

В. Б. Ларіонов¹, А. С. Акішева², М. Я. Головенко¹, О. А. Макаренко², І. Ю. Борисюк³
ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМЕНІ О. В. БОГАТСЬКОГО НАН УКРАЇНИ¹, ОДЕСА
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. І. МЕЧНИКОВА²
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ³

ПРОСТАГЛАНДИНОВИЙ І БРАДИКІНІНОВИЙ МЕХАНІЗМИ АНАЛЬГЕТИЧНОЇ ТА ПРОТИЗАПАЛЬНОЇ ДІЇ ПРОПОКСАЗЕПАМУ: ДАНІ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКІНГУ

Вступ. Простагландини і брадикінін є важливими сполуками, що беруть участь у виникненні та передачі відчуття болю. Інноваційний препарат "Пропоксазепам", який створили працівники Фізико-хімічного інституту імені О. В. Богатського НАН України і ТДВ "ІНТЕРХІМ", має оригінальний фармакодинамічний профіль, оскільки він одночасно гальмує гострий та хронічний біль і проявляє протизапальну та протисудомну дію.

Мета дослідження – дослідити можливість взаємодії пропоксазепаму з циклооксигеназою-1 і циклооксигеназою-2 та рецептором брадикініну на підставі результатів молекулярного докінгу.

Методи дослідження. Процедуру молекулярного докінгу проведено з використанням програми iGEMDOCK v2.1, структури сполук оптимізовано за величиною внутрішньої енергії (Avogadro (v 1.2.0)) та представлено у форматі *.pdb.

Результати й обговорення. Розраховано величини вільної енергії взаємодії пропоксазепаму та деяких референтних сполук з макромолекулами циклооксигенази-1 і циклооксигенази-2 та брадикініну, визначено амінокислотні залишки, що беруть участь у цих процесах. Встановлено, що енергія взаємодії пропоксазепаму із циклооксигеназою-1 і циклооксигеназою-2 нижча, ніж для інших референтних сполук. Середня енергія зв'язків із циклооксигеназою-1, порівняно з референтними сполуками (ацетилсаліцилат, кеторолак, диклофенак, целекоксиб), найменша для пропоксазепаму.

Висновки. На підставі отриманих даних молекулярного докінгу доведено, що пропоксазепам недостатньо взаємодіє з ключовим ензимом синтезу простагландинів – циклооксигеназою-1 (утворюються переважно слабкі вандерваальсові зв'язки, а виявлені місця взаємодії є неспецифічними). Взаємодія із циклооксигеназою-2 може бути малоефективною, оскільки місця зв'язування локалізовані близько від активного центру та залучають амінокислотні залишки однакового домену. Імовірно є антагонізм при взаємодії з брадикініновим рецептором 1 типу, що підтверджується однаковими місцями зв'язування з ендогенним лігандом – брадикініном та високим значенням середньої енергії зв'язку.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: циклооксигенази; брадикінін; молекулярний докінг; пропоксазепам; анальгетична, протизапальна дія.

ВСТУП. Простагландини є метаболітами арахідонової кислоти, які утворюються за допомогою циклооксигеназ (ЦОГ) (КФ 1.14.99.1) – ізоформ ензимів з різною активністю та чутливістю до нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП). Циклооксигенази здатні викликати запалення та значно впливають на розвиток відчуття болю, підвищуючи збудливість периферичної соматосенсорної системи [1]. Блокування їх активності з терапевтичною метою досягають за допомогою НПЗП, які мають таку побічну дію,

© В. Б. Ларіонов, А. С. Акішева, М. Я. Головенко, О. А. Макаренко, І. Ю. Борисюк, 2022.

як ураження слизової оболонки шлунка, діарея, зниження згортання крові й кровотеча, нефротоксична дія та ін., тому пошук ефективних знеболювальних засобів залишається актуальною проблемою.

Значну увагу привертає і брадикінін, який також бере участь у виникненні та передачі відчуття болю [2]. Він є одним із найвідоміших хімічних ноцицептивних подразників та найбільш фізіологічно релевантним для ураження тканин і болю. Прямі ефекти брадикініну опосередковуються двома рецепторами, пов'язаними з G-білком: В2-рецептор зазвичай експресується

у тканинах постійно, а В1-рецептор індукується в стані запалення або травми [3].

Інноваційний препарат “Пропоксазепам”, який створили працівники Фізико-хімічного інституту імені О. В. Богатського НАН України і ТДВ “ІНТЕРХІМ”, має оригінальний фармакодинамічний профіль, оскільки він одночасно гальмує гострий та хронічний біль і проявляє проти-запальну та протисудомну дію [4]. Основною мішенню для знеболювання є субодиниці $\alpha 2$ та $\alpha 3$ рецептора ГАМК [5]. Пропоксазепам взаємодіє також з іншими біологічними мішенями, які відповідають за перебіг болю: гліциновими рецепторами, потенціалозалежними калієвими каналами, дофамінергічною системою, NMDA-рецепторами, альфа-1 адренорецепторами [6]. Отримано дозвіл МОЗ України (наказ від 23 лютого 2021 р. № 310) на проведення першої фази клінічних випробувань сполуки.

Мета дослідження – дослідити можливість взаємодії пропоксазепаму з циклооксигеназою-1 (ЦОГ-1) і циклооксигеназою-2 (ЦОГ-2) та рецептором брадикініну на підставі результатів молекулярного докінгу.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Процедуру молекулярного докінгу проведено з використанням програми iGEMDOCK v2.1 [7, 8] і молекулярних структур рецепторів та ензимів, отриманих з бази даних біологічних макромолекул (<http://www.rcsb.org/>). Вони містять ензими циклооксигеназу-1 (комплекс із целекоксибом, 3KK6), циклооксигеназу-2 (комплекс із саліцилатом, 5F1A) та рецептор брадикініну (нативний рецептор без зв'язаного ліганду, 7E1B). Структури досліджуваних сполук – інгібіторів ЦОГ-1 і ЦОГ-2 (ацетилсаліцилат, целекоксиб, диклофенак, ібупрофен, кеторолак) та брадикінін, похідні діамінопіримідину (сполуки I і II), 1,4-бенздіазепіну (сполука III), які є описаними антагоністами брадикінінового рецептора, а також молекулу пропоксазепаму оптимізовано за величиною внутрішньої енергії у програмі Avogadro (v 1.2.0) відповідно до алгоритму молекулярних силових полів Merck (MMFF94, 10000 ітерацій) та представлено у форматі *.pdb.

