$	$2.99 \pm 0.09$
C2	$2.98 \pm 0.08$	$2.97 \pm 0.07$	$2.96 \pm 0.11$
C3	$2.96 \pm 0.15$	$2.94 \pm 0.13$	$2.93 \pm 0.10$
D1	$2.95 \pm 0.14$	$2.91 \pm 0.16$	$2.86 \pm 0.11$
D2	$2.84 \pm 0.10$	$2.66 \pm 0.08$	$2.57 \pm 0.12$
D3	$2.71 \pm 0.12$	$2.55 \pm 0.10$	$2.42 \pm 0.10$
E1	$2.66 \pm 0.15$	$2.42 \pm 0.14$	$2.35 \pm 0.08$
E2	$2.63 \pm 0.15$	$2.29 \pm 0.12$	$2.19 \pm 0.11$
E3	$2.42 \pm 0.12$	$2.04 \pm 0.07$	$1.99 \pm 0.08$
F	$1.69 \pm 0.11$	$1.66 \pm 0.08$	$1.59 \pm 0.05$

Полученные нами результаты позволяют заключить, что гипоурикемический эффект исследуемых соединений зависит от продолжительности их приема и концентрации. Кроме этого, соединение **158**, являющееся, в отличие от двух других, природным ингибитором КО, характеризуется наиболее сильно выраженной способностью понижать уровень сывороточного урата.

Для того, чтобы выяснить механизм гипоурикемического действия исследуемых соединений, была проверена их способность подавлять каталитическую активность КО в условиях *in vivo*.

Таким образом, соединения **42** и **158** характеризовались более сильно выраженным гипоурикемический эффект, что может быть объяснено способностью ингибировать каталитическую активность КО. Соединение **26** незначительно понижало уровень мочевой кислоты в сыворотке крови у гиперурикемических крыс, а также слабо подавляло активность КО в печени крыс.

В заключение, соединения **42** и **158** могут быть предложены для следующих стадий доклинических и клинических исследований, чтобы выявить токсичность, побочные эффекты и эффективность их действия на людях, страдающих гиперурикемией.

## ВЫВОДЫ

1. Произведен первичный скрининг 362 соединений на способность подавлять каталитическую активность КО. Из этих соединений 281 были синтетическими, 41 природными и 40 коммерчески доступными соединениями. А также была определена ингибиторная активность экстрактов 3 растений: *Ficus mucoso*, *Klainedoxa gabonensis* и *Chythrantus claneianus*. Для химических соединений, которые понижали каталитическую активность КО более чем на 50%, были вычислены  $KI_{50}$  (для 42 соединений). Выявлено, что значения данного показателя для исследованных нами ингибиторов находились в диапазоне приблизительно 6.76 - 525 мкМ.
2. Для активных соединений были вычислены кинетические параметры, на основании чего был определен механизм ингибиторного действия. Установлено, что среди 42 активных соединений было 25 неконкурентных, 6 конкурентных, 8 бесконкурентных и 3 смешанных ингибиторов данного фермента.
3. Осуществлен молекулярный докинг исследуемых соединений с молекулой КО с помощью программы Autodock Vina. Были вы-



числены энергии связывания лигандов с рецептором. Анализ исследований по молекулярному докингу изученных соединений с молекулой КО позволяет заключить, что изученные ингибиторы, в основном, присоединялись к трем участкам фермента: в активный центр, в гидрофобный кармашек и небольшую бороздку. Установлено, что значения энергии связывания различных ингибиторов с данным ферментом колеблются в диапазоне -6,4 и -10,3 ккал/моль.

4. Произведены квантово-химические вычисления исследуемых соединений с помощью программы Hyperchem. Установлена количественная связь между структурой и активностью ингибиторов.

5. Изучен гипоурикемический эффект 3 очень активных соединений на гиперурикемических крысах. Было выявлено, что соединения **26**, **42** и **158** заметно понижают уровень мочевой кислоты в сыворотке крови у гиперурикемических крыс до 2.93, 2.42 и 1.99 мг/дл, соответственно.

