
<https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.06.074>

УДК 547:577.152.1

**О.Л. Кобзар¹, А.В. Татарчук^{1,2},
М.В. Качаєва¹, С.Г. Пільо¹, О.В. Суховєєв¹,
В.В. Суховєєв^{1,2}, В.С. Броварець¹, А.І. Вовк¹**

¹ Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАН України, Київ

² Ніжинський державний університет ім. Миколи Гоголя

E-mail: kobzar@bpci.kiev.ua

Азометинові похідні *n*-амінобензойної кислоти як антиоксиданти та інгібітори ксантинооксидази

Представлено членом-кореспондентом НАН України А.І. Вовком

*Встановлено антиоксидантні властивості гідроксильованих азометинових похідних *n*-амінобензойної кислоти та інгібувальний вплив цих сполук на активність ксантинооксидази. Аналіз інгібувальної активності серії синтезованих азометинових сполук щодо ксантинооксидази, а також результати молекулярного докінгу вказують на те, що в механізмах інгібування ферменту можуть бути задіяні карбоксильна і гідроксильна групи. Вплив азометинових похідних описується кінетикою змішаного типу з мікромолярними значеннями констант інгібування. Інгібувальна здатність найактивнішої сполуки, 4-(((1E)-(2-гідрокси-5-нітрофеніл)метиленаміно)бензойної кислоти, співмірна з впливом відомого інгібітора — алопуринолу. Молекулярний докінг азометинового інгібітора в активний центр ксантинооксидази свідчить про те, що карбоксилатна група утворює водневі зв'язки з амінокислотними залишками Arg880, Thr1010 і Glu1261, а гідроксильна група наближена до залишків Glu802 і Asn768. Крім того, арильні фрагменти молекули інгібітора формують контакти із Phe914, Phe1009, Leu648, Phe1013 та іншими залишками. Антиоксидантні властивості азометинів оцінено в модельній системі шляхом визначення малонового діальдегіду в тесті з тіобарбітуровою кислотою. Показано, що здатність деяких сполук нейтралізувати гідроксильні радикали перевищує дію тролоксу як еталонного антиоксиданту.*

Ключові слова: азометини, ксантинооксидаза, інгібування, молекулярний докінг, гідроксильні радикали, антиоксидантні властивості.

Ксантинооксидаза належить до ферментів пуринового катаболізму і каталізує окиснення гіпоксантину і ксантину до сечової кислоти. Надмірна активність ксантинооксидази спричиняє зростання рівня уратів у людському організмі і збільшення концентрації вільних радикалів, що ініціює розвиток низки захворювань, серед яких гіперурикемія, подагра, серцево-судинні хвороби. Тому пошук і вивчення інгібіторів ксантинооксидази є актуальним напрямком біоорганічних досліджень. На сьогодні значна кількість сполук, серед яких по-

Цитування: Кобзар О.Л., Татарчук А.В., Качаєва М.В., Пільо С.Г., Суховєєв О.В., Суховєєв В.В., Броварець В.С., Вовк А.І. Азометинові похідні *n*-амінобензойної кислоти як антиоксиданти та інгібітори ксантинооксидази. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2020. № 6. С. 74–82. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.06.074>

хідні флавоноїдів, гетероциклів і пептидів, описані як інгібітори цього ферменту. До таких інгібіторів також належать відомі лікарські засоби — алопуринол і фебуксостат. Однак показано, що застосування алопуринолу може спричинити синдром гіперчутливості до препарату [1], тоді як використання фебуксостату підвищує ризик розвитку серцево-судинних захворювань [2].

Азометини вивчаються як антибактеріальні, протигрибкові, противірусні, протипухлинні і протизапальні агенти [3]. Вони здатні інгібувати ферментативну активність холінестераз і деяких інших ферментів, а також виявляють антиоксидантні властивості [4]. Деякі азометинові похідні піразолопіримідину вивчалися як інгібітори ксантинооксидази [5].

Метою цього дослідження був пошук простих азометинових структур, здатних інгібувати активність ксантинооксидази і виявляти антиоксидантні властивості. Для їх конструювання використано азометиновий скафолд на основі поширених у живій природі *p*-амінобензойної кислоти і саліцилового альдегіду.

Основи Шиффа **3a–j** було синтезовано відомим методом [6], що ґрунтується на взаємодії еквімолярних кількостей *p*-амінобензойної кислоти і відповідного альдегіду в етанолі (схема).

Структури сполук **3a–j** доведено методами ¹H ЯМР-спектроскопії, хромато-мас-спектрометрії та даними елементного аналізу. ІЧ-спектри азометинів з карбоксильною групою мають широку смугу в області 2400–3100 см⁻¹ і валентні коливання імінної групи при 1677–1691 см⁻¹. У спектрах ¹H ЯМР наявні характеристичні сигнали імінної групи у вигляді широкого синглету при 8,55–9,65 м. ч., а також карбоксильної групи при 12,70–13,19 м. ч.

Антиоксидантну активність азометинів оцінювали в модельній системі за тестом на малоновий діальдегід (МДА-тест) [7]. Виявилося, що при концентрації 300 мкМ властивість сполук **3a**, **3c**, **3d**, **3h** та **3i** нейтралізувати гідроксильні радикали (≥70 %) перевищує таку здатність тролоксу (таблиця), що використовувався як референс-препарат. Сполуки **3e** і **3g** характеризувалися дещо нижчими значеннями проценту інгібування радикальних перетворень.

