

М. Я. Головенко, В. І. Павловський, І. П. Валіводзь, В. Б. Ларіонов
ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМЕНІ О. В. БОГАТСЬКОГО НАН УКРАЇНИ, ОДЕСА

НАПІВЕМПІРИЧНИЙ АНАЛІЗ ВЗАЄМОДІЇ АЛКОКСИПОХІДНИХ 1,4-БЕНЗДІАЗЕПІНУ З ГАМК_A-РЕЦЕПТОРОМ НА ПІДСТАВІ ДАНИХ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКІНГУ ТА ФАРМАКОЛОГІЧНОГО ЕФЕКТУ

Вступ. У фармакологічному спектрі 3-алкоксипохідних 1,4-бенздіазепіну, на відміну від класичних представників, значно більш виражені анальгетичні властивості, але навіть серед синтезованих та вивчених представників є сполуки з різною величиною цього ефекту.

Мета дослідження – оцінити параметри молекулярного докінгу теоретично згенерованих структур алкоксипохідних 1,4-бенздіазепіну з ГАМК_A-рецепторним комплексом та зіставити ці дані з показниками фармакологічної активності синтезованих сполук.

Методи дослідження. Процедуру молекулярного докінгу було проведено за допомогою програми iGEMDOCK v2.1, оптимізовано структури вже синтезованих і теоретично запропонованих молекул, що різняться замісниками в ортоположенні фенільного радикала та положенні 7 конденсованої системи і згенеровані у програмі Avogadro (v 1.2.0). Середні ефективні дози сполук за антагонізмом з коразолом (120 мг/кг підшкірно через 30 хв після введення сполуки) вивчали на білих мишах.

Результати й обговорення. Енергія зв'язку всіх згенерованих структур перебуває в межах 81,6–96,8 ккал/моль. Аналіз показників віртуального докінгу заміщених алкоксипохідних дозволяє виділити декілька місць зв'язування, характерних для 7-хлор- або 7-бромзаміщених похідних бенздіазепіну. Найбільший вплив на зв'язування хлорзаміщених алкоксипохідних мають ділянки з високою полярністю амінокислот (16-23 Д) і близькими показниками гідрофільності та гідрофобності. Внесок вандерваальсових та водневих взаємодій у загальну енергію зв'язку визначається наявністю галогену (хлору чи бром). В тесті антагонізму з коразолом найактивнішими виявились сполуки, що містять хлорфенільний замісник у гетерокільці, – (0,42±0,10) мкмоль/кг для пропілоксипохідного та (0,51±0,17) мкмоль/кг для етилоксипохідного, тоді як для сполук з фенільним радикалом величина ED₅₀ за цим тестом майже на порядок вища – (5,1±2,7) і (17,75±1,93) мкмоль/кг відповідно.

Висновок. Анальгетичний ефект переважно зумовлений можливістю зв'язування алкоксипохідних із центром, що містить залишки основних амінокислот.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: молекулярний докінг; алкоксипохідні 1,4-бенздіазепіну; протисудомна дія; анальгетична дія.

ВСТУП. Значним досягненням біоінформатики є розробка методу докінгу, за допомогою якого стало можливим оцінити зв'язування з біологічними мішенями (рецептори, ензими, нуклеїнові кислоти тощо) низькомолекулярних хімічних сполук з метою їх скринінгу та характеристики комплексу ліганд – рецептор. Така інформація особливо цінна, коли у вибірці, яку вивчають, наявні сполуки з відомими біологічними властивостями, оскільки вони можуть відігравати роль референтів для валідації відповідних процедур. З іншого боку, навіть для близьких за структурою сполук, які за процедурою молекулярного докінгу мають різні параметри чи локалізацію зв'язування, може бути характерний

© М. Я. Головенко, В. І. Павловський, І. П. Валіводзь, В. Б. Ларіонов, 2017.

різний спектр фармакологічної активності, що визначає напрямок подальших досліджень із більш перспективними сполуками [1, 2].