Докінг (параметри: вільна енергія зв'язку, внесок окремих типів взаємодій, середня енергія зв'язку) проводили на підставі даних силового поля з використанням 80 генерацій (generations) гнучких конформацій ліганду (аналіз 300 станів у кожній генерації, population size). Детекція центру зв'язування визначена параметрами локалізації референтного ліганду (целекоксиб або саліцилат); радіус центру зв'язування – 10 Å. Для рецептора брадикініну, в структурі якого не був наявний ліганд, проводили докінг по наявній

поверхні рецептора. Візуалізацію результатів докінгу виконано із застосуванням ресурсу ezCADD [9, 10].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Крім досліджуваної сполуки пропоксазепаму, для проведення процедури докінгу використано ряд сполук, що є відомими лігандами для обраних рецепторів/ензимів та були позитивним контролем (схема).

Основними показниками, що характеризують спроможність та ефективність зв'язування цих лігандів з макромолекулами, є загальна енергія зв'язування (ккал/моль), загальні енергії вандерваальсової взаємодії, водневого зв'язку й електростатичних взаємодій. У таблицях 1–3 наведено результати дослідження середньої енергії зв'язку між лігандами й амінокислотними залишками макромолекул ензими/рецептор.

Зв'язування лігандів з макромолекулами детально охарактеризовано на підставі аналізу амінокислотних залишків, що беруть участь у взаємодії та відповідній енергії зв'язку (табл. 4–6). При цьому наведено лише ті амінокислотні залишки, внесок яких у загальну енергію взаємодії сумарно перевищує 50 %. Окремо позначено амінокислотні залишки, здатні до взаємодії за рахунок як сильних водневих зв'язків, так і більш слабких вандерваальсових сил, оскільки така здатність сприяє ефективнішій взаємодії та утворенню комплексу макромолекула – ліганд.

Візуалізацію розташування сполук з відповідними макромолекулами здійснено за допомогою онлайн-ресурсу ezCADD (рис. 1–3).

Використані у дослідженні сполуки здебільшого мають різні місця зв'язування. Привертає увагу те, що у випадку ЦОГ-1 для пропоксазепаму виявлено місце зв'язування, розташоване на певній відстані від активного центру (див. рис. 1). У випадку ЦОГ-2 пропоксазепам, сумісно з ібупрофеном, також має місце зв'язування, що відрізняється від сайту взаємодії целекоксибу, кеторолаку й ацетилсаліцилату (див. рис. 2). Для брадикінінового рецептора сайт зв'язування пропоксазепаму є аналогічним до природного ліганду – брадикініну, тоді як додатково досліджені ліганди – антагоністи виявляють спорідненість до інших місць зв'язування (див. рис. 3).

Простагландини і лейкотрієни (продукти метаболізму арахідонової кислоти під впливом циклооксигеназ) та брадикінін (активний нонапептид кінінової групи, що утворюється калікреїнами) належать до найважливіших альгогенів, які модулюють больову чутливість. Найбільш поширеними серед анальгетиків, що гальмують активність циклооксигеназ та утворення простагландинів, є НПЗП. Брадикінінові рецептори, як

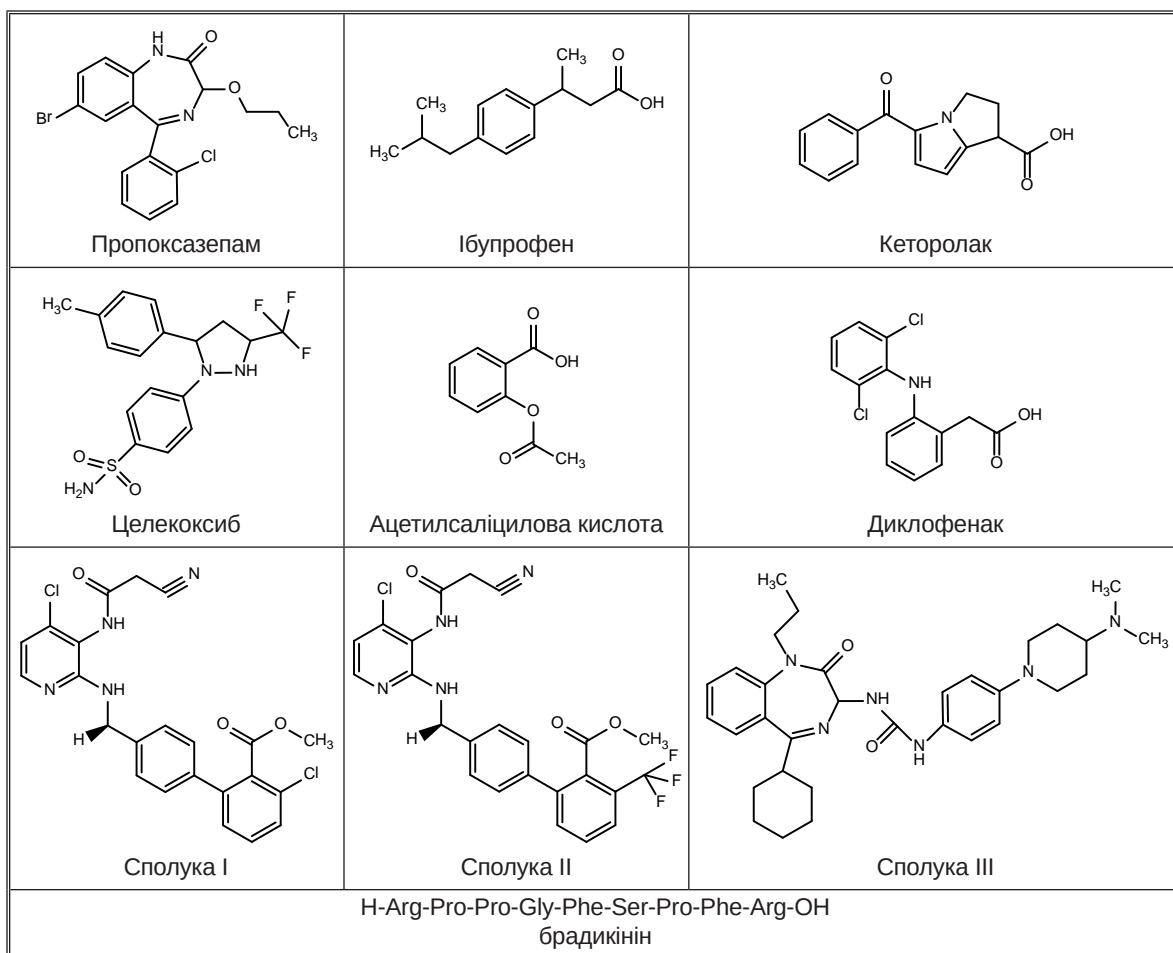


Схема. Структури сполук, використаних у дослідженні.