Інгібувальні властивості азометинів **3a–j** визначали *in vitro* з використанням ксантинооксидази з коров'ячого молока. Наведені в таблиці значення IC₅₀ є концентраціями сполук,

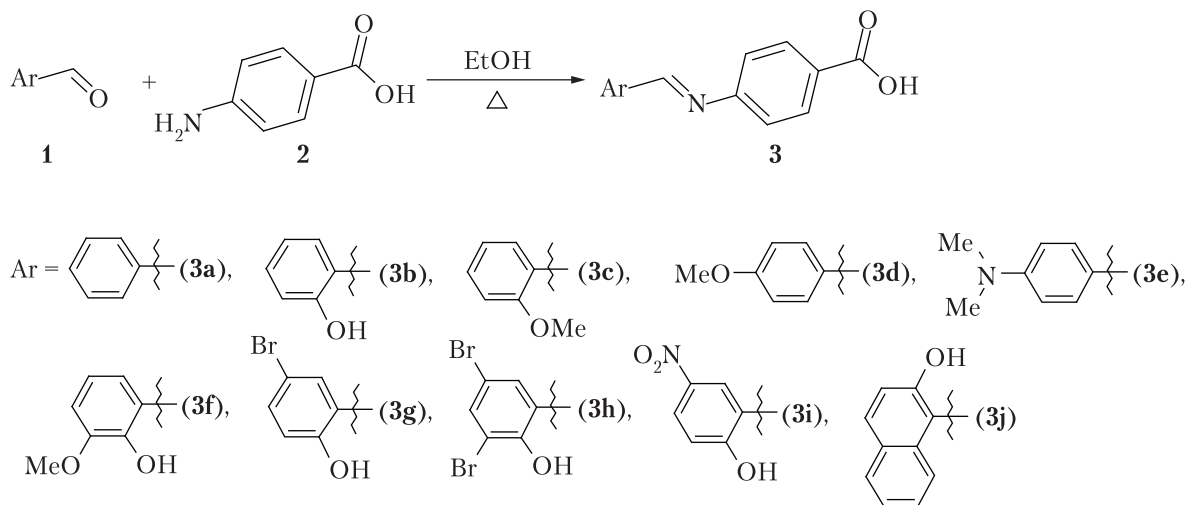


Схема синтезу азометинів **3a–j**

що забезпечують зниження ферментативної активності ксантинооксидази на 50 % при концентрації субстрату 50 мкМ.

Аналіз залежності активності від структури інгібіторів вказує на те, що наявність 2-гідроксифенільного фрагмента сприяє комплексоутворенню з ксантинооксидазою. Так, сполука **3b** інгібувала активність ферменту зі значенням IC_{50} 23 мкМ, тоді як азометинова похідна **3a** характеризувалася слабким впливом. Заміна гідроксильної групи в структурі азометину **3b** на метоксигрупу (сполука **3c**) зумовила зниження спорідненості сполуки до ксантинооксидази. Наявність метоксигрупи в *para*-положенні фенольного фрагмента (сполука **3d**) не покращувала інгібувальний ефект, проте азометинова похідна **3e** з диметилмінною групою у цьому положенні мала значення IC_{50} , що становило 30 мкМ.

Зважаючи на викладене вище, для подальшої модифікації було вибрано структуру **3b**. Азометинова похідна **3f** із додатково введеною метоксигрупою характеризувалася значенням IC_{50} 25 мкМ. За наявності атома бром у положенні 5 (сполука **3g**) та в положеннях 3 і 5 (сполука **3h**) інгібувальний ефект незначно збільшився. Кращих результатів вдалося досягти шляхом введення нітрогрупи в положення 5 (сполука **3i**) або заміни 2-гідроксифенільного фрагмента 2-гідроксинафтильною групою (сполука **3j**). Для цих азометинів значення IC_{50} становили 6,4 і 4,2 мкМ відповідно, що за умов дослідів були подібними до значення IC_{50} алопуринолу (3,5 мкМ).

Коефіцієнт Хілла, розрахований з дозозалежної кривої інгібування ксантинооксидази сполукою **3j**, становив $0,98 \pm 0,17$, що вказує на відсутність кооперативних ефектів у механізмі інгібування. Графік Лайнуївера—Берка (рис. 1) свідчить про змішаний тип інгібування, розраховані значення констант інгібування K_i та K_i' становили $0,74 \pm 0,10$ і $5,85 \pm 0,83$ мкМ відповідно.

Для з'ясування молекулярних механізмів формування фермент-інгібіторних комплексів було здійснено молекулярний докінг азометинових похідних в область активного центра ксантинооксидази (PDB код 1FIQ). Для докінгу використовували *E*-ізомери азометинів **3b** і **3f-j** у конформації, що забезпечувало можливість наближення 2-гідроксильної групи бензиліденового замісника до атома азоту C=N-фрагмента. Згідно з квантово-хімічними розрахунками, така конформація енергетично вигідна для сполуки **3j**, що, очевидно, обумовле-

Азометинові похідні *n*-амінобензойної кислоти як антиоксиданти та інгібітори ксантинооксидази

Сполука	Антиоксидантна активність, % *	IC_{50} , мкМ	Сполука	Антиоксидантна активність, % *	IC_{50} , мкМ
3a	74 ± 2	>120	3g	60 ± 3	18 ± 3
3b	Н. в. **	23 ± 6	3h	70 ± 1	11 ± 2
3c	75 ± 2	>120	3i	72 ± 1	$6,4 \pm 1,7$
3d	72 ± 1	105 ± 11	3j	Н. в.	$4,2 \pm 1,0$
3e	52 ± 7	30 ± 9	Тролокс	46 ± 4	—
3f	Н. в.	25 ± 5	Алопуринол	—	$3,5 \pm 0,2$

* Активність подано як процент інгібування радикальних перетворень (МДА-тест) при концентрації сполуки 0,3 мМ.

