

**ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СОЕДИНЕНИЙ ДОНЕПЕЗИЛА НА
ОСНОВЕ ГИДРОКСИТИРОЗОЛА НА ОКСИДАТИВНОЕ
ПОВРЕЖДЕНИЕ И АКТИВНОСТЬ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ
ФЕРМЕНТОВ**

Бекмуродова Малика Рузимурод кизи

*Студент Самаркандского государственного
медицинского университета, №2 лечебная работа, группа 501*

bekmurodovamalika15@gmail.com

Эшмурадов Куёшбек Санжар угли

*Студент Самаркандского государственного медицинского университета,
№1 лечебная работа, группа 313*

eshmuradovquyoshbeik@gmail.com

Адхамов Асрор Адхам угли

*Студент Самаркандского государственного
медицинского университета, №2 лечебная работа, группа 401*

adhamovasror605@gmail.com

Научный руководитель: Тоиров Достон Рустамович

*доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней Самаркандского
государственного медицинского университета, PhD.*

АННОТАЦИЯ: Ингибиторы моноаминоксидазы (МАО) и ксантиноксидазы (КО) считаются мультитаргетными лекарственными средствами, полезными для профилактики оксидативных повреждений и нейродегенеративных заболеваний, облегчения их течения и лечения. Химерные молекулы, созданные на основе природных соединений и присоединённые к фармакологическим препаратам, считаются потенциально ключевыми структурами для открытия новых синтетических лекарств в качестве новых ингибиторов ферментов. Известно, что семь типов гибридов гидрокситирозола с донепезилом проявляют защитную роль в условиях *in vitro* модели нейрональных клеток при болезни Альцгеймера. В настоящем исследовании анализируется влияние гибридных соединений на ферменты моноаминоксидазу А (МАО-А), моноаминоксидазу В (МАО-В) и ксантиноксидазу (КО), которые играют важную роль в развитии окислительного стресса и нейродегенеративных заболеваний. Согласно результатам исследования, из изученных гибридных соединений были выявлены такие, которые обладают селективной ингибиторной активностью в отношении различных классов ферментов. В частности, производные донепезила — 4-гидрокси-3-

метоксифенэтил-1-бензилпиперидин-4-карбоксилат (GT3) и 4-гидроксифенэтил-1-бензилпиперидин-4-карбоксилат (GT4) — являются наиболее эффективными ингибиторами МАО-А, проявляя слабую активность в отношении МАО-В и практически не влияя на активность КО. Напротив, производное донепезила 4,5-дигидрокси-2-нитрофенэтил-1-бензилпиперидин-4-карбоксилат (GT2), несмотря на то, что является слабейшим ингибитором МАО, считается самым сильным ингибитором КО. Таким образом, различная селективность синтезированных гибридов полифенол–донепезила по отношению к ферментам расширяет их потенциал для применения при окислительном стрессе и нейродегенеративных заболеваниях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Моноаминоксидаза, ксантиноксидаза, нейродегенеративные заболевания, гидрокситирозол–донепезил, редокс, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, гидрокситирозол

ВВЕДЕНИЕ: Заболевания, связанные с воспалением, включая нейродегенеративные заболевания, предположительно сопровождаются нарушением редокс-баланса в тканях. Существует несколько ферментных систем, участвующих в регуляции редокс-метаболизма, которые включают как факторы, вызывающие окислительный стресс, так и механизмы их нейтрализации. Редокс-баланс в основном обеспечивается за счёт образования и утилизации активных форм кислорода (АФК) — супероксид-анион-радикала, гидропероксидного радикала и перекиси водорода. К числу ферментов, продуцирующих перекись водорода, относятся моноаминоксидазы (МАО) и ксантиноксидазы (КО), обе из которых рассматриваются как фармакологические мишени при лечении ряда заболеваний.