Таблиця 1 – Розрахована енергія взаємодії досліджуваних структур з активним центром циклооксигенази-1

Сполука	Параметр				
	загальна енергія взаємодії, ккал/моль	вандерваальсова взаємодія, ккал/моль	водневий зв'язок, ккал/моль	електростатична взаємодія, ккал/моль	середня енергія взаємодії, ккал/моль
Ацетилсаліцилат	-7,7	-6,9	-0,8	–	-3,4
Целекоксиб	-9,6	-8,5	-1,1	–	-2,7
Ібупрофен	-8,1	-7,3	-0,8	–	-3,6
Кеторолак	-9,6	-9,0	-0,6	–	-3,0
Пропоксазепам	-9,0	-9,0	–	–	-2,5
Диклофенак	-8,4	-7,7	-0,7	–	-3,0

Таблиця 2 – Розрахована енергія взаємодії досліджуваних структур з активним центром циклооксигенази-2

Сполука	Параметр				
	загальна енергія взаємодії, ккал/моль	вандерваальсова взаємодія, ккал/моль	водневий зв'язок, ккал/моль	електростатична взаємодія, ккал/моль	середня енергія взаємодії, ккал/моль
Ацетилсаліцилат	-6,9	-6,3	-0,6	–	-3,2
Целекоксиб	-9,5	-8,0	-1,5	–	-3,1
Ібупрофен	-6,9	-4,9	-2,0	–	-2,3
Кеторолак	-8,2	-7,2	-0,9	-0,2	-3,1
Пропоксазепам	-7,3	-7,1	-0,2	–	-1,9

Таблиця 3 – Розрахована енергія взаємодії досліджуваних структур з рецептором брадикініну

Сполука	Параметр				
	загальна енергія взаємодії, ккал/моль	вандерваальсова взаємодія, ккал/моль	водневий зв'язок, ккал/моль	електростатична взаємодія, ккал/моль	середня енергія взаємодії, ккал/моль
Сполука I	-10,6	-7,2	-3,4	–	-2
Сполука II	-10,7	-8,3	-2,4	–	-2,1
Сполука III	-9,7	-8,4	-1,3	–	-1,4
Брадикінін	-10,8	-7,7	-2,9	-0,2	-0,9
Пропоксазепам	-8,2	-7,6	-0,6	–	-2,3

Таблиця 4 – Внесок зв'язків окремих амінокислотних залишків у загальну енергію взаємодії досліджуваних сполук з активним центром циклооксигенази-1

Параметр	Сполука					
	кеторолак	целекоксиб	пропоса-зепам	диклофенак	ібупрофен	ацетил-саліцилат
Загальна енергія взаємодії, ккал/моль	-9,6	-9,6	-9	-8,4	-8,1	-7,8
Загальна енергія взаємодії з визначеними амінокислотними залишками, ккал/моль	-7,3	-7,1	-6,9	-6,6	-5,6	-5,4
Відсоток внеску взаємодії з визначеними амінокислотними залишками в загальну взаємодію, %	76,0	74,0	76,7	78,6	69,1	69,2
*H-HIS-90	-0,4	–	–	–	-0,4	-0,4
*H-HIS-95	–	–	–	-0,4	–	–
*H-TYR-385	–	-0,6	–	–	–	–
*H-ASN-515	–	–	–	-0,4	–	–
*H-SER-516	-0,3	–	–	–	-0,4	-0,5
*H-GLY-533	–	-0,4	–	–	–	–
V-ILE-89	–	–	-1,9	–	–	–
*V-HIS-90	-0,6	–	-0,1	-0,7	-0,2	-0,5
V-PHE-91	-0,3	–	–	-0,4	-0,4	0
V-THR-94	-1,4	–	–	-1,2	-1	-1,5
*V-HIS-95	-0,7	–	–	-0,9	-0,6	-0,3
V-LEU-115	–	–	-0,6	–	–	–
V-VAL-116	–	–	-0,6	–	–	–
V-VAL-119	–	–	-2	–	–	–
V-ARG-120	–	–	-0,9	–	–	–
V-GLN-192	-0,9	–	–	-0,3	-0,2	-0,3
V-PHE-205	–	-0,9	–	–	–	–
V-PHE-209	–	-0,9	–	–	–	–
V-VAL-344	–	-0,8	–	–	–	–
V-GLY-354	-0,6	–	–	-0,3	-0,4	-0,4
V-PHE-381	–	-1,3	–	–	–	–
*V-TYR-385	–	-0,4	–	–	–	–
V-HIS-513	-0,5	–	–	-0,4	-0,6	-0,1
V-PRO-514	-0,4	–	–	-0,5	-0,3	-0,2
*V-ASN-515	-0,9	–	–	-1	-0,6	-0,8
*V-SER-516	-0,3	–	–	-0,1	-0,5	-0,4
V-GLU-524	–	–	-0,8	–	–	–
V-SER-530	–	-0,9	–	–	–	–
*V-GLY-533	–	-0,9	–	–	–	–

Примітки. Тут і в таблицях 5, 6:

1. V – вандерваальсова взаємодія.

2. H – водневий зв'язок.

3. * – амінокислоти, здатні до вандерваальсової взаємодії та утворення водневого зв'язку.