Серед похідних 1,4-бенздіазепіну існує багато сполук із різним співвідношенням між компонентами фармакологічного спектра, що зумовлено наявністю замісників у окремих положеннях їх молекули. З огляду на це, експериментальний факт поєднання високої анальгетичної активності деяких алкоксипохідних [3] та відсутність побічних дій у дозах, при яких даний ефект спостерігають, привертають увагу і потребують вивчення. Для одного з представників – пропілоксипохідного (пропоксазепам), поряд з його високою анальгетичною активністю [3], було продемонстровано здатність блокувати розвиток судом, викликаних введенням різних фармакологічних

аналізаторів-блокаторів ГАМК_A-рецептора (коразол, пікротоксин, тіосемікарбазид) [4, 5] та частково гліцинового рецептора (стрихнін) [6].

Етерна група, за допомогою якої алкоксильний радикал з'єднується зі структурою 1,4-бенздіазепіну, є досить стабільною з хімічної точки зору, тому можна вважати, що цей фрагмент сприяє прояву анальгетичної дії. Оскільки для етоксипохідного, що близький за структурою до пропоксазепаму, анальгетичний ефект виражений меншою мірою, постає питання про баланс впливу алкоксильного радикала та атомів галогенів на здатність і локалізацію зв'язування окремих сполук з ГАМК_A-рецепторним комплексом (ГАМК_A-РК).

Тому метою дослідження було оцінити параметри молекулярного докінгу теоретично згенерованих структур алкоксипохідних 1,4-бенздіазепіну з ГАМК_A-РК та зіставити ці дані з показниками фармакологічної активності синтезованих сполук.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Процедуру молекулярного докінгу було проведено за допомогою програми iGEMDOCK v2.1 [7, 8] з використанням структури ГАМК_A-РК (GABA(A)R-beta3 гомопентамер, 4COF), отриманої з бази даних біологічних макромолекул [(<http://www.rcsb.org/>)]. Структури лігандів (етокси- та пропілоксипохідні 1,4-бенздіазепіну) оптимізовано за величиною внутрішньої енергії у програмі Avogadro (v 1.2.0). Аналіз порожнин та взаємного положення амінокислотних залишків у активних центрах здійснювали на основі програми Mole 2.13.9.6.

Експерименти на тваринах (білих безпородних мишах обох статей) було проведено відповідно до міжнародних та національних біоетичних рекомендацій (Директива Європейського Союзу 2010/10/63 EU про дотримання законів, постанов та адміністративних положень держав ЄС з питань захисту тварин, що використовуються для експериментальної та іншої наукової мети). Миші перебували на стандартній лабораторній дієті при природному світловому циклі з вільним доступом до води та їжі.

Протисудомну дію синтезованих сполук оцінювали на мишах за величиною захисної дії (відносна кількість тварин, що вижили), яку реєстрували протягом 2 год після введення судомного агента (коразол, 120 мг/кг, підшкірно через 0,5 год після введення сполук). Досліджувані сполуки вводили внутрішньочеревно у твіновій емульсії в дозах, що забезпечують розвиток 20–90 % захисного ефекту. Летальний ефект оцінювали в альтернативній формі, за кількістю тварин, які вижили в експериментальних групах. Первинні експериментальні дані корегували за