6. Эксперименты, направленные на выявление ингибирования печеночной КО у модельных крыс соединениями **26**, **42** и **158** показали, что данные соединения подавляют каталитическую активность КО на 12.6%, 27.5% и 40.5%, соответственно.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Годжаев А.С., Кулиев А.А. Метод определения ингибирующего действия веществ на активность ксантиноксидазы *in vitro*. Материалы III научно-практической конференции «Молодежь и наука: реальность и будущее». Невинномысск: НИЭУП, Россия, 2010, том 5, с.47-48
2. Bankeu J.J.K., Mustafa S.A.A., Gojayev A.S., Lenta B.D., Nougoué D.T., Ngouela S.A., Asaad K., Choudhary M.I., Prigge S., Guliyev A.A., Nkengfack A.E., Tsamo E., Ali M.Sh. Ceramide and cerebroside from the stem bark of *Ficus mucoso* Welw. (Moraceae). *Chem. Pharm. Bull.*, Vol. **58** (12), 2010, pp.1661-1665
3. Gojayev A.S., Bankeu J.J.K., Guliyev A.A., Tsamo E., Choudhary M.I. Xanthine oxidase inhibitory activity of natural compounds from *Ficus mucoso* Welw. (Moraceae). *Baku Univ News J.*, Vol. 3, 2011, pp. 40-44.

4. Gojajev A.S., Tagi-zade Z.A. Guliyev A.A. The study of novel xanthine oxidase inhibitors. Материалы III научно-практической конференции «Наука сегодня: теоретические аспекты и практика применения». Тамбов, 2011, том 5, с. 8
5. Годжаев А.С. Новые синтетические флавоноиды в качестве ингибиторов ксантиноксидазы. Doktorantların əv gənc tədqiqatçıların XVI Respublika Elmi Konfransının materialları, 2012, səh. 63-64
6. Годжаев А.С., Кулиев А.А., Тагизаде З.А. Новые синтетические ингибиторы ксантиноксидазы. Труды Института Микробиологии Национальной Академии Наук Азербайджана, 2012, том 10, № 1, стр. 274-280
7. Набиев Н.С., Годжаев А.С., Кулиев А.А., Тагизаде З.А. Квантово-механический расчет и сравнительный анализ структурно-функциональной активности потенциальных ингибиторов ксантиноксидазы (КФ 1.1.3.22). Journal of Qafqaz University, № 34, 2012, с. 70-79
8. Годжаев А.С., Тагизаде З.А., Кулиев А.А. Ингибирование ксантиноксидазы производными индола. Труды Института Микробиологии Национальной Академии Наук Азербайджана, 2012, том 10, № 2, стр. 196-201
9. Годжаев А.С. Ингибиторная активность производных индола по отношению к ксантиноксидазе (КФ 1.1.3.22). “Yeni çağırışlar: müasir ərəitdə elmi innovativ tədqiqat işlərinin təcrübə və tətbiqi əsasları” adlı Gənc alimlərin elmi konfransının materialları, Bakı, 2012, II cild, səh. 39-41
10. Годжаев А.С., Гусейнова С.А., Джафаров Г.Р. Ингибиторная активность экстракта *Ficus tucuso* welw. (Moraceae) по отношению к ксантиноксидазе. ~~Öz~~ <sup>Öz</sup>kəmləli alim, əməkdar elm xadimi, prof. M.A.Axundovun 110-cu ildönümü münasibəti ilə Gənc Alimlərin və tədqiqatçıların “Müasir Biologiyanın İnnovasiya Problemləri” mövzusunda Beynəlxalq Elmi Konfransının materialları, Bakı, 2012, səh.46-48
11. Годжаев А.С. Влияние производных барбитуровой кислоты на активность ксантиноксидазы. Материалы Международной Научной конференции «Осенние научные чтения-2012», Киев, 2012, ч. 2, с. 110-111