Таблиця 5 – Внесок зв'язків окремих амінокислотних залишків у загальну енергію взаємодії досліджуваних сполук з активним центром циклооксигенази-2

Параметр	Сполука				
	целекоксиб	кеторолак	пропоса-зепам	ацетил-саліцилат	ібупрофен
Загальна енергія взаємодії, ккал/моль	-9,5	-8,2	-7,3	-6,9	-6,9
Загальна енергія взаємодії з визначеними амінокислотними залишками, ккал/моль	-6,3	-5,6	-4,3	-4,7	-4
Відсоток внеску взаємодії з визначеними амінокислотними залишками в загальну взаємодію, %	66,3	68,3	58,9	68,1	58,0
*H-HIS-90	-0,4	–	–	–	–
H-ARG-120	–	-0,7	–	–	–
H-VAL-344	–	–	–	–	-0,7
H-ILE-345	–	–	–	–	-0,4
H-GLU-346	–	–	–	–	-0,7
*H-LEU-352	-0,4	–	–	–	–
*H-SER-353	-0,4	–	–	–	–
*H-TYR-385	–	–	–	-0,3	–
H-SER-530	–	-0,2	–	-0,4	–
*V-HIS-90	-0,4	–	–	–	–
V-PHE-198	–	–	-0,4	–	-0,2
V-PHE-201	–	–	-0,6	–	-0,8
V-ASP-347	–	–	-1,1	–	-0,5
V-TYR-348	–	–	-0,7	–	-0,6
V-HIS-351	–	–	-1,5	–	-0,1
*V-LEU-352	-0,2	-0,6	–	-0,7	–
*V-SER-353	-1,2	0	–	-0,1	–
V-TYR-355	-0,2	-0,5	–	-0,1	–
*V-TYR-385	-0,3	-0,4	–	-0,5	–
V-TRP-387	-0,2	-0,2	–	-0,4	–
V-PHE-518	-0,6	-0,3	–	-0,5	–
V-VAL-523	-0,8	-0,6	–	-0,5	–
V-GLY-526	-0,6	-0,7	–	-0,7	–
V-ALA-527	-0,5	-0,9	–	-0,5	–
V-LEU-531	-0,1	-0,5	–	0	–

потенційна мішень для фармакотерапевтичного впливу з метою анальгезії, привертають увагу дослідників лише впродовж останніх десятиліть [11], а препарат "Ікатібант" уже використовують у клінічній практиці для лікування ангіоневротичного набряку.

При проведенні скринінгових досліджень встановлено, що пропосазепам проявив певний анальгетичний ефект на моделях карагенінового і зимозанового набряків та брадикінініндукованої альгезії [4, 12]. З огляду на це, можна припустити, що поряд з іншими механізмами реалізації периферичної анальгетичної дії пропосазепаму беруть також участь циклооксигенази та/або рецептори брадикініну. Для підтвердження вищевказаного проведено молекулярний докінг пропосазепаму як з рецептором брадикініну, так і з ЦОГ-1 та ЦОГ-2, які мають практично однакову молекулярну масу (70 і 72 кДа відповідно) з високим ступенем ідентич-

ності каталітичних сайтів. Важливою, з фармакологічної точки зору, відмінністю є те, що ЦОГ-1 у 523-му положенні молекули має більш гідрофобну амінокислоту ізoleyцин, а ЦОГ-2 містить валін.

З метою часткової валідації методу, крім пропосазепаму, для процедури докінгу використано структури відомих НПЗП (ацетилсаліцилова кислота, ібупрофен, кеторолак, диклофенак) та селективного блокатора ЦОГ-2 целекоксибу (див. табл. 1, 2). За величиною енергії взаємодії ацетилсаліцилова кислота й ібупрофен демонструють значно нижчий афінитет, ніж інші сполуки. Найефективніше із ЦОГ-1 та ЦОГ-2 зв'язуються целекоксиб (-9,6 і -9,5 ккал/моль відповідно) та кеторолак (-9,6 і -8,2 ккал/моль відповідно). Привертає увагу і те, що за величиною загальної енергії взаємодії пропосазепам з більшою ефективністю зв'язується із ЦОГ-1 (-9,0 ккал/моль), ніж із ЦОГ-2 (-7,3 ккал/моль).

Таблиця 6 – Внесок зв'язків окремих амінокислотних залишків у загальну енергію взаємодії досліджуваних сполук з рецептором брадикініну

Параметр	Сполука				
	брадикінін	сполука II	сполука I	сполука III	пропокса-зепам
Загальна енергія взаємодії, ккал/моль	-10,8	-10,7	-10,6	-9,7	-8,2
Загальна енергія взаємодії з визначеними амінокислотними залишками, ккал/моль	-6,1	-6,2	-6,5	-7,0	-3,7
Відсоток внеску взаємодії з визначеними амінокислотними залишками в загальну взаємодію, %	56,5	57,9	61,3	72,2	45,1
*H-GLN-68	–	–	–	-0,4	–
H-ARG-31	–	–	–	-0,7	–
H-ASP-206	-1,3	–	–	–	–
*H-SER-242	–	–	–	–	-0,3
H-PRO-194	–	–	-0,3	–	–
H-CYS-233	–	-0,7	-0,9	–	–
H-PHE-234	–	-0,4	-0,6	–	–
H-ILE-270	-0,7	–	–	–	–
H-VAL-276	–	-0,4	-0,4	–	–
H-SER-277	–	-0,7	-0,7	–	–
*H-PHE-278	–	-0,2	-0,4	–	–
*V-GLN-68	–	–	–	-0,7	–
V-GLN-149	–	–	–	-1	–
V-ARG-151	–	–	–	-1,1	–
V-ARG-152	–	–	–	-0,4	–
V-LYS-27	–	–	–	-0,8	–
V-GLN-28	–	–	–	-0,4	–
V-ARG-31	–	–	–	-1,5	–
V-GLU-207	-0,4	–	–	–	-0,6
V-ARG-208	-0,5	–	–	–	-1,2
V-ARG-209	-0,6	–	–	–	-0,7
V-GLU-235	-0,8	–	–	–	–
V-ASP-239	-0,6	–	–	–	-0,6
*V-SER-242	-0,2	–	–	–	-0,4
V-ARG-150	–	-0,6	-0,3	–	–
V-LEU-192	–	-0,4	-0,3	–	–
V-ALA-193	–	-0,7	-0,2	–	–
V-PRO-194	–	-1,2	-0,6	–	–
V-PHE-235	–	-0,2	-0,4	–	–
V-PRO-236	–	-0,3	-0,7	–	–
V-ASP-247	-0,4	–	–	–	–
*V-PHE-278	–	-0,4	-0,6	–	–