методом Баренса та обчислювали пробіт-методом [9]. Вірогідність різниці між відповідними показниками контрольної та експериментальної груп оцінювали за критерієм Стьюдента і методами непараметричної статистики (критерій Уїлкоксона–Манна–Уїтні [10]).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Похідні з естерним зв'язком у положенні 3 гетерокільця є субстратами естераз, тому в організмі експериментальних тварин піддаються швидкому гідролізу [11] з утворенням активних 3-гідроксипохідних. Навпаки, етерний зв'язок значно стабільніший, а елімінація цього замісника переважно відбувається за рахунок окиснювального дезалкілювання [12]. Тому слід вважати, що саме замісники з етерним зв'язком мають провідний вплив на прояв анальгетичного компонента у фармакологічному спектрі алкоксипохідних 1,4-бенздіазепіну. З огляду на принципи рецепторної теорії розвитку біологічної відповіді, можна передбачити, що наявність саме алкоксильного замісника визначає афінитет зазначених похідних 1,4-бенздіазепіну до певних центрів зв'язування алостеричних ділянок ГАМК_A-РК. Водночас є визнаною кореляція між наявністю тих чи інших замісників з активністю молекули. Так, введення електроноакцепторних замісників у положення 7 гетерокільця призводить до підвищення активності, а електронодонорних – до зниження. Втім така закономірність не є однозначною щодо різних видів фармакологічної дії, що, ймовірно, зумовлено різницею в механізмах відповідних ефектів [13–15]. Це визначає необхідність аналізу структури алкоксипохідних з метою визначення та характеристики загальних принципів, що сприяють прояву власне анальгетичного ефекту, який притаманний представникам даного ряду. Такий підхід можна здійснити за допомогою молекулярного докінгу, перевагою якого є аналіз не тільки реальних, а навіть і віртуальних структур.

Для процедури молекулярного докінгу було згенеровано низку близьких структур етокси- та пропоксипохідних 1,4-бенздіазепіну, що різняться замісниками в ортоположенні фенільного замісника та положенні 7 гетероциклу (табл. 1).

Після оптимізації структур цих сполук за величиною внутрішньої енергії (з метою генерації найбільш вірогідних конформерів) було проаналізовано параметри їх можливого зв'язування з ГАМК_A-РК з метою визначення таких характеристик, як енергія зв'язку, внесок вандерваальсових та водневих зв'язків, участь певних амінокислотних залишків у формуванні даних зв'язків, об'єм та розмір порожнин у структурі рецептора.

Таблиця 1 – Структури хлор- та бромзаміщених алкоксипохідних 1,4-бенздіазепіну

Номер	R ₁	R ₂	R ₃	ЕД ₅₀ , "оцтовокислі корчі", мкмоль/кг, миші	ЕД ₅₀ , антагонізм з коразолом, мкмоль/кг, миші
I	-Br	-C ₂ H ₅	-Cl	0,79±0,23	0,51±0,1
II	-Br	-C ₃ H ₇	-Cl	0,074±0,017	0,42±0,10
III	-Br	-C ₂ H ₅	-H	1,39±0,42	15,1±2,7
IV	-Br	-C ₃ H ₇	-H	0,134±0,043	17,75±1,93
V	-Cl	-C ₂ H ₅	-Cl	–	–
VI	-Cl	-C ₃ H ₇	-Cl	–	–
VII	-Cl	-C ₂ H ₅	-H	–	–
VIII	-Cl	-C ₃ H ₇	-H	–	–

Енергія зв'язку всіх згенерованих структур перебуває в межах 81,6–96,8 ккал/моль, що свідчить про незначний вплив розташування атомів галогену на загальну енергію утворення комплексу ліганд – рецептор. Для жодної з вивчених структур не виявлено електростатичних сил, здатних формувати хімічні зв'язки, оскільки не мають полярних груп та замісників, схильних до іонізації. Щодо вандерваальсової взаємодії та водневого зв'язку, то їх внесок у створення комплексу ліганд – ГАМК_A-ПК становить 85,3–96,3 і 3,6–14,6 % відповідно. Зазначену різницю для відносно близьких за структурою сполук можна пояснити розміром атомів галогенів та пов'язаною із цим здатністю до поляризації, що впливає на формування вандерваальсових сил.