** Н. в. — активність не визначалась через погану розчинність сполуки за умов експерименту.

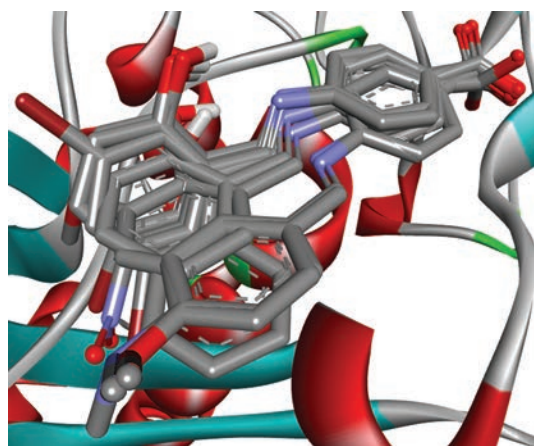
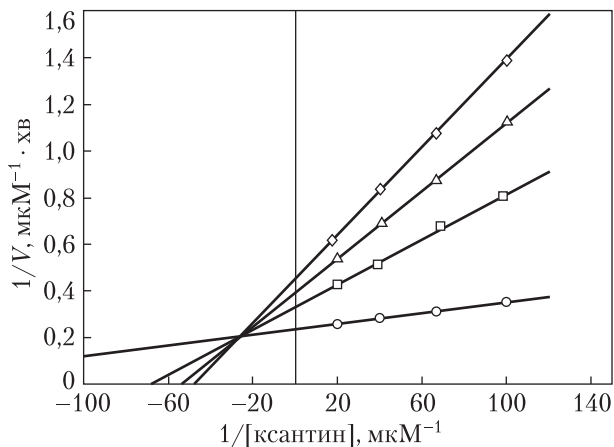
Рис. 1. Графік Лайнуівера–Берка, що описує інгібування активності ксантиноксидази сполукою **3j**. Концентрація інгібітора: 0 (○), 2 мкМ (□), 4 мкМ (△) та 6 мкМ (◇)

но внутрішньомолекулярними водневими взаємодіями.

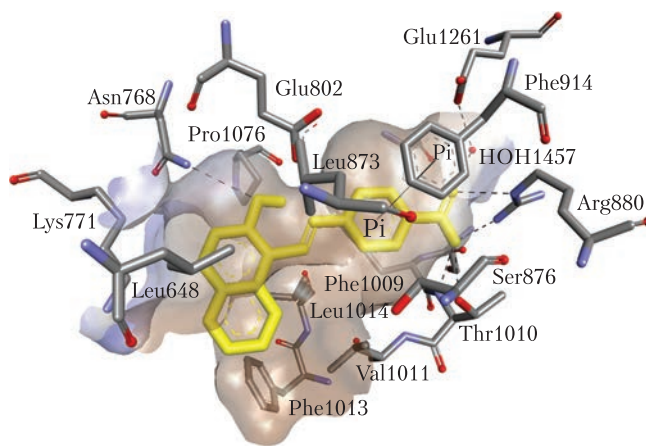
Отримані моделі зв'язування азометинів **3b**, **3d–j** в області активного центра ксантиноксидази характеризуються подібним розташуванням лігандів (рис. 2, *a*). Завдяки карбоксильній групі залишку *n*-амінобензойної кислоти сполука **3j** утворює водневі контакти з амінокислотними залишками Arg880, Thr1010 і Glu1261 (через молекулу води HOH1457), тоді як гідроксильна група гідроксинафталенового замісника формує водневий контакт з Asn768 і додатково може бути залучена до водневого зв'язку з Glu802, амінокислотним залишком, важливим для стабілізації фермент-субстратного комплексу. Крім того, залишок *n*-амінобензойної кислоти сполуки **3j** забезпечує ароматичні взаємодії з Phe914 і Phe1009, а нафтильний фрагмент має гідрофобні контакти з алкільними групами залишків Leu648, Leu648, Val1011 і Leu1014 та арильною групою Phe1013 (див. рис. 2, *b*).

Таким чином, азометинові похідні *n*-амінобензойної кислоти здатні виявляти антиоксидантні властивості та інгібувати ксантиноксидазу зі значенням IC_{50} у мікромольному діапазоні. Механізми дії сполук на активність ферменту описуються закономірностями змішаного типу. Аналіз залежності структура–активність вказує на те, що карбоксильна і гідроксильна групи в структурі азометинів мають істотне значення для закріплення інгібіторів у активному центрі ксантиноксидази.

Експериментальна частина. Спектри 1H ЯМР записані на приладах Varian Mercury або Varian Unityplus 400 у ДМСО- d_6 , внутрішній стандарт — залишкові протони розчинника.



a



b

Рис. 2. Суперпозиція азометинових структур **3b**, **3d–j** в області активного центра ксантиноксидази (*a*) і модель зв'язування сполуки **3j** в активному центрі ферменту (*b*)

ІЧ-спектри реєстрували на спектрометрі Vertex-70 у таблетках КВг. Хромато-мас-спектри отримані з використанням рідинної хромато-мас-спектрометричної системи на хроматографі Agilent 1100 Series. Температури топлення вимірювали на приладі Fisher-Johns.