З досліджених сполук лише кеторолак здатний утворювати електростатичний зв'язок (в активному центрі ЦОГ-2), принаймні його внесок не є суттєвим. Загалом слабка вандерваальсова взаємодія робить значний внесок у зв'язування сполук як із ЦОГ-1 (див. табл. 1), так і з ЦОГ-2 (див. табл. 2) – від 85 до 95 %, при цьому максимальний внесок більш сильного водневого зв'язку відмічають лише для целекоксибу – до 15 % (див. табл. 2). Показовим є те, що пропоксазепам взаємодіє виключно за рахунок слабкої вандерваальсової взаємодії, тому можна при-

пустити, що його комплекс із ЦОГ-1 або ЦОГ-2 не буде стійким. Про це свідчить і той факт, що середня енергія зв'язків, які виникають, найменша для пропоксазепаму. Для селективного блокатора ЦОГ-2 целекоксибу величина середньої енергії зв'язку при створенні комплексу із цим ферментом найбільша – -3,1 ккал/моль (див. табл. 2), тоді як із ЦОГ-2 становить лише -2,7 ккал/моль. Разом із тим, такі неселективні блокатори, як ацетилсаліцилова кислота і кеторолак, мають досить високе значення середньої енергії зв'язку для обох типів циклооксигенази

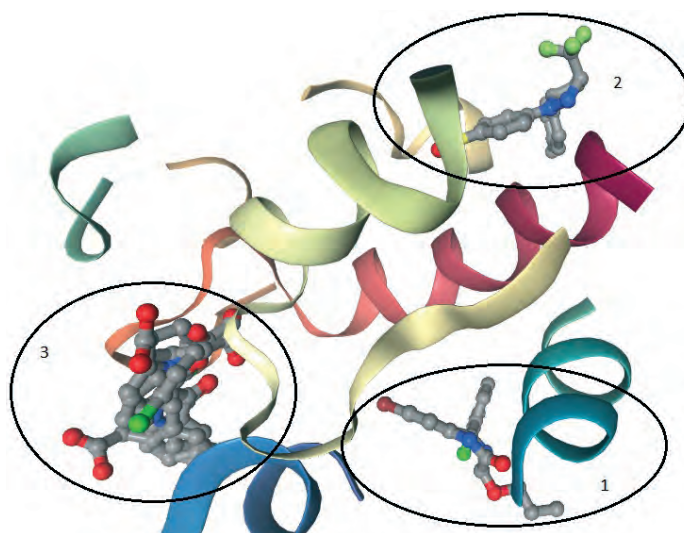


Рис. 1. Розташування досліджуваних сполук в активному центрі циклооксигенази-1: 1 – пропоксазепам; 2 – целекоксиб; 3 – кеторолак, ібупрофен та диклофенак.

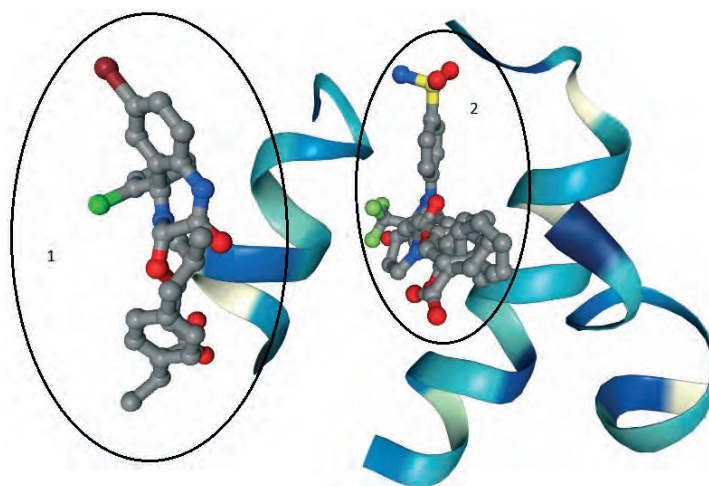


Рис. 2. Розташування досліджуваних сполук в активному центрі циклооксигенази-2: 1 – пропоксазепам та ібупрофен; 2 – кеторолак, целекоксиб й ацетилсаліцилат.

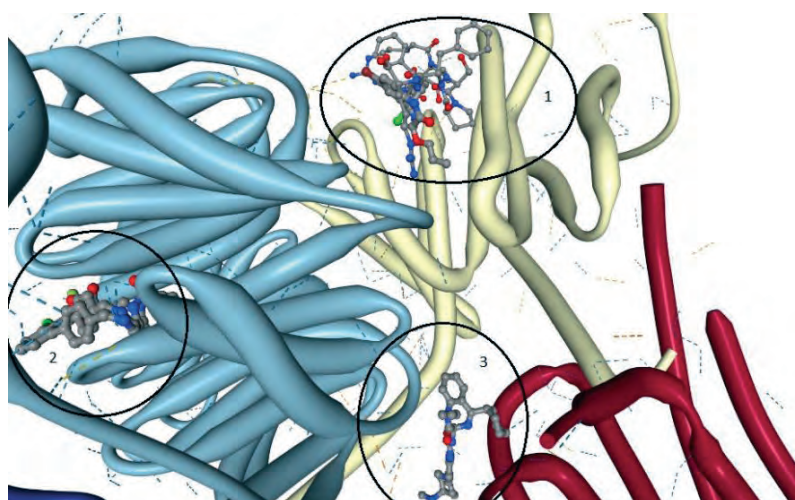


Рис. 3. Розташування досліджуваних сполук у рецепторі брадикініну: 1 – брадикінін та пропоксазепам; 2 – сполука I і сполука II; 3 – сполука III.

(див. табл. 1, 2). Імовірно, відсутністю значної взаємодії пропоксазепаму із циклооксигеназами можна пояснити той факт, що при його тривалому застосуванні не виникає уражень шлунково-кишкового тракту, що зазвичай є однією з побічних дій інгібіторів циклооксигеназ [13].

При візуалізації місць зв'язування досліджуваних сполук було виявлено існування декількох сайтів взаємодії, які різняться своїм розміщенням (див. рис. 1, 2). У випадку ЦОГ-1 кеторолак, ібупрофен та диклофенак фіксуються в спільному сайті зв'язування (див. рис. 1), тоді як целекоксиб і пропоксазепам мають інші, різні й розташовані на певній відстані, місця зв'язування (див. рис. 1). Беручи до уваги те, що кеторолак, ібупрофен та диклофенак ефективно блокують активність ЦОГ-1, можна припустити, що виявлені місця зв'язування для пропоксазепаму і целекоксибу є неспецифічними та сумнівними з функціональної точки зору. Щодо зв'язування кеторолаку, ібупрофену чи диклофенаку, то вони мають безпосередню пряму блокувальну дію.