Методом докінгу візуально визначено три місця зв'язування зазначених бенздіазепінів (рис. 1) з амінокислотними залишками, розташованими майже на поверхні рецептора між поліпептидними ланцюгами ГАМК_A-ПК з формуванням лише однієї порожнини, в якій фіксуються переважно алкоксипохідні, що містять атом хлору в положенні 7 молекули (сполуки V–VIII). Винятком є тільки структура етоксоzepаму з ортохлорфенільним замісником (I), загальна енергія зв'язків для якого в цьому місці становить 36,67 ккал/моль (табл. 2). Оскільки здебільшого даний центр представлений залишками полярних амінокислот (Glu, Tyr, Thr), найімовірнішим є провідний внесок власне водневого зв'язку при утворенні комплексу рецептор – сполука. Дійсно, для хлорзаміщених сполук загальний внесок

водневого зв'язку становить від 11 до 14 %, лише для о-хлорфеніл етоксаzepаму (I) цей показник складає тільки 3,6 %. Таким чином, наявність атома хлору в положенні 7 бенздіазепінового кільця визначає однакове місце зв'язування для сполук із близькою структурою.

Орієнтація алкоксипохідних бенздіазепіну у визначених центрах також має суттєву різницю (рис. 2), як було встановлено за допомогою візуалізації результатів молекулярного докінгу. За локалізацією місць зв'язування ці структури згрупували в три окремих кластери (табл. 2). Так, у першому кластері сполук, що представлений здебільшого хлорпохідними (табл. 1, 2), зв'язування відбувається без зберігання відповідності орієнтації окремих замісників (атоми галогену, алкоксильний радикал, фенільне кільце в поло-

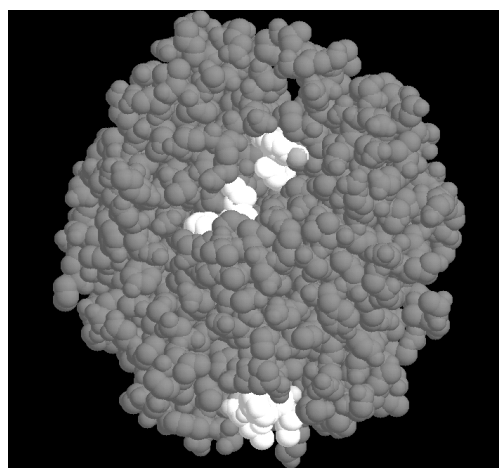


Рис. 1. Схематичне зображення місць зв'язування алкоксипохідних з ГАМК_A-рецепторним комплексом.