12. Gojayeve A.S., Nkanwen E.R.S., Guliyev A.A., Wabo H.K., Tane P., Choudhary M.I. Xanthine oxidase inhibitory activity from the stem bark of *Klainedoxa gabonensis* (Irvingiaceae). 4th International Symposium-Cum-Training Course on Molecular Medicine and Drug Research, Karachi, January 7-10, 2013, Karachi, Pakistan, p. 65
13. Gojayeve A.S. Xanthine oxidase inhibitory activity of some commercially available compounds. Abstracts collection on new challenges in the European area: International Baku Forum of Young Scientists, dedicated to the 90-th anniversary of national leader Heydar Aliyev, Baku, 2013, p. 234
14. Vurdu C.D., Kandemirli F., Başaran M.A., Momin Khan, Gojayeve A.S., Nbiyev N., Khalid M. Khan. Quantum chemical calculations of 5-aryledene *N,N'*-dimethylbarbituric acid derivatives which are xanthine oxidase inhibitors. Azərbaycan xalqının Ümummilli Lideri Heydər Əliyevin anadan olmasının 90-ci ildönümünə həsr olunmuş I beynəlxalq kimya və kimya mühəndisliyi konfransı, 2013, s. 130
15. Gojayeve A.S., Rabnawaz M., Khan B., Wadood A., Qasmi Z., Shah M.R. Xanthine oxidase inhibitory activity of Schiff's bases of dehydroacetic acid. Azərbaycan xalqının Ümumi Lideri Heydər Əliyevin anadan olmasının 90 illiyinə həsr edilmiş Gənc tədqiqatçıların I beynəlxalq elmi konfransı, Bakı, 2013, s. 388
16. Годжаев А.С. Молекулярный докинг некоторых новых ингибиторов ксантиноксидазы. Görkəmli oftalmoloq alim, akademik Zərifə Əliyevanın 90 illik yubileyinə həsr olunmuş Gənc Alimlərin və Tədqiqatçıların "Müasir Biologiyanın İnnovasiya Problemləri" mövzusunda III Beynəlxalq Elmi Konfransın Materialları, Bakı, 2013, s. 72
17. Gojayeve A.S., Bankeu J.J.K., Awantu A.F., Nkanwen E.R.S., Ali M.S., Lenta B.N., Guliyev A.A., Nougoué D.T., Ngouela S.A., Tsamo E. Xanthine oxidase inhibitory activity of compounds from *Chytrantus claneianus*. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, Vol. 8 (1), 2013, pp.78-83.
18. Nkanwen E.R.S., Gojayeve A.S., Wabo H.K., Bankeu J.J.K., Choudhary M.I., Guliyev A.A., Tane P. Lanostane-type triterpenoid and steroid from the stem bark of *Klainedoxa gabonensis*. *Fitoterapia*, Vol. 86, 2013, pp. 108-114.

19. Khan K.M., Khan M., Karim A., Taha M., Ambreen N., Gojayeve A., Perveen Sh., Ali M. Sh., Choudhary M.I. Xanthine oxidase inhibition of 5-aryledene *N,N'*-dimethylbarbituric acid derivatives. *J. Chem. Soc. Pak.*, Vol. 35, No. 2, 2013, pp. 495-498
20. Годжаев А.С. Коммерчески доступные соединения в качестве ингибиторов ксантиноксидазы. *Doktorantların əv gənc tədqiqatçıların XVII Respublika Elmi Konfrasının materialları*, 2013, s. 53

## **KSANTİNOKSİDAZA FERMENTİNİN YENİ İNGİBİTORLARININ TƏDQIQI**

### **XÜLASƏ**

Təqdim olunan dissertasiya işi ksantinoksidaza fermentinin (FT 1.1.3.22) yeni ingibitorlarının öyrənilməsinə həsr olunub. İlk dəfə olaraq 362 kimyəvi birləşmənin ksantinoksidazanın (KO) katalitik fəallığına ingibirləşdirici təsiri öyrənilib. Onlardan 281 sintetik, 41 təbii və 40 isə satışda mövcud olan birləşmələrdir. Həmçinin *Ficus mucoso*, *Klainedoxa gabonensis* və *Chythrantus claneianus* bitki ekstraktlarının ingibirləşdirici fəallığı tədqiq olunub. KO fermentinin fəallığını iki dəfədən artıq zəiflədən birləşmələr üçün isə, 50% ingibirləşdirici qatılıqları hesablanıb. Müəyyən edilib ki, 362 kimyəvi birləşmədən 42-si KO fəallığını gözə çarpan dərəcədə azaldır və onların  $IQ_{50}$  qiyməti təqribən 6.76 - 525 mkM həddlərində dəyişir.

KO fermentinin tədqiq edilən birləşmələrlə ingibirləşməsinin mexanizmi aydınlaşdırılıb. Müəyyən edilib ki, 42 tədqiq olunmuş birləşmədən 6 rəqabətli, 25 qeyri-rəqabətli, 8 rəqabətsiz və 3 qarışıq üsulla KO fermentinin katalitik fəallığını ingibirləşdirir.

Autodock Vina proqramı əsasitilə tədqiq olunmuş birləşmələrin KO molekulu ilə molekulyar dokinqi həyata keçirilib. Liqandların reseptorla birləşmə enerjisi hesablanıb. İndol, xroman, benzimidazol, dehidrosirkə turşusu və 5-ariliden *N,N'*-dimetilbarbitur turşusunun sintetik təmsülələrinin, həmçinin təbii və satışda mövcud olan birləşmələrin KO molekulu ilə molekulyar dokinqinin analizi belə bir məticəyə gəlmək imkanını verir ki, tədqiq olunmuş ingibitorlar əsasən ferment molekulunun 3 sahəsinə birləşirlər: fəal mərkəzə, hidrofob cibciyə və kiçik çərtiyə. Müəyyən olunub ki, ingibitorların ferment ilə birləşmə enerjisi -6,4 və -10,3 kkal/mol diapozonunda dəyişir.