Зв'язування сполук із ЦОГ-2 є більш своєрідним. Так, спільне місце зв'язування мають специфічний антагоніст целекоксиб та неспецифічний блокатор ацетилсаліцилат, а також потужний блокатор кеторолак. Ібупрофен, який також є ефективним блокатором ЦОГ, має спільне з пропоксазепамом окреме місце зв'язування. Втім слід відзначити, що воно локалізоване близько від першого місця та навіть залучає до взаємодії амінокислотні залишки однакового білкового домену (див. рис. 2).

Загалом зв'язки з активними центрами ЦОГ-1 та ЦОГ-2 утворюються за рахунок певних амінокислотних залишків, що, залежно від типу взаємодії, є унікальними для кожної зі сполук або їх груп (див. табл. 4, 5). Так, для ЦОГ-1 виявлено сім амінокислотних залишків, що здатні утворювати як водневий зв'язок, так і вандерваальсову взаємодію (див. табл. 4), при цьому HIS-90 та SER-516 беруть участь у взаємодії (водневий зв'язок) з кеторолаком, ібупрофеном й ацетилсаліцилатом. Навпаки, слабшу вандерваальсову взаємодію можна спостерігати зі значно більшою кількістю амінокислотних залишків, що є переважним у загальному процесі взаємодії. До утворення водневого зв'язку в ЦОГ-2 здатні дев'ять амінокислотних залишків (див. табл. 5), проте лише чотири з них (HIS-90, LEU-352, SER-353 та TYR-385) також взаємодіють за рахунок вандерваальсових сил. Як було зазначено раніше, при аналізі візуалізації взаємодій, амінокислотні залишки ЦОГ-2 утворюють своєрідні кластери, що зумовлюють взаємодію у двох центрах, один з яких фіксує пропоксазепам та

ібупрофен, а другий – кеторолак, целекоксиб та ацетилсаліцилат.

Таким чином, взаємодія сполук із ЦОГ-2 має більш виразний специфічний характер на відміну від ЦОГ-1 і дає можливість припустити, що взаємодія пропоксазепаму з місцем, близьким до активного центру в ЦОГ-2, деякою мірою впливає на активність цього ензиму.

Антагоністи брадикінінових рецепторів розглядають як перспективні анальгетики [1, 10]. Можливість похідних 1,4-бенздіазепіну взаємодіяти з брадикініновими рецепторами пов'язують із просторовою структурою їх гетероциклу, яка подібна до β -згину брадикініну, вони проявляють афінитет до брадикінінових рецепторів [5, 10]. Брадикінінові рецептори представлені двома типами – V1 та V2, з яких V2-рецептор постійно експресується в багатьох органах і тканинах, тоді як V1-рецептор є "мовчазним" та зазвичай відсутній у здоровому організмі й експресується при ураженнях, інфекціях або за умов вивільнення цитокінів і факторів росту, тобто при патологічних станах. Зв'язування агоніста з V1-рецептором брадикініну викликає (або стабілізує) конформаційні зміни, які дозволяють рецептору взаємодіяти з G-білками й активувати їх [10]. Активація V1-рецептора пов'язана з передачею різних больових відчуттів, а індуцибельний характер його експресії передбачає участь переважно у формуванні хронічного болю. Саме тому цей тип рецептора привертає увагу як потенційна мішень для фармакотерапевтичного впливу нових анальгетиків [7, 14].

Брадикінін є ендogenousним лігандом брадикінінових рецепторів, тому його було обрано позитивним контролем. Додатково до процесу докінгу використано похідні діамінопіридину, позначені як сполуки I та II (див. схему). Вони мають значний афінитет до V1-рецептора (K_i 0,7 і 0,4 нМ) та протизапальну дію на моделі набряку, викликаного введенням ліпополісахариду, в кролів з ED_{50} (0,80±0,06) та (0,57±0,04) мг/кг відповідно [11]. Сполука III є похідним 1,4-бенздіазепіну (див. схему), для неї також було встановлено афінитет до V1-рецептора (K_i 28 нМ).

З досліджуваних сполук брадикінін, як ендogenousний ліганд, виявляє найбільшу (-10,8 ккал/моль) загальну енергію взаємодії з брадикініновими рецепторами (див. табл. 3). Для похідних діамінопіридину загальна енергія взаємодії незначно відрізняється від брадикініну (-10,6 і -10,7 ккал/моль для сполук I та II відповідно). З усіх зазначених сполук лише брадикінін має здатність до електростатичної взаємодії, що зумовлено його пептидною природою та частковою іонізацією. Усе ж загальна взаємодія брадикініну з рецептором забезпечується вандерваальсовими си-

лами (-7,7 ккал/моль, 71 %) за рахунок наявності в його структурі залишків фенілаланіну (див. схему). Похідні 1,4-бенздіазепіну (сполука III та пропоксазепам) мають найменшу загальну енергію взаємодії (-9,7 і -8,2 ммкал/моль відповідно), а частка вандерваальсової взаємодії становить 86–92 %. Проте значна кількість слабких взаємодій не виключає досить вигідного, з енергетичної точки зору, утворення стійких зв'язків. Пропоксазепам, незважаючи на низьке значення загальної енергії взаємодії, демонструє найвище значення середньої енергії зв'язків і становить -2,3 ккал/моль (див. табл. 3), що може бути показником утворення більш сталої взаємодії з молекулою рецептора.

Брадикініновий рецептор належить до трансмембранних протеїнів і містить сім структурних елементів (доменів), тому в процесі докінгу було застосовано всю молекулу, що дозволило отримати інформацію про можливі, найбільш належні, з енергетичної точки зору, місця зв'язування для лігандів. Шляхом візуалізації результатів докінгу встановлено наявність декількох місць зв'язування та їх селективність залежно від типу ліганду (див. рис. 3). Так, похідні діамінопіридину (сполуки I і II) продемонстрували афінитет до окремого та селективного сайту, тоді як похідні 1,4-бенздіазепіну (сполука III та пропоксазепам) виявили тенденцію до зв'язування з окремими сайтами (див. рис. 3). Неочікуваним виявився той факт, що місце зв'язування пропоксазепаму збіглось із місцем зв'язування брадикініну, яке розташоване на іншому, більш віддаленому домені. Ймовірно, саме це місце зв'язування відповідає функційному "активному центру" (взаємодія з природним ендogenousним лігандом) та саме за рахунок такої взаємодії можуть ефективно реалізовуватись потенційні антагоністичні ефекти пропоксазепаму.