МАО — это флавопротеиновые ферменты, локализованные на внешней мембране митохондрий и представленные в виде двух изоформ — МАО-А и МАО-В. Они различаются тканеспецифичной экспрессией, чувствительностью к субстратам и ингибиторам. МАО участвуют в образовании перекиси водорода путём оксидативного дезаминирования биогенных аминов, включая нейромедиаторы и некоторые лекарственные препараты. Несмотря на 72% сходства в аминокислотной последовательности обеих изоформ, между ними имеются различия в трёхмерной структуре. В частности, активный центр МАО-А меньше по сравнению с МАО-В, и между ними обнаружено наличие характерной «петлевой» конформации. Также изоферменты отличаются по специфичности к субстратам и уровню экспрессии в различных тканях. В результате МАО-А участвует в регуляции уровня дофамина, а МАО-В — уровня ГАМК. Поэтому

МАО-А и МАО-В разрабатываются как мишени для лекарственных препаратов при терапии нейродегенеративных заболеваний. В частности, ингибиторы МАО-А применяются для лечения депрессии и тревожных расстройств, а ингибиторы МАО-В — при болезни Паркинсона и Альцгеймера. В связи с этим в настоящее время ведутся активные исследования по созданию селективных и обратимых ингибиторов обеих изоформ, особенно учитывая риск побочных эффектов, связанных с ингибцией МАО-А.

В последние годы установлено, что ферменты моноаминоксидазы (МАО) играют важную роль не только при раке, но и при других метаболических заболеваниях, таких как диабет, ожирение и сердечно-сосудистые заболевания. Кроме того, сообщается, что ингибиторы МАО-А полезны при лечении рака простаты и могут использоваться как двунаправленный терапевтический подход у пациентов с депрессией.

Ксантиноксидаза (КО) и ксантиндегидрогеназа (КДГ) — это ферменты, локализованные в цитозоле, происходящие из единой транскрипции гена, называемого ксантиноксидоредуктазой. Оба фермента участвуют в катаболизме пуринов и играют важную роль в поддержании гомеостаза различных редокс-форм в организме. В физиологических условиях преобладает форма КДГ, тогда как КО активируется в условиях окислительного стресса. КО катализирует превращение ксантина в мочевую кислоту, при этом образуется перекись водорода. КО и КДГ обладают гомодимерной структурой, каждая мономерная единица включает три основных домена: N-концевой домен (с двумя железо-серными кластерами), центральный домен (связывающий флавин-аденин-динуклеотид), и С-концевой домен (участок связывания молибдоптерина).

С патофизиологической точки зрения, повышение активности КО в условиях окислительного стресса приводит к накоплению мочевой кислоты, что рассматривается как основной фактор риска подагры. Недавние исследования показали, что увеличение активности КО и накопление активных форм кислорода (АФК) также связано с нейродегенеративными заболеваниями, включая болезнь Альцгеймера и Паркинсона. Ранее снижение активности КО применялось как фармакологическая стратегия для уменьшения продукции мочевой кислоты и перекиси водорода. Такой подход способствовал разработке ингибиторов КО, некоторые из которых имеют природное происхождение. Однако побочные эффекты этих веществ ограничивают их широкое клиническое применение. Поэтому в последние годы научные исследования сосредоточены на выявлении новых ингибиторов КО с пониженной токсичностью.

Природные полифенолы обладают множеством полезных для здоровья свойств: антиоксидантным, противовоспалительным, антиканцерогенным действием, замедляют развитие сердечно-сосудистых, нейродегенеративных и опухолевых заболеваний. Их биологическая активность напрямую связана с антиоксидантными свойствами, поскольку они оказывают положительное влияние за счёт снижения уровня АФК в организме. На сегодняшний день полифенолы, содержащиеся в оливковом масле холодного отжима, особенно секоиридоиды и их метаболиты, признаны Европейским агентством по безопасности продуктов питания (EFSA) как полезные для здоровья.