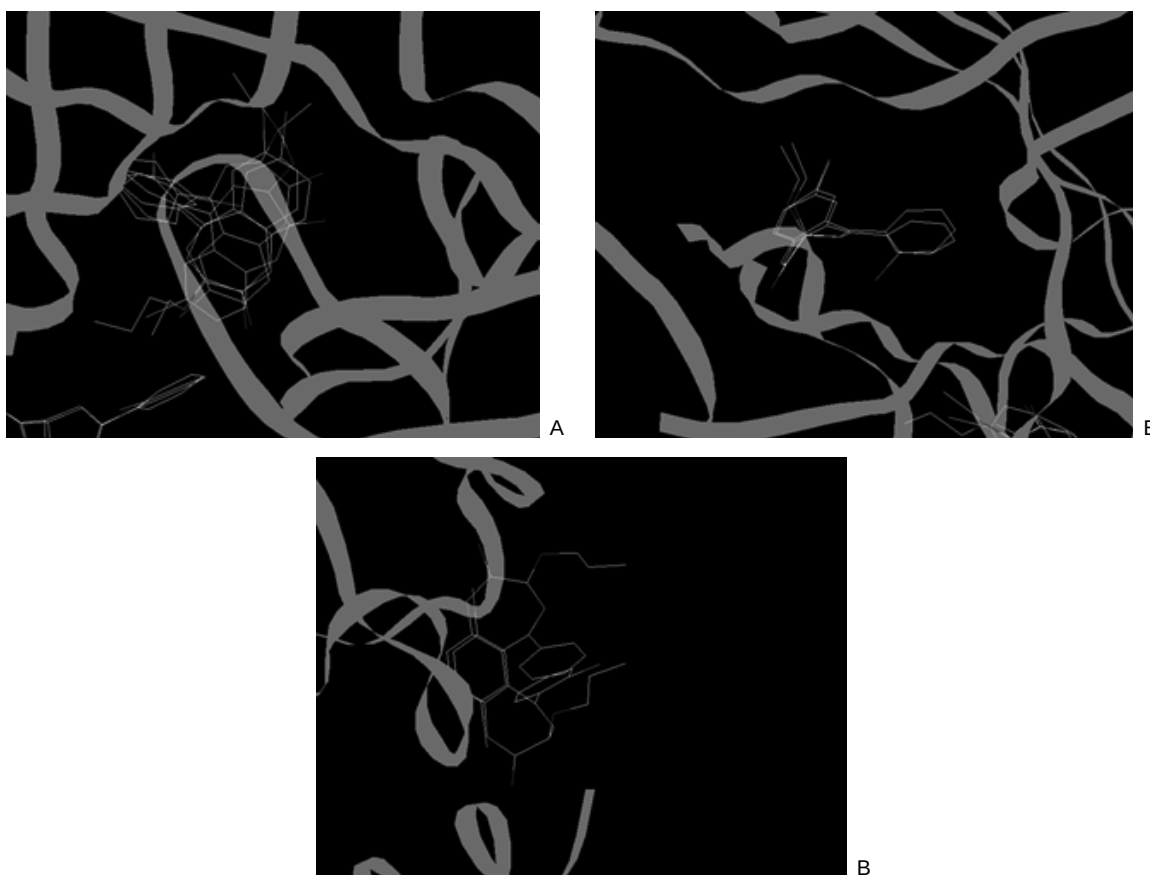


Рис. 2. Схематична орієнтація структур алкоксипохідних бенздіазепіну на ГАМК_A-рецепторному комплексі: А, Б, В – перший, другий і третій кластери відповідно.

женні 5) (рис. 2, А). Навпаки, структурам другого кластера, до яких належать етоксипохідні, притаманна висока відповідність розташування у просторі цього місця зв'язування (рис. 2, Б) із майже однаковою орієнтацією атомів кисню (карбонілу та етерної групи) і хлору в положенні 7. Незвичним на перший погляд є розташування елементів третього кластера (сполуки II та IV, рис. 2, В), для яких, імовірно, зв'язування відбувається переважно за рахунок ароматичної структури конденсованого з гетероциклом бензольного кільця.

Локалізація переважного місця зв'язування 7-бромзаміщених сполук (I–IV) відрізняється від 7-хлорзаміщених (V–VIII). Наявність атома бром у положенні 7 та алкоксильного замісника у положенні 3 є більш впливовим фактором, ніж хлору у фенільному. Таку відмінність можна пояснити насамперед різницею в розмірах атомів хлору і бром, завдяки чому хлорпохідні з більшою вірогідністю можуть потрапляти у порожнину та утворювати зв'язки із залишками полярних амінокислот. Однак фіксація бромпохідних також відбувається за рахунок залишків полярних амінокислот (Asn, Lys, Met). Водночас у цьому центрі наявні залишки аспарагіну, амідна група якого має слабкі лужні властивості, та

лізину, вільна аміногрупа якого здатна до зворотної протонізації. Оскільки молекули розглянутих лігандів не можуть утворювати іонізовані форми за фізіологічних умов, провідним фактором фіксації в даному центрі є вандерваальсові сили. Про це свідчить і той факт, що амінокислоти рецептора (Lys та Arg, які мають сильні лужні властивості) беруть участь у взаємодії з пропілоксипохідними.