Як уже було зазначено, для пропоксазепаму розраховано найбільшу середню енергію зв'язку (див. табл. 3), а при аналізі амінокислотних залишків, що беруть участь у цій взаємодії, визначено принаймні п'ять (GLU-207, ARG-208, ARG-209, ASP-239 та SER-242), що також беруть участь у фіксації брадикініну. Дані амінокислотні залишки є досить полярними, однак помітно, що взаємодія з пропоксазепамом є більш сильною через основні (аргінін), ніж через кислотні

залишки (аспарагінова кислота) (див. табл. 6). Загалом взаємодія пропоксазепаму із цими амінокислотними залишками ефективніша з енергетичної точки зору, ніж брадикініну, тому цілком можлива навіть конкуренція між ними.

На підставі отриманих даних молекулярного докінгу з трьома ключовими макромолекулами, які беруть участь у периферичних механізмах розвитку больових відчуттів, можна зробити висновок, що пропоксазепам недостатньо взаємодіє з ключовим ферментом синтезу простагландинів – ЦОГ-1 (утворюються переважно слабкі вандерваальсові зв'язки, а виявлені місця взаємодії є неспецифічними). Середня енергія зв'язків, порівняно з референтними сполуками (ацетилсаліцилат, кеторолак, диклофенак, цефексоксиб), найменша для пропоксазепаму. Взаємодія із ЦОГ-2 може бути малоефективною, оскільки місця зв'язування локалізовані близько від активного центру та залучають амінокислотні залишки однакового домену. Імовірно є антагонізм при взаємодії з брадикініновим рецептором I типу, що підтверджується однаковими місцями зв'язування з ендogenousним лігандом – брадикініном та високим значенням середньої енергії зв'язку. Підтвердженням зазначеного можуть бути дані [15] щодо функціональної активності пропоксазепаму в тензометричних дослідах із пригнічення викликаних брадикініном скорочень гладеньких м'язів шлунка щура ($pK_b=6,41$), що також дозволяє віднести цю сполуку до можливих антагоністів брадикінінових рецепторів.

ВИСНОВКИ. Пропоксазепам недостатньо взаємодіє з ключовим ферментом синтезу простагландинів – циклооксигеназою-1 (утворюються переважно слабкі вандерваальсові зв'язки, а виявлені місця взаємодії є неспецифічними). Взаємодія із циклооксигеназою-2 може бути малоефективною, оскільки місця зв'язування локалізовані близько від активного центру та залучають амінокислотні залишки однакового домену. Імовірно є антагонізм при взаємодії з брадикініновим рецептором 1 типу, що підтверджується однаковими місцями зв'язування з ендogenousним лігандом – брадикініном та високим значенням середньої енергії зв'язку.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Garavito R. M. The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins / R. M. Garavito, D. L. DeWitt // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1999. – **1441** (2–3). – P. 278–287.
2. Dray A. Bradykinin and inflammatory pain / A. Dray, M. Perkins // *Trends Neurosci.* – 1993. (3). – P. 99–104.
3. Pethő G. Bradykinin-induced nociceptor sensitization to heat is mediated by cyclooxygenase products in isolated rat skin / A. Pethő, A. Derow, P. W. Reeh. *Eur. J. Neurosci.* – 2001. – **14**. – P. 210–218.
4. Головенко М. Я. Пропоксазепам – новаторський анальгетичний засіб, що гальмує гострий та хронічний біль і має полімодальний механізм дії / М. Я. Головенко // *Вісн. Нац. акад. наук України.* – 2021. – № 4. – С. 76–90.
5. Evidence for the involvement of the GABA-ergic pathway in the anticonvulsant and antinociception activity of Propoxazepam in mice and rats / M. Golovenko, A. Reder, S. Andronati, V. Larionov // *J. Pre-Clin. Clin. Res.* – 2019. – **13** (3). – P. 99–105.
6. Фармакологічний аналіз нейрохімічних антиноцицептивних механізмів дії пропоксазепаму / Н. І. Волощук, А. С. Редер, М. Я. Головенко [та ін.] // *Фармакологія та лікар. токсикологія.* – 2017. – № 1. – С. 3–11.
7. Yang J.-M. "GEMDOCK: A generic evolutionary method for molecular docking" / J.-M. Yang, C.-C. Chen // *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics.* – 2004. – **55**. – P. 288–304.
8. Consensus scoring criteria for improving enrichment in virtual screening / J.-M. Yang, Y.-F. Chen, T.-W. Shen [et al.] // *J. Chem. Inf. Model.* 2005. – **45** (4). – P. 1134–1146.
9. ezCADD: A Rapid 2D/3D visualization-enabled web modeling environment for democratizing computer-aided drug design / A. Tao, Y. Huang, Y. Shinohara [et al.] // *Journal of Chemical Information and Modeling.* 2019. – **59** (1). – P. 18–24.
10. <http://dxulab.pharmacy.isu.edu/curry/ezCADD/main.html>
11. Kuduk S. D. Bradykinin B1 receptor antagonists as novel analgesics: a retrospective of selected medicinal chemistry developments / S. D. Kuduk, M. G. Bock // *Curr. Top Med. Chem.* – 2008. – **8** (16). – P. 1420–1430.
12. Antinociception induced by a novel benzodiazepine receptor agonist and bradykinin receptor antagonist in rodent acute and chronic pain models / N. Ya. Golovenko, N. I. Voloshchuk, S. A. Andronati [et al.] // *European Journal of Biomedical and Biopharmaceutical Sciences.* – 2018. – **5**, 12. – P. 79–88.
13. Experimental study of ulcerogenic action of propoxazepam / N. I. Voloshchuk, I. V. Taran, A. S. Reder, M. Ya. Golovenko // *Reports of Vinnytsia National Medical University.* – 2018. – **22**. – P. 6–9.
14. Bradykinin receptors and their antagonists / D. Regoli, S. Nsa Allogho, A. Rizzi, F. J. Gobeil // *Eur. J. Pharmacol.* 2019. – **348** (1). – P. 1–10.
15. Effect of 3-arylamino-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-ones on the bradykinin-induced smooth muscle contraction / P. A. Virych, O. V. Shelyuk, T. A. Kabanova [et al.] // *Regulatory Mechanisms in Biosystems.* – 2017. – **8** (1). – P. 30–35.