Поиск многоцелевых агентов для лечения воспалительных заболеваний стал важным направлением фармакологических исследований. В этом контексте недавно было показано, что гибридные соединения, состоящие из двух компонентов — природного и фармакологического происхождения — могут обладать антиоксидантным и нейропротекторным действием. В таких соединениях фрагмент лекарственного средства донепезила, применяемого для лечения болезни Альцгеймера (N-бензилпиперидин), соединяется с производными растительного полифенола гидрокситирозола (GT1, GT2, GT3, GT4), чьи –ОН группы ацетилированы (GT1a, GT3a, GT4a). Поскольку ацетилирование не было стабильным у соединения GT2, в результате были получены семь новых гибридных молекул. Эти соединения проявляют антиоксидантную активность через различные механизмы (передача водорода, перенос электронов, связывание ионов металлов). Кроме того, они демонстрируют защитные свойства против клеточной токсичности, вызванной β -амилоидом, снижая активность каспазы-3 и апоптотическую гибель клеток.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ: Влияние гибридных соединений GT на активность моноаминоксидаз: В настоящем исследовании оценивалось влияние гибридных соединений GT, синтезированных на основе донепезила и гидрокситирозола, на изоферменты моноаминоксидазы (MAO) А и В. Моноаминоксидазы являются важными ферментами, участвующими в нейродегенеративных заболеваниях и окислительном стрессе, и снижение их активности считается одной из ключевых стратегий в фармакологическом управлении этими патологиями.

В ходе эксперимента гибридные соединения GT инкубировались с ферментами MAO-A и MAO-B при различных концентрациях, после чего измерялась ферментативная активность. Результаты показали, что соединения GT ингибируют ферменты MAO дозозависимым образом. Хотя ингибирующее действие этих соединений было слабее по сравнению с селективным ингибитором MAO-A — клоргилином и ингибитором MAO-B — селегилином, они демонстрировали

ингибиторный профиль, схожий с донепезилом. Среди всех исследованных соединений GT наблюдалась более высокая аффинность к изоферменту MAO-A, то есть они более эффективно ингибировали MAO-A по сравнению с MAO-B. Это подтверждает потенциальную способность данных гибридных соединений влиять на нейрохимический баланс через ингибирование MAO-A. Согласно результатам кинетического анализа, наиболее эффективным ингибитором активности MAO-A оказалось соединение GT4 с половинной ингибирующей концентрацией (IC_{50}) 14,3 мкМ. GT3 заняло второе место с показателем IC_{50} 23,4 мкМ. Наименьшая эффективность зафиксирована у соединения GT2 (IC_{50} = 322 мкМ) (таблица 1). Остальные гибридные соединения имели значения IC_{50} в диапазоне от 44,3 до 57,0 мкМ. В отношении фермента MAO-B все гибридные соединения показали примерно одинаковую активность, с IC_{50} в диапазоне от 85 до 184 мкМ, при этом GT2 вновь оказался соединением с наименьшей ингибирующей активностью в данной группе.

В целом, полученные результаты свидетельствуют о том, что гибридные соединения GT, в частности GT4 и GT3, могут рассматриваться как перспективные селективные ингибиторы изофермента MAO-A. Их роль в нейрохимической регуляции, особенно в лечении депрессии и других состояний, связанных с активностью MAO-A, имеет научное обоснование.

Таблица 1. Значения IC_{50} (мкМ) гибридных соединений GT в отношении ферментов MAO-A и MAO-B

Соединения	IC_{50} n (N)	
	MAO-A	MAO-B
GT1	54.1 ± 6.9 (10)	125 ± 28 (10)
GT1a	50.8 ± 11.0 (10)	85 ± 33 (9)
GT2	322 ± 58 (10)	184 ± 48 (8)
GT3	23.4 ± 6.3 (10)	171 ± 44 (10)
GT3a	44.3 ± 14.4 (10)	174 ± 80 (10)
GT4	14.3 ± 2.2 (8)	106 ± 22 (6)
GT4a	57.0 ± 18.2 (10)	86 ± 24 (6)
Донепезил	67.6 ± 8.1 (10)	40.0 ± 10.9 (10)
Клоргилин	0.15 ± 0.02 (3)	4.3 ± 0.1 (3)
Селегилин	15.9 ± 0.1 (3)	0.23 ± 0.05 (3)