Взагалі загальна енергія зв'язку між лігандом та рецептором є складовою окремих показників енергії взаємодії з відповідними амінокислотними залишками. З метою видалення неспецифічних або слабких взаємодій ліганда з рецептором показники енергії зв'язку з окремими амінокислотами було відфільтровано на рівні, що перевищував 2 ккал/моль (нижня межа вандерваальсових взаємодій). Було встановлено, що загальна енергія зв'язку таких амінокислотних залишків не є рівномірною і становить від 60 до 78 % (табл. 2). Лише для етоксипохідних третього кластера (III та V) внесок "високоенергетичних" амінокислотних залишків складає 58–62 %, тоді як на частку менш енергетичних зв'язків припадає близько 40 %.

Ділянки зв'язування алкоксипохідних сполук формують пори у структурі рецептора. За допо-

Таблиця 2 – Розподіл хлор- і бромзаміщених алкоксипохідних за енергією зв'язку та локалізацією місць зв'язування (віртуальний докінг)

Номер кластера	1	1	1	1	2	2	3	3	Примітка
Номер сполуки	VII	VI	VIII	I	IV	II	V	III	
Загальна енергія, ккал/моль	-96,9	-96,8	-95,7	-95,3	-91,9	-87,2	-83,1	-81,6	
Сумарна енергія зв'язків із частковим внеском >2 ккал/моль	-76,9	-71,0	-68,6	-71,2	-63,7	-56,5	-51,2	-48,0	
%	79,4	73,3	71,7	74,7	69,3	64,7	61,7	58,8	
M-LYS-70					-3,5				
M-ARG-71					-7,0				
S-TYR-97	-3,5	-3,5							
S-GLU-155	-3,5	-3,5		-3,5					
M-SER-10						-6,1			
S-ASP-43	-4,1	-4,2							
S-SER-46							-3,5	-3,4	
M-ILE-47							-3,5	-3,5	
S-ASP-48							-3,4	-2,9	
S-GLN-64			-3,5						
M-PRO-29					-5,2	-3,0			Місце зв'язування № 2
M-ASP-30					-7,0	-9,1			
S-ASP-30					-7,1	-5,0			
M-PHE-31					-6,8	-7,8			
S-PHE-31					-3,7	-5,8			
M-LYS-70					-5,5				
S-ARG-71					-12,2	-6,6			
S-TYR-97	-2,8	-4,3	-2,4	-3,9					
M-ASN-100							-4,5	-4,7	Місце зв'язування № 3
S-LYS-102							-4,8	-4,2	
M-ALA-135							-5,0	-4,8	
S-MET-137							-4,7	-4,6	
S-GLU-155	-4,1	-2,8		-4,5					
S-TYR-157	-8,5	-8,0		-4,9					Місце зв'язування № 1
S-PHE-200	-11,0	-13,7	-17,9	-16,1					
S-THR-202	-3,4	1,7	-4,2	-2,5					
S-TYR-205	-3,6	-4,0	-6,7	-7,1					
S-LYS-13					-5,7	-13,1			
S-ASP-43	-6,9	-3,7	-8,1	-3,1					
M-SER-46							-5,4	-4,9	Місце зв'язування № 3
S-SER-46							-4,3	-3,5	
M-ASP-48							-6,2	-5,8	
S-ASP-48							-5,9	-5,6	
S-TYR-62	-21,1	-23,5	-23,8	-20,4					
S-GLN-64	-4,4	-1,5	-2,1	-5,3					

могою програми Mole 2.13.9.6. було розраховано основні параметри цих пор – гідрофобність та гідрофільність, полярність і загальну довжину (табл. 2). З визначених параметрів видно, що найбільш впливовими для зв'язування хлорзаміщених алкоксипохідних є ділянки з високою полярністю (16-23) і близькими показниками гідрофільності та гідрофобності – фенільний радикал Phe-200, що відповідає за формування найбільш енергетично вигідного зв'язку (від -11 до -17 ккал/моль). Для інших центрів зв'язування внесок кожного з амінокислотних залишків не перевищує 5–8 ккал/моль, окрім TYR-62 з аномально високою енергією зв'язку (20–24 ккал/моль). Показовим є те, що він бере

участь лише у взаємодії зі сполуками цієї структури.