Tədqiq olunmuş birləşmələr üçün bəzi kvant-kimyəvi hesablamalar, məsələn, axırıncı tutulmuş molekulyar orbitalın orbital enerjisi ( $E_{HOMO}$ ), birinci vakant molekulyar orbitalın orbital enerjisi ( $E_{LOMO}$ ), enerji boşluğu (Energy gap), codluq ( $\eta$ ), yumşaqlıq (S),

elektromənfilik ( $\chi$ ), kimyəvi potensial ( $\mu$ ), elektrofillik indeksi ( $\omega$ ), dipol momenti və molekulyar polyarlaşma, HyperChem proqramı vasitəsi ilə həyata keçirilib. İngibitorların kimyəvi quruluşu ilə onların ingibirləşdirici fəallığı arasında əlaqə təyin olunmuşdur.

Bundan başqa **26**, **42** və **158** birləşmələrin hipourikemik təsiri öyrənilib. Müəyyən edilib ki, bu birləşmələr hiperurikemik siçovulların qan zərdabında sidik turşusunun qatılığını, müvafiq olaraq, 2.93, 2.42 və 1.99 mq/dl qədər aşağı salır. Təyin edilib ki **26**, **42** və **158** birləşmələr KO fermentinin fəallığını *in vivo* şəraitində, müvafiq olaraq, 12.6 %, 27.5 % və 40.5 % azaldır.

## THE STUDY OF NEW XANTHINE OXIDASE INHIBITORS

### SUMMARY

The presented thesis is devoted to the study of new inhibitors of xanthine oxidase (EC 1.1.3.22). The primary screening of 362 compounds was first performed for the ability to inhibit the catalytic activity of xanthine oxidase (XO). Of these compounds 281 are synthetic, 41 are natural and 40 are commercially available compounds. The inhibitory activity of three plant extracts, *Ficus mucoso*, *Klainedoxa gabonensis* and *Chythrantus claneianus*, was determined. For compounds that have lowered XO catalytic activity over 50 %, IC<sub>50</sub> (for compounds 42) was calculated. It was revealed that the value of this indicator for the investigated inhibitors was in the range of about 6.76 - 525 μM.

The values of kinetic parameters for XO inhibitors were calculated, and based on them their mechanism of inhibition was determined. It was found that out of 42 active compounds 25 are non-competitive, 6 are competitive, 8 are uncompetitive and 3 are mixed inhibitors of the enzyme investigated.

The binding energy of ligand to the receptor was calculated by using the Autodock Vina. The analysis of studies on the molecular docking synthetic derivatives of indole, chroman, dehydroacetic acid, benzimidazole, 5- arylidene-N, N'-dimethylbarbituric acid, as well as natural and commercially available compounds with XO molecule allows us to conclude that the studied inhibitors, mainly joined three sites of the enzyme: the active site, a hydrophobic pocket and a small groove. It is revealed that the values of binding energy of various inhibitors with the enzyme were in ranges -10.3 and -6.4 kcal/mol.

Some quantum-chemical calculations of the test compounds, such as E<sub>HOMO</sub>, E<sub>LOMO</sub>, energy gap, hardness (η), softness (S), electronegativity (χ), chemical potential (μ), electrophilic index (ω), dipole moment and polarizability performed by using Hyperchem. The quantitative relationship between chemical structure and inhibitory activity of the compounds studied was established.

In addition, the hypouricemic action of three active compounds was studied on hyperuricemic rats. It was revealed that compounds **26**, **42**, and **158** significantly lowered the level of uric acid in blood serum in hyperuricemic rats to 2.93, 2.42 and 1.99 mg/dL, respectively. Experiments aimed at identifying the inhibition of hepatic XO in rat model by compounds **26**, **42** and **158** have shown that these compounds inhibit XO catalytic activity 12.6 %, 27.5 % and 40.5 %, respectively.



**AZƏRBAYCAN MİLLİ ELMLƏR AKADEMİYASI  
BOTANİKA İNSTİTUTU**

*Əlyazması hüququnda*

**ANAR SAHİB oğlu QOCAYEV**

**KSANTİNOKSİDAZA FERMENTİNİN YENİ  
İNGİBİTORLARININ TƏDQIQI**

2406.02 – Biokimya

Biologiya üzrə fəlsəfə doktoru elmi dərəcəsi  
almaq üçün təqdim olunmuş dissertasiyanın

**A V T O R E F E R A T I**

BAKI – 2014