Для определения механизма ингибирования MAO ферментов гибридными соединениями GT была проведена оценка на основе кинетических измерений. В частности, начальная скорость реакции (V_i) измерялась при различных

концентрациях субстрата — как в отсутствие ингибитора, так и при двух фиксированных концентрациях ингибитора. Полученные данные были проанализированы с помощью графиков Михаэлиса–Ментен и Лайнвивера–Берка. Такой подход позволил отслеживать изменения кинетических параметров КМ (константы Михаэлиса) и V_{max} (максимальной скорости реакции) под влиянием каждого GT-соединения на активность MAO-A и MAO-B. Результаты анализа приведены соответственно в таблицах 2 (MAO-A) и 3 (MAO-B). Согласно полученным данным, хотя некоторые GT-соединения продемонстрировали конкурентный, неконкурентный или неклассический (uncompetitive) механизм ингибирования, большинство из них проявили свойства смешанного типа ингибиторов.

Таблица 2. *Кинетический анализ ингибирования MAO-A гибридными соединениями GT.*

Murakka b	Ингибиторная характеристика	Примечание	Рассчитано по K_i	
			Повышение K_m	Снижение V_{max}
			$\mu M \pm SE (n)$	
GT1	смешанный	приближается к конкурентному	39.7 ± 14.3	
GT1a	смешанный	приближается к конкурентному	36.5 ± 13.2	
GT2	некомпетитивный	—		398 ± 56
GT3	смешанный	приближается к конкурентному	7.6 ± 3.7	
GT3a	унокпетитивный	—		80.5 ± 30.4
GT4	смешанный	приближается к конкурентному	6.1 ± 1.6	
GT4a	смешанный	приближается к конкурентному	15.6 ± 4.2	
Донепезил	смешанный	приближается к неконкурентному		82.9 ± 10.0
Клоргиллин	инактиватор	—		0.012

Таблица 3. Кинетический анализ гибридов GT для ингибирования МАО-В.

Murakkab	Ингибиторная характеристика	Примечание	Рассчитано по K_i	
			Повышение K_m	Снижение V_{max}
			$\mu M \pm SE (n)$	
GT1	компетитивный	—	163 ± 28	
GT1a	смешанный	приближается к конкурентному	37.9 ± 13.1	
GT2	некомпетитивный	—		186 ± 98
GT3	смешанный	приближается к конкурентному	115 ± 50	
GT3a	смешанный	приближается к конкурентному	190 ± 37	
GT4	некомпетитивный	—		128 ± 45
GT4a	компетитивный	—	20.7 ± 2.8	
Донепезил	смешанный	приближается к конкурентному	15.3 ± 4.6	
Селегил	инактиватор	-		0.055

Гибридные молекулы, полученные путём связывания соединений природного происхождения с лекарственными веществами, рассматриваются как перспективные фармакофорные структуры для создания новых синтетических лекарственных средств, ингибирующих ферменты. Согласно исследованиям, гибридные соединения на основе гидрокситирозола и донепезила обладают общими антиоксидантными и металл-хелатирующими свойствами. Также отмечено, что эти соединения проявляют нейропротекторное действие в *in vitro* модели болезни Альцгеймера. Некоторые из синтезированных соединений имеют фармакокинетические свойства, схожие с донепезилом. Эти результаты служат основанием для гипотезы о возможности развития данных соединений в качестве лекарств. В настоящем исследовании более подробно изучено влияние этих гибридных соединений на активность двух ключевых ферментов, участвующих в воспалительных, нейродегенеративных и оксидативных повреждениях —

моноаминоксидаз (МАО-А и МАО-В) и ксантиноксидазы (КО). Дизайн гибридных молекул основан на структурах донепезила (препарата, применяемого при болезни Альцгеймера) и природного полифенола гидрокситирозола, обладающего антиоксидантными и антипролиферативными свойствами. В литературе указано, что молекулы, содержащие фрагмент N-бензилпиперидина, обладают мультифункциональной активностью как ингибиторы МАО и ацетилхолинэстеразы. Фенольные соединения, выделенные из полифенолов оливкового масла, хорошо изучены в связи с их антиоксидантным и нейрорхимическим благоприятным действием. Структурное сходство между полифенолами и метаболитами МАО создаёт основу для их взаимодействия с ферментами.