Для етоксипохідних, які є елементами третього кластера, виділено два ефективних місця зв'язування із загальною енергією утворення зв'язків близько -20 ккал/моль, однак для останнього, крім Ser 46 та Asp 48, при аналізі фізико-хімічних властивостей пор виявлено ще додаткові амінокислотні залишки (Ala 45, Met 49, Leu 99, Lys 102, Lys 103), що беруть участь у взаємодії. Вони представлені як нейтральними аліфатичними амінокислотними залишками (аланін та лейцин), так і основними (лізин). Імовірно, саме за рахунок полярних залишків значно підвищуються гідрофільність (до -2,14 од.) та

полярність (до 25,8 од.) однієї з цих пор, що, поряд з її розміром (10,19 Å), дозволяє молекулам, що містять бром у положенні 7, легше потрапляти в порожнини, а наявність залишку аспарагінової кислоти формує більш полярне середовище при взаємодії з аміногрупою лізину.

Таким чином, аналіз показників віртуального докінгу заміщених алкоксипохідних дає можливість виділити декілька місць зв'язування, що є характерними для 7-хлор- або 7-бромзаміщених похідних бенздіазепіну. Найбільший вплив на зв'язування хлорзаміщених алкоксипохідних мають ділянки з високою полярністю амінокислот (16-23) і близькими показниками гідрофільності та гідрофобності. Внесок вандерваальсових та водневих взаємодій у загальну енергію зв'язку в комплексі ліганд – рецептор визначається наявністю галогену (хлору чи броду).

Відомо [16–18], що фармакологічний спектр кожного препарату похідного бенздіазепіну залежить від місця (субодиноці) його зв'язування з ГАМК_A-РК. Ми провели порівняння анальгетичної (тест “оцтовокислі корчі”) та протисудомної (антагонізм з коразолом) дії сполук I–IV з даними докінгу. Перший показник не специфічний для цієї групи сполук, тоді як другий є одним із провідних у фармакологічному спектрі багатьох бенздіазепінів.

У тесті “оцтовокислі корчі” встановлено [3], що середня ефективна доза сполук залежить від наявності тих чи інших замісників. Так, для сполук з пропілоксирадикалом у положенні 3 гетерокільця (серед сполук II, IV, VI і VIII) величина $E_{D_{50}}$ становить (074±0,017) мкмоль/кг для о-хлорфенільного (II) та (0,134±0,043) мкмоль/кг для фенільного (IV) похідного і майже на порядок менша за аналогічний показник для відповідних етоксипохідних ((0,79±0,23) мкмоль/кг для о-хлорфенільного (сполука I) та (1,39±0,23) мкмоль/кг для фенільного (сполука III) похідного). Тобто відзначають статистично вірогідну різницю ($p \leq 0,06$) між сполуками з етилокси- та пропілоксизамісниками. Зовсім інші співвідношення спостерігають при зіставленні показників протисудомної дії за антагонізмом з коразолом. Так, у цьому тесті найбільш активними виявились сполуки, що містять хлорфенільний замісник у гетерокіль-

ці ((0,42±0,10) мкмоль/кг для пропілоксипохідного (II) та (0,51±0,17) мкмоль/кг для етилоксипохідного (I), табл. 1), тоді як для сполук з фенільним радикалом величина $E_{D_{50}}$ за даним тестом майже на два порядки вища ((17,75±1,93) мкмоль/кг (сполука III) та (15,1±2,7) мкмоль/кг (сполука IV) відповідно). На підставі навіть цих обмежених даних можна зробити висновок, що анальгетичний та протисудомний ефекти алкоксипохідних реалізуються різними шляхами, напрямок яких визначається комбінацією замісників у положеннях 3 (алкоксильний радикал) та 5 (ароматичний замісник) гетерокільця. Можна стверджувати, що атом галогену (хлору) в ортоположенні фенільного замісника, завдяки своїй високій електронегативності та здатності до поляризації, бере участь у формуванні додаткового зв'язку. Досить незвичним є той факт, що близькі гомологи, які різняться однією CH_2 -групою, виявляють таку значну різницю у величині анальгетичної активності. Ймовірним поясненням цього є те, що пропільний радикал більш конформаційно рухомий, що певною мірою порушує стабільність ГАМК-рецептора після зв'язування зі сполукою II. Навпаки, ані ліпофільність, ані молекулярний об'єм не мають у даному випадку значного впливу, оскільки за цими показниками вказані молекули подібні.