REFERENCES

1. Garavito, R.M., & DeWitt, D.L. (1999). The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1441 (2-3), 278-287.
2. Dray, A., & Perkins M. (1993) Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci.* (3), 99-104.
3. Pethő, G., Derow, A., & Reeh, P.W. (2001). Bradykinin-induced nociceptor sensitization to heat is mediated by cyclooxygenase products in isolated rat skin. *Eur. J. Neurosci.*, 14, 210-218.
4. Hopovenko, M.Ya. (2021). Propoxazepam – an innovative analgesic that inhibits acute and chronic pain and has a polymodal mechanism of action. *Bulletin of the Nat. Acad. of Sciences of Ukraine*, 4, 76-90 [in Ukrainian].
5. Golovenko, M., Reder, A., Andronati, S., & Larionov, V. (2019). Evidence for the involvement of the GABA-ergic pathway in the anticonvulsant and antinociception activity of Propoxazepam in mice and rats. *J. Pre-Clin. Clin. Res.*, 13 (3), 99-105.
6. Voloshchuk, N.I., Reder, A.S., & Holovenko, M.Ya. (2017). Pharmacological analysis of neurochemical antinociceptive mechanisms of action of propoxazepam. *Pharmacology and Physician. Toxicology*, 1, 3-11 [in Ukrainian].
7. Yang, J.-M., & Chen, C.-C. (2004). GEMDOCK: A generic evolutionary method for molecular docking. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 55, 288-304.
8. Yang, J.-M., Chen, Y.-F., Shen, T.-W., Kristal, B.S., Hsu, D.F. (2005). Consensus scoring criteria for improving enrichment in virtual screening. *J. Chem. Inf. Model.*, 45 (4), 1134-1146.
9. Tao, A., Huang, Y., Shinohara, Y., Caylor, M.L., Pashikanti, S., & Xu, D. (2019). ezCADD: A rapid 2D/3D visualization-enabled web modeling environment for democratizing computer-aided drug design. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 59 (1), 18-24.
10. <http://dxulab.pharmacy.isu.edu/curry/ezCADD/main.html>
11. Kuduk, S.D., & Bock, M.G. (2008). Bradykinin B1 receptor antagonists as novel analgesics: a retrospective of selected medicinal chemistry developments. *Curr. Top Med. Chem.*, 8 (16), 1420-1430.
12. Golovenko, N.Ya., Voloshchuk, N.I., Andronati, S.A., Taran, I.V., Reder, A.S., Pashynska, O.S., & Larionov, V.B. (2018). Antinociception induced by a novel benzodiazepine receptor agonist and bradykinin receptor antagonist in rodent acute and chronic pain models. *European Journal of Biomedical and Biopharmaceutical Sciences*, 5, 12, 79-88.
13. Voloshchuk, N.I., Taran, I.V., Reder, A.S., & Golovenko, M.Ya. (2018). Experimental study of ulcerogenic

action of propoxazepam. *Reports of Vinnytsia National Medical University*, 22, 6-9.

14. Regoli, D., Nsa Allogho, S., Rizzi, A., & Gobeil F.J. (1998). Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur. J. Pharmacol.*, 348 (1), 1-10.

15. Virych, P.A., Shelyuk, O.V., Kabanova, T.A., Khalimova, O.I., Martynyuk, V.S., Pavlovsky, V.I., & Andronati, S.A. (2017). Effect of 3-arylamino-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-ones on the bradykinin-induced smooth muscle contraction. *Regulatory Mechanisms in Biosystems.*, 8 (1), 30-35.

V. B. Larionov¹, A. S. Akisheva², M. Ya. Holovenko¹, O. A. Makarenko², I. Yu. Borysiuk³
A. V. BOHATSKYI PHYSICAL-CHEMICAL INSTITUTE OF NAS¹, ODESA
I. I. MECHNYKOV ODESA NATIONAL UNIVERSITY²
ODESA NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY³

PROSTAGLANDIN AND BRADYKININ MECHANISMS OF ANALGESIC AND ANTI-INFLAMMATORY ACTION OF PROPOXAZEPAM: MOLECULAR DOCKING DATA

Summary

Introduction. Prostaglandins and bradykinin are important compounds involved in the onset and transmission of pain. Innovative drug propoxazepam, created at the Institute of Physical Chemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine and SLC "INTERCHEM" has an original pharmacodynamic profile, as it simultaneously inhibits acute and chronic pain with components of anti-inflammatory and anticonvulsant action.

The aim of the study – to learn the possibility of propoxazepam interaction with cyclooxygenases I and II and the bradykinin receptor based on the results of molecular docking.

Research Methods. The molecular docking procedure was performed using iGEMDOCK v2.1, the structure of the compounds was optimized for the internal energy (Avogadro (v 1.2.0) and presented in *.pdb format).

Results and Discussion. The values of free energy of interaction of propoxazepam and some reference compounds with macromolecules of COX I, COX II and bradykinin were calculated, and the amino acid residues involved in these processes were determined. The interaction energy of propoxazepam with COX I and COX II was found to be lower than for other reference compounds. The average binding energy of COX I compared to the reference compounds (acetylsalicylate, ketorolac, diclofenac, celecoxib) is the lowest for propoxazepam.

Conclusions. Based on the obtained molecular docking data, it can be concluded that propoxazepam does not interact sufficiently with the key enzyme of prostaglandin synthesis – COX I (mostly weak Van-der-Waals bonds are formed, and the identified sites of interaction are nonspecific). Interaction with COX II may be ineffective because the binding sites are located close to the active site and involve amino acid residues of the same domain. Antagonism with interaction with the type 1 bradykinin receptor is likely, as evidenced by the same binding sites for the endogenous ligand bradykinin and the high mean binding energy.

KEY WORDS: cyclooxygenase; bradykinin; molecular docking; propoxazepam; analgesic; anti-inflammatory action.

Отримано 10.02.22

Адреса для листування: М. Я. Головенко, Фізико-хімічний інститут імені О. В. Богатського НАН України, вул. Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна, e-mail: n.golovenko@gmail.com.