Результаты показывают, что соединения GT3 и GT4 являются наиболее эффективными ингибиторами МАО-А, при этом практически не оказывают влияния на активность МАО-В и КО. Особенно следует отметить соединение GT3, содержащее только одну –ОН группу, которое проявляет более сильное ингибирующее действие по сравнению с другими соединениями с более высокой полярностью. Соединение GT4, благодаря наличию группы –ОСН₃, демонстрирует ещё более выраженную ингибирующую активность. С другой стороны, соединение GT2, которое является самым слабым ингибитором по отношению к ферментам МАО, проявляет наибольшую эффективность как ингибитор КО. Это соединение отличается металлохелатирующими свойствами, кроме того, существует вероятность, что нитро-группа связывается с железо-серным кластером фермента КО. Отсутствие такой нитро-группы у GT3 и GT4 и их неспособность ингибировать КО подтверждает эту гипотезу. В то же время наличие нитро-группы у GT2 может объяснять его слабое ингибиторное действие в отношении ферментов МАО. Следует отметить, что в фармацевтической практике ацетилированные формы (GT1a, GT3a, GT4a) никогда не проявляют большую активность по сравнению с неацетилированными формами. Ацетилирование является лишь фармацевтическим методом улучшения проницаемости через мембрану и не обладает ингибирующими свойствами. Эти результаты свидетельствуют о перспективности концепции создания мультитаргетных гибридных соединений. Научный интерес к данной стратегии растёт не только в рамках нейродегенеративных заболеваний, но и при таких значимых патологиях, как рак.

ВЫВОДЫ: Научные результаты, представленные в данной статье, показывают, что выявление гибридных соединений, созданных на основе компонентов, полученных из природных растений, и химических фрагментов с фармакофорными свойствами, может стать важной стратегией в поиске многомишенных

терапевтических средств для лечения различных, даже не связанных между собой заболеваний.

Кроме того, подчёркивается, что идентификация новых молекул с фармакофорной активностью и широким спектром применения имеет важное значение не только для снижения побочных эффектов существующих лекарств, но и для одновременного лечения нескольких заболеваний — коморбидных состояний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Тоиров Э.С, Тоиров Д.Р, Соловьев С.К / Подагра диагностика и лечение – Ташкент-Узбекистан-2020
2. Cortese-Krott M.M., Koning A., Kuhnle G.G.C., Nagy P., Bianco C.L., Pasch A., Wink D.A., Fukuto J.M., Jackson A.A., van Goor H., et al. The Reactive Species Interactome: Evolutionary Emergence, Biological Significance, and Opportunities for Redox Metabolomics and Personalized Medicine // *Antioxidants & Redox Signaling*. — 2017. — Vol. 27. — P. 684–712. — doi: 10.1089/ars.2017.7083.
3. Stewart N.J., Sato T., Takeda N., Hirata H., Matsumoto S. Hyperpolarized ¹³C Magnetic Resonance Imaging as a Tool for Imaging Tissue Redox State, Oxidative Stress, Inflammation, and Cellular Metabolism // *Antioxidants & Redox Signaling*. — 2021. — Vol. 36. — P. 81–94. — doi: 10.1089/ars.2021.0139.
4. Tairov D.R., Berdiev D.KH ” Medication and non-medication methods to eliminate hyperuricemia in gout” "Science and Education" Scientific Journal / Impact Factor 3.848 May 2023 / Volume 4 Issue 5
5. Таиров Д.Р., Бердиев Д.Х., ” ПОДАГРА КАСАЛЛИГИ БИЛАН КАСАЛЛАНГАН БЕМОРЛАРДА ЮРАК ҚОН ТОМИР ЗАРАРЛАНИШЛАРИНИНГ ВА МЕТАБОЛИК СИНДРОМНИНГ КОМОРБИД КЕЧУВИ” 2nd International Congress on Multidisciplinary Studies Hosted from Indonesia <https://conferencepublication.com> February 20th, 2021
6. Ngum J.A., Tatang F.J., Toumeni M.H., Nguengo S.N., Simo U.S.F., Mezajou C.F., Kameni C., Ngongang N.N., Tchinda M.F., Dongho Dongmo F.F., et al. An overview of natural products that modulate the expression of non-coding RNAs involved in oxidative stress and inflammation-associated disorders // *Frontiers in Pharmacology*. — 2023. — Vol. 14. — Article ID: 1144836. — doi: 10.3389/fphar.2023.1144836.
7. Jena A.B., Samal R.R., Bhol N.K., Duttaroy A.K. Cellular Red-Ox system in health and disease: The latest update // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. — 2023. — Vol. 162. — Article ID: 114606. — doi: 10.1016/j.biopha.2023.114606.
8. Casas A.I., Dao V.T., Daiber A., Maghzal G.J., Di Lisa F., Kaludercic N., Leach S., Cuadrado A., Jaquet V., Seredenina T., et al. Reactive Oxygen-Related Diseases: Therapeutic Targets and Emerging Clinical Indications // *Antioxidants & Redox Signaling*. — 2015. — Vol. 23. — P. 1171–1185. — doi: 10.1089/ars.2015.6433.