Загальна методика синтезу сполук 3a–j. Суміш відповідного ароматичного альдегіду **1** (0,01 ммоль) і 4-амінобензойної кислоти **2** (0,01 ммоль) в етанолі (50 мл) кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 4–5 год. Після охолодження, фільтрування і промивання етанолом одержували сполуки **3**, які перекристалізовували з етанолу.

4-(((1E)-Фенілметиленаміно)бензойна кислота (**3a**). Вихід 1,69 г (75 %), $T_{\text{пл}}$ 183–185 °С (EtOH) ($T_{\text{пл}}$ 193,5 °С [8]). Спектр ІЧ, ν , cm^{-1} : 2875; 2547; 1681; 1594; 1425; 1289; 1173; 935; 849; 772; 754; 687; 552. Спектр ^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6), δ , м. ч. (J , Гц): 13,19 (1H, ш с, C(O)OH); 8,75 (1H, с, CH); 8,14 (2H, д, $J = 8,7$ Гц, Ar); 7,62–7,65 (3H, м, Ar); 7,44 (2H, д, $J = 8,7$ Гц, Ar). Мас-спектр, m/z : 226 [M + H]⁺. Знайдено, %: С 74,52; Н 4,90; N 6,34. $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_2$. Розраховано, %: С 74,65; Н 4,92; N 6,22.

4-(((1E)-(2-Гідроксифеніл)метиленаміно)бензойна кислота (**3b**). Вихід 1,89 г (78 %), $T_{\text{пл}}$ 230–232 °С (EtOH) ($T_{\text{пл}}$ 265–267 °С [9]). Спектр ІЧ, ν , cm^{-1} : 2812; 2551; 1679; 1597; 1567; 1429; 1320; 1286; 1177; 941; 848; 774; 749; 676; 549; 516. Спектр ^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6), δ , м. ч. (J , Гц): 13,35 (1H, ш с, OH); 13,01 (1H, ш с, C(O)OH); 9,13 (1H, с, CH); 8,17 (2H, д, $J = 8,4$ Гц, Ar); 7,77–7,80 (1H, м, Ar); 7,62 (2H, д, $J = 8,4$ Гц, Ar); 7,52–7,57 (1H, м, Ar); 7,06–7,11 (2H, м, Ar). Мас-спектр, m/z : 242,5 [M + H]⁺. Знайдено, %: С 69,57; Н 4,51; N 5,89. $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_3$. Розраховано, %: С 69,70; Н 4,60; N 5,81.

4-(((1E)-(2-Метоксибеніл)метиленаміно)бензойна кислота (**3c**). Вихід 2,02 г (79 %), $T_{\text{пл}}$ 208–210 °С (EtOH) ($T_{\text{пл}}$ 197 °С [10]). Спектр ІЧ, ν , cm^{-1} : 2838; 2549; 1687; 1593; 1428; 1317; 1292; 1254; 1164; 1104; 1022; 924; 891; 853; 772; 750; 664; 556; 535. Спектр ^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6), δ , м. ч. (J , Гц): 13,10 (1H, ш с, C(O)OH); 8,98 (1H, с, CH); 8,12–8,17 (3H, м, Ar); 7,60–7,65 (1H, м, Ar); 7,39 (2H, д, $J = 8,4$ Гц, Ar); 7,27 (1H, д, $J = 8,1$ Гц, Ar); 7,16 (1H, т, $J = 7,7$ Гц, Ar). Мас-спектр, m/z : 256,3 [M + H]⁺. Знайдено, %: С 70,45; Н 5,20; N 5,58. $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{NO}_3$. Розраховано, %: С 70,58; Н 5,13; N 5,49.

4-(((1E)-(4-Метоксибеніл)метиленаміно)бензойна кислота (**3d**). Вихід 1,90 г (74 %), $T_{\text{пл}}$ 195–197 °С (EtOH) ($T_{\text{пл}}$ 207 °С [8]). Спектр ІЧ, ν , cm^{-1} : 2840; 2543; 1684; 1595; 1570; 1511; 1422; 1316; 1290; 1258; 1161; 1105; 929; 832; 775; 757; 656; 553; 533. Спектр ^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6), δ , м. ч. (J , Гц): 13,01 (1H, ш с, C(O)OH); 8,67 (1H, с, CH); 8,12 (2H, д, $J = 8,4$ Гц, Ar); 8,04 (2H, д, $J = 9,0$ Гц, Ar); 7,40 (2H, д, $J = 8,4$ Гц, Ar); 8,02 (2H, д, $J = 9,0$ Гц, Ar); 3,97 (3H, с, CH₃). Мас-спектр, m/z : 256,3 [M + H]⁺. Знайдено, %: С 70,67; Н 5,02; N 5,61. $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{NO}_3$. Розраховано, %: С 70,58; Н 5,13; N 5,49.