9. Джонсон Р.Дж., Сигал М.С., Саутин Ю., Накагава Т., Фейг Ди, Кан Д.Х., Герш М.С., Беннер С., Санчес-Лосада Л.Г. Потенциальная роль сахара (фруктозы) в эпидемии гипертонии, ожирения и метаболического синдрома, диабета, заболеваний почек, сердечно-сосудистых заболеваний. *Am J Clin Nutr.* 2007;86:899-906. [PubMed] [Google Scholar]

10. Ramsay R.R. Monoamine oxidases: The biochemistry of the proteins as targets in medicinal chemistry and drug discovery // *Current Topics in Medicinal Chemistry.* — 2012. — Vol. 12. — P. 2189–2209. — doi: 10.2174/156802612805219978.

11. Youdim M.B., Edmondson D., Tipton K.F. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors // *Nature Reviews Neuroscience.* — 2006. — Vol. 7. — P. 295–309. — doi: 10.1038/nrn1883.

12. Tipton K.F. 90 years of monoamine oxidase: Some progress and some confusion // *Journal of Neural Transmission.* — 2018. — Vol. 125. — P. 1519–1551. — doi: 10.1007/s00702-018-1881-5.

13. Colibus L., Li M., Binda C., Lustig A., Edmondson D., Mattevi A. Three-dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO A): Relation to the structures of rat MAO A and human MAO B // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* — 2005. — Vol. 102. — P. 12684–12689. — doi: 10.1073/pnas.0505975102.

14. Naoi M., Maruyama W., Inaba-Hasegawa K. Type A and B monoamine oxidase in age-related neurodegenerative disorders: Their distinct roles in neuronal death and survival // *Current Topics in Medicinal Chemistry.* — 2012. — Vol. 12. — P. 2177–2188. — doi: 10.2174/156802612805219950.

15. Shih J.C., Chen K., Ridd M.J. Monoamine oxidase: From genes to behavior // *Annual Review of Neuroscience.* — 1999. — Vol. 22. — P. 197–217. — doi: 10.1146/annurev.neuro.22.1.197.

16. Cho H.U., Kim S., Sim J., Yang S., An H., Nam M.H., Jang D.P., Lee C.J. Redefining differential roles of MAO-A in dopamine degradation and MAO-B in tonic GABA synthesis // *Experimental & Molecular Medicine.* — 2021. — Vol. 53. — P. 1148–1158. — doi: 10.1038/s12276-021-00646-3.

17. Schwartz T.L. A neuroscientific update on monoamine oxidase and its inhibitors // *CNS Spectrums.* — 2013. — Vol. 18. — P. 25–32. — doi: 10.1017/S1092852913000734.