4-(((1E)-(4-Диметиламіно)беніл)метиленаміно)бензойна кислота (**3e**). Вихід 2,07 г (77 %), $T_{\text{пл}}$ 261–263 °С (EtOH) ($T_{\text{пл}}$ 255–257 °С [8]). Спектр ІЧ, ν , cm^{-1} : 2817; 2531; 1680; 1584; 1526; 1418; 1286; 1162; 942; 851; 816; 773; 752; 698; 538. Спектр ^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6), δ , м. ч. (J , Гц): 13,09 (1H, ш с, C(O)OH); 8,55 (1H, с, CH); 8,10 (2H, д, $J = 8,7$ Гц, Ar); 7,89 (2H, д, $J = 8,7$ Гц, Ar); 7,35 (2H, д, $J = 8,4$ Гц, Ar); 6,91 (2H, д, $J = 8,4$ Гц, Ar). Мас-спектр, m/z : 269,3 [M + H]⁺. Знайдено, %: С 71,49; Н 6,12; N 10,54. $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$. Розраховано, %: С 71,62; Н 6,01; N 10,44.

4-(((1E)-(2-Гідрокси-3-метоксибеніл)метиленаміно)бензойна кислота (**3f**). Вихід 2,07 г (76 %), $T_{\text{пл}} > 270$ °С (EtOH). Спектр ІЧ, ν , cm^{-1} : 2838; 2533; 1689; 1594; 1573; 1479; 1422;

1313; 1285; 1255; 1169; 967; 858; 781; 731; 692; 547. Спектр ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6), δ , м. ч. (J , Гц): 12,77 (2H, ш с, OH, C(O)OH); 8,97 (1H, с, CH); 8,03 (2H, д, $J = 7.2$ Гц, Ar); 7,47 (2H, д, $J = 7.6$ Гц, Ar); 7,23–7,28 (1H, м, Ar); 7,15 (2H, д, $J = 8.4$ Гц, Ar); 6,92 (1H, т, $J = 7.2$ Гц, Ar); 3,83 (3H, с, CH₃). Мас-спектр, m/z : 272,3 $[\text{M} + \text{H}]^+$. Знайдено, %: С 66,30; Н 4,84; N 5,26. C₁₅H₁₃NO₄. Розраховано, %: С 66,41; Н 4,83; N 5,16.

4-(((1E)-(5-Бром-2-гідроксифеніл)метилен)аміно)бензойна кислота (**3g**). Вихід 2,57 г (80 %), $T_{\text{пл}} 250$ °С (EtOH) ($T_{\text{пл}} 254$ – 255 °С [11]). Спектр ІЧ, ν , см⁻¹: 2831; 2552; 1681; 1596; 1561; 1480; 1432; 1319; 1279; 1175; 944; 859; 775; 749; 696; 555; 515. Спектр ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6), δ , м. ч. (J , Гц): 13,27 (1H, с, OH); 13,03 (1H, ш с, C(O)OH); 9,12 (1H, с, CH); 8,18 (2H, д, $J = 8.4$ Гц, Ar); 8,00 (1H, д, $J = 2.4$ Гц, Ar); 7,62–7,70 (3H, м, Ar); 7,08 (1H, д, $J = 9.0$ Гц, Ar). Мас-спектр, m/z : 321,2 $[\text{M} + \text{H}]^+$. Знайдено, %: С 52,39; Н 3,02; N 4,55. C₁₄H₁₀BrNO₃. Розраховано, %: С 52,52; Н 3,15; N 4,38.

4-(((1E)-(3,5-Дибром-2-гідроксифеніл)метилен)аміно)бензойна кислота (**3h**). Вихід 2,96 г (74 %), $T_{\text{пл}} > 270$ °С (EtOH) ($T_{\text{пл}} 307$ °С [12]). Спектр ІЧ, ν , см⁻¹: 2824; 2549; 1682; 1593; 1548; 1427; 1319; 1290; 1158; 939; 866; 772; 737; 690; 557; 545. Спектр ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6), δ , м. ч. (J , Гц): 14,18 (1H, ш с, OH); 12,70 (1H, ш с, C(O)OH); 9,03 (1H, с, CH); 8,03 (2H, д, $J = 8.4$ Гц, Ar); 7,88–7,93 (2H, м, Ar); 7,54 (2H, м, Ar). Мас-спектр, m/z : 400,0 $[\text{M} + \text{H}]^+$. Знайдено, %: С 42,25; Н 2,15; N 3,63. C₁₄H₉Br₂NO₃. Розраховано, %: С 42,14; Н 2,27; N 3,51.

4-(((1E)-(2-Гідрокси-5-нітрофеніл)метилен)аміно)бензойна кислота (**3i**). Вихід 2,21 г (77 %), $T_{\text{пл}} = 205$ – 207 °С (EtOH) ($T_{\text{пл}} 217$ °С [13]). Спектр ІЧ, ν , см⁻¹: 2811; 2532; 1691; 1596; 1567; 1477; 1422; 1350; 1284; 1171; 939; 832; 772; 749; 695; 549; 515. Спектр ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6), δ , м. ч. (J , Гц): 13,75 (1H, ш с, OH); 12,69 (1H, ш с, C(O)OH); 9,14 (1H, с, CH); 8,69 (1H, д, $J = 2.4$ Гц, Ar); 8,03 (2H, д, $J = 8.4$ Гц, Ar); 7,13–7,19 (1H, м, Ar); 7,15 (2H, д, $J = 8.4$ Гц, Ar); 6,92 (1H, т, $J = 7.2$ Гц, Ar); 3,83 (3H, с, CH₃). Мас-спектр, m/z : 287,3 $[\text{M} + \text{H}]^+$. Знайдено, %: С 58,66; Н 3,45; N 9,89. C₁₄H₁₀N₂O₅. Розраховано, %: С 58,74; Н 3,52; N 9,79.

4-(((1E)-(2-Гідрокси-1-нафтил)метилен)аміно)бензойна кислота (**3j**). Вихід 2,22 г (76 %), $T_{\text{пл}} > 270$ °С (EtOH) ($T_{\text{пл}} 282$ °С [14]). Спектр ІЧ, ν , см⁻¹: 2822; 2542; 1677; 1626; 1584; 1543; 1488; 1430; 1291; 1151; 935; 851; 825; 770; 744; 555; 490. Спектр ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6), δ , м. ч. (J , Гц): 15,46 (1H, с, OH); 12,88 (1H, ш с, C(O)OH); 9,65 (1H, с, CH); 8,49 (1H, д, $J = 8.4$ Гц, Ar); 8,03 (2H, д, $J = 7.6$ Гц, Ar); 7,93 (1H, д, $J = 9.6$ Гц, Ar); 7,70–7,79 (3H, м, Ar); 7,55 (1H, т, $J = 8.0$ Гц, Ar); 7,36 (1H, т, $J = 7.0$ Гц, Ar); 6,98 (1H, д, $J = 9.2$ Гц, Ar). Мас-спектр, m/z : 292,4 $[\text{M} + \text{H}]^+$. Знайдено, %: С 74,34; Н 4,37; N 4,89. C₁₈H₁₃NO₃. Розраховано, %: С 74,22; Н 4,50; N 4,81.

In vitro дослідження сполук **3a–j** як інгібіторів ксантиноксидази. У дослідженні використано ксантиноксидазу з коров'ячого молока фірми Sigma-Aldrich. Реакційна суміш для тестування інгібувального впливу азометинів містила 50 мМ фосфатний буфер (рН 7,4), 50 мкМ ксантин, інгібітор у концентрації від 0,1 до 150 мкМ, 0,1 мМ ЕДТА і 1 об. % ДМСО. Модельну систему термостатували протягом 5 хв при 25 °С, після чого реакцію розпочинали додаванням ксантиноксидази. Швидкість реакції детектували спектрофотометрично за зміною оптичної густини при довжині хвилі 293 нм. Для розрахунків використано значення коефіцієнта молярної екстинції сечової кислоти, що дорівнює 12,2 мМ⁻¹ · см⁻¹.

Розраховане з графіка Лайнуївера–Берка значення константи Міхаеліса становило 4,9 мкМ. Значення IC_{50} , K_m і констант інгібування K_i та K_i' наведено зі стандартним відхиленням, а нахил Хілла – як значення \pm стандартна помилка.

Дослідження азометинових похідних *n*-амінобензойної кислоти як антиоксидантів. Здатність сполук нейтралізувати гідроксильні радикали вивчали з використанням модифікованого МДА-тесту [7]. Реакційна суміш містила 50 мкМ хлорид заліза(II), 100 мкМ ЕДТА, 50 мМ фосфатний буфер (рН 7,4), 2,8 мМ 2-дезоксирибозу, воду та 2,8 мМ пероксид водню. Концентрація сполуки, що тестувалася, становила 0,3 мМ. Модельну систему термостатували 1 год при 37 °С, після чого до неї додавали 1 мл 2,8 %-го водного розчину трихлорооцтової кислоти і 1 мл 1 %-го розчину тіобарбітурової кислоти у розчині 50 мМ гідроксиду натрію. Отриману суміш термостатували на водяній бані протягом 20 хв при 80–100 °С. Аналіз проводили спектрофотометрично за концентрацією продуктів реакції тіобарбітурової кислоти з малоновим діальдегідом при 532 нм.

Комп'ютерне моделювання фермент-інгібіторних комплексів. Азометинові похідні *n*-амінобензойної кислоти було доковано в область активного центра (ланцюг С) ксантиноксидази з коров'ячого молока. Методика проведення докінгу описана в [15]. Докінг здійснено програмою Autodock 4.2. Для аналізу одержаних моделей фермент-інгібіторних комплексів застосовували програму Discovery Studio (Accelrys, Сан-Дієго, США).

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Pacher P., Nivorozhkin A., Szabó C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol. Rev.* 2006. **58**, № 1. P. 87–114. <https://doi.org/10.1124/pr.58.1.6>
2. Voelker R. Another warning for febuxostat. *JAMA.* 2019. **321**, № 13. P. 1245. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.3043>
3. Prakash A., Adhikari D. Application of Schiff bases and their metal complexes-A review. *Int. J. Chem. Tech. Res.* 2011. **3**, № 4. P. 1891–1896.
4. Paşa S., Tuneğ M., Boğa M. Biological surveying of diverse Schiff base compounds: antiproliferative, antiradical and enzyme inhibition activity. *Pharm. Chem. J.* 2019. **53**, № 4. P. 302–311. <https://doi.org/10.1007/s11094-019-01997-y>
5. Ali Z.Y., Mohamed S.A., Edrees M.M. Biological screening for some newly synthesized pyrazolo[3, 4-*d*] pyrimidine derivatives. *Nat. Sci.* 2012. **10**, № 7. P. 58–69.
6. Titinchia S.J.J., Abbo H.S., Saeed A.A.H. Synthesis, spectroscopic and molecular structures investigations of some carboxylated schiff bases. *J. Mol. Struct.* 2004. **705**, № 1–3. P. 121–126. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2004.06.025>
7. Aruoma O.I. Deoxyribose assay for detecting hydroxyl radicals. *Methods Enzymol.* 1994. **233**. P. 57–66. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33008-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33008-5)
8. Manchot W., Furlong J.R. Über Isomerie bei Anilen (Schiffschen Basen). (2. Mitteilung). *Chem. Ber.* 1909. **42**, № 3030. P. 4383–4389. <https://doi.org/10.1002/cber.19090420429>
9. Khan M.I., Khan A., Hussain I., Khan M.A., Gul S., Iqbal M., Rahman I.-U., Khuda F. Spectral, XRD, SEM and biological properties of new mononuclear Schiff base transition metal complexes. *Inorg. Chem. Commun.* 2013. **35**. P. 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2013.06.014>
10. Exner O., Lakomý J. Studies on the inductive effect. VII. Inductive and mesomeric effects of nitrogen and oxygen substituents. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1970. **35**. P. 1371–1386. <https://doi.org/10.1135/cccc19701371>
11. Dikusar A.E. Synthesis of (*E*)-2-methoxy-6-(*R*-imino)methylphenols and 2-methoxy-6-(*R*-amino)methylphenols. *Rus. J. Gen. Chem.* 2012. **82**, № 4. P. 693–696. <https://doi.org/10.1134/S1070363212040159>

12. Cronenberger L., Gaige T., Pacheco H., Pillon D. Nouvelles bases de Schiff dérivées des aldehydes dihalogéno-3,5 salicyliques et possédant des propriétés antifongiques et antibactériennes. *Chim. Ther.* 1968. **3**, № 2. P. 87–99.
13. Jiayi S., Min Z., Changyan S. A highly selective fluorescent chemosensor for Al(III) ions based on 2-hydroxy-1-naphthaldehyde derivative. *Can. J. Chem.* 2019. **97**, № 5. P. 387–391. <https://doi.org/10.1139/cjc-2018-0141>
14. Brewster C.M., Millam L.H. Phototropic and thermotropic anils from 5-bromosalicylaldehyde. *J. Am. Chem. Soc.* 1933. **55**, № 2. P. 763–766. <https://doi.org/10.1021/ja01329a049>
15. Muzychka O.V., Kobzar O.L., Popova A.V., Frasinuk M.S., Vovk A.I. Carboxylated aurone derivatives as potent inhibitors of xanthine oxidase. *Bioorg. Med. Chem.* 2017. **25**, № 14. P. 3606–3613. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.04.048>

Надійшло до редакції 12.02.2020

REFERENCES

1. Pacher, P., Nivorozhkin, A. & Szabó, C. (2006). Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol. Rev.*, 58, No. 1, pp. 87-114. <https://doi.org/10.1124/pr.58.1.6>
2. Voelker, R. (2019). Another warning for febuxostat. *JAMA*. 321, No. 13, pp. 1245. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.3043>
3. Prakash, A. & Adhikari, D. (2011). Application of Schiff bases and their metal complexes-A review. *Int. J. Chem. Tech. Res.*, 3, No. 4, pp. 1891-1896.
4. Paša, S., Tunež, M. & Boža, M. (2019). Biological surveying of diverse Schiff base compounds: antiproliferative, antiradical and enzyme inhibition activity. *Pharm. Chem. J.*, 53, No. 4, pp. 302-311. <https://doi.org/10.1007/s11094-019-01997-y>
5. Ali, Z. Y., Mohamed, S. A. & Edrees, M. M. (2012). Biological screening for some newly synthesized pyrazolo[3, 4-*d*]pyrimidine derivatives. *Nat.Sci.*, 10, No. 7, pp. 58-69.
6. Titinchia, S. J. J., Abbo, H. S. & Saeed, A. A. H. (2004). Synthesis, spectroscopic and molecular structures investigations of some carboxylated schiff bases. *J. Mol. Struct.*, 705, No. 1-3, pp. 121-126. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2004.06.025>
7. Aruoma, O. I. (1994). Deoxyribose assay for detecting hydroxyl radicals. *Methods Enzymol.*, 233, pp. 57-66. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33008-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33008-5)
8. Manchot, W. & Furlong, J. R. (1909). Über Isomerie bei Anilen (Schiffschen Basen). (2. Mitteilung). *Chem. Ber.*, 42, No. 3030, pp. 4383-4389. <https://doi.org/10.1002/cber.19090420429>
9. Khan, M. I., Khan, A., Hussain, I., Khan, M. A., Gul, S., Iqbal, M., Rahman, I.-U. & Khuda, F. (2013). Spectral, XRD, SEM and biological properties of new mononuclear Schiff base transition metal complexes. *Inorg. Chem. Commun.*, 35, pp. 104-109. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2013.06.014>
10. Exner, O. & Lakomý, J. (1970). Studies on the inductive effect. VII. Inductive and mesomeric effects of nitrogen and oxygen substituents. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 35, pp. 1371-1386. <https://doi.org/10.1135/cccc19701371>
11. Dikusar, A. E. (2012). Synthesis of (*E*)-2-methoxy-6-(*R*-imino)methylphenols and 2-methoxy-6-(*R*-amino)methylphenols. *Rus. J. Gen. Chem.*, 82, No. 4, pp. 693-696. <https://doi.org/10.1134/S1070363212040159>
12. Cronenberger, L., Gaige, T., Pacheco, H. & Pillon, D. (1968). Nouvelles bases de Schiff dérivées des aldehydes dihalogéno-3,5 salicyliques et possédant des propriétés antifongiques et antibactériennes. *Chim. Ther.*, 3, No. 2, pp. 87-99
13. Jiayi, S., Min, Z. & Changyan, S. (2019). A highly selective fluorescent chemosensor for Al(III) ions based on 2-hydroxy-1-naphthaldehyde derivative. *Can. J. Chem.*, 97, No. 5, pp. 387-391. <https://doi.org/10.1139/cjc-2018-0141>
14. Brewster, C. M. & Millam, L. H. (1933). Phototropic and thermotropic anils from 5-bromosalicylaldehyde. *J. Am. Chem. Soc.*, 55, No. 2, pp. 763-766. <https://doi.org/10.1021/ja01329a049>
15. Muzychka, O. V., Kobzar, O. L., Popova, A. V., Frasinuk, M. S. & Vovk, A. I. (2017). Carboxylated aurone derivatives as potent inhibitors of xanthine oxidase. *Bioorg. Med. Chem.*, 25, No. 14, pp. 3606-3613. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.04.048>

Received 12.02.2020

А.Л. Кобзар¹, А.В. Татарчук^{1,2},
М.В. Качаева¹, С.Г. Пильо¹, А.В. Суховеев¹,
В.В. Суховеев^{1,2}, В.С. Броварец¹, А.И. Вовк¹

¹ Институт биоорганической химии и нефтехимии им. В.П. Кухаря НАН Украины, Киев

² Нежинский государственный университет им. Н.В. Гоголя

E-mail: kobzar@bpci.kiev.ua

АЗОМЕТИНОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ *n*-АМИНОБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ КАК АНТИОКСИДАНТЫ И ИНГИБИТОРЫ КСАНТИНОКСИДАЗЫ

Установлены антиоксидантные свойства гидроксильрованных азометиновых производных *n*-аминобензойной кислоты и ингибирующее влияние этих соединений на активность ксантиноксидазы. Анализ ингибирующей активности серии синтезированных азометинов относительно ксантиноксидазы, а также результаты молекулярного докинга указывают на то, что в механизмах ингибирования фермента могут быть задействованы карбоксильная и гидроксильная группы. Влияние азометиновых производных описывается кинетикой смешанного типа с микромолярными значениями констант ингибирования. Ингибирующая способность наиболее активного соединения, 4-(((1*E*)-(2-гидрокси-5-нитрофенил)метиленамино)бензойной кислоты, соизмерима с влиянием известного ингибитора — аллопуринола. Молекулярный докинг азометинового ингибитора в активный центр ксантиноксидазы свидетельствует о том, что карбоксилатная группа образует водородные связи с аминокислотными остатками Arg880, Thr1010 и Glu1261, а гидроксильная группа приближена к остаткам Glu802 и Asn768. Кроме того, арильные фрагменты молекулы ингибитора формируют контакты с Phe914, Phe1009, Leu648, Phe1013 и другими остатками. Антиоксидантная активность азометинов оценена в модельной системе путем определения малонового диальдегида в тесте с тиобарбитуровой кислотой. Показано, что способность некоторых соединений нейтрализовать гидроксильные радикалы превышает действие тролокса как эталонного антиоксиданта.

Ключевые слова: азометины, ксантиноксидаза, ингибирование, молекулярный докинг, гидроксильные радикалы, антиоксидантные свойства.

О.Л. Кобзар¹, А.В. Татарчук^{1,2},
М.В. Качаева¹, С.Г. Пильо¹, О.В. Суховеев¹,
В.В. Суховеев^{1,2}, В.С. Броварец¹, А.И. Вовк¹

¹ V.P. Kukhar Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of the NAS of Ukraine, Kyiv

² Nizhyn Mykola Gogol State University

E-mail: kobzar@bpci.kiev.ua

AZOMETHINE DERIVATIVES OF *p*-AMINOBENZOIC ACID AS ANTIOXIDANTS AND XANTHINE OXIDASE INHIBITORS

Antioxidant properties of hydroxylated azomethine derivatives of *p*-aminobenzoic acid and their inhibitory effect on xanthine oxidase activity have been established. Analysis of inhibitory activities of a series of synthesized azomethine compounds towards xanthine oxidase, as well as molecular docking study indicated that carboxylate and hydroxyl groups can be involved in mechanisms of the enzyme inhibition. The azomethine derivatives are shown to exhibit the mixed type of inhibition, and inhibitory activities of some of them are in the micromolar ranges. The effect of the most active 4-(((1*E*)-(2-hydroxy-5-nitrophenyl)methylene)amino)benzoic acid was comparable to that of the known inhibitor allopurinol. According to molecular docking results, the carboxylate group of the azomethine inhibitor can form hydrogen bonds with the amino acid residues of Arg880, Thr1010, and Glu1261 in the active site of xanthine oxidase, while the hydroxyl group is close to the residues of Glu802 and Asn768. In addition, aryl groups of the inhibitor molecule form contacts with Phe914, Phe1009, Leu648, Phe1013, and other amino acid residues. The antioxidant activity of the azomethines is evaluated in the model system by the detection of malonic dialdehyde with the thiobarbituric acid test. The ability of some compounds to neutralize hydroxyl radicals exceeded the effect of trolox as a reference antioxidant.

Keywords: azomethines, xanthine oxidase, inhibition, molecular docking, hydroxyl radicals, antioxidant properties.