ВИСНОВКИ. На підставі комплексу теоретично отриманих даних молекулярного докінгу та експериментально визначених показників анальгетичної і протисудомної дії можна стверджувати, що анальгетичний ефект переважно зумовлений можливістю зв'язування алкоксипохідних із центром, що містить залишки лужних амінокислот (аргініну, лізину). Оскільки в даному центрі також присутня аспарагінова кислота, можна передбачити, що ця порожнина є більш полярною, тому ефективність зв'язування може бути зумовлена наявністю в молекулі груп (у положенні 7), здатних до часткової поляризації. Місце зв'язування 7-хлорпохідних також містить залишки лізину та аспарагінової кислоти, але наявність залишків феніланіну і тирозину передбачає ароматичну взаємодію за рахунок π-π електронних систем.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Yu-Chen Ch. Abagyan Docking to multiple pockets or ligand fields for screening, activity prediction and scaffold hopping / Ch. Yu-Chen, M. Totrov, R. Abagyan // *Future Med Chem.* – 2014. – 6 (16). – P. 1741–1755.

2. Douglas B. Kitchen, Hélène Decornez, John R. Furr & Jürgen Bajorath Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications // *Nature Reviews Drug Discovery.* – 2004. – 3. – P. 935–949.

3. Analgesic effects of 3-substituted derivatives of 1,4-benzodiazepines and their possible mechanisms / V. I. Pavlovsky, O. V. Tsybalyuk, V. S. Martynyuk [et al.] // *Neurophysiology*. – 2013. – **45**, No. 5/6. – P. 427–432.
4. Активация ГАМК-ергической системы пропилоксипроизводным 1,4-бензодиазепина на моделях нейропатической боли и судорог, индуцированных коразолом / Н. Я. Головенко, В. Б. Ларионов, А. С. Ре-дер [и др.] // Журн. Национальной академии медицин-ских наук Украины. – 2016. – № 3. – С. 247–252.
5. The effect of propoxazepam on development of thiosemicarbazide-induced GABA-deficient seizures in mice / M. Ya. Golovenko, A. S. Reder, V. B. Larionov, I. P. Valivodz // *Клініч. Фармація*. – 2017. – **21**, № 2. – С. 34–40.
6. Эффекторный анализ взаимодействия про-поксазепам с антагонистами нейрорецепторов ГАМК и глицина / Н. Я. Головенко, В. Б. Ларионов, А. С. Ре-дер, И. П. Валиводзь // *Нейрохимия*. – 2017. – **34**, № 4. – С. 1–8.
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. Медик В. А. Статистика в медицине и биологии : руководство : в 2 т. / В. А. Медик, М. С. Токмачев, Б. Б. Фишман ; под ред. Ю. М. Комарова. – М. : Медицина, 2000. – 412 с.
10. Лапач С. Н. Статистические методы в меди-ко-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К. : Морион, 2001. – 408 с.
11. Воронина Т. А. Роль 3-оксиметаболита фена-зепам и леваны в реализации их нейротропного действия / Т. А. Воронина, Н. Я. Головенко, В. Б. Ла-рионов // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2014. – № 1. – С. 44–49.
12. Механізми реакцій метаболізму етоксозепаму в гомогенатах печінки щурів / М. Я. Головенко, В. Б. Ла-рионов, І. П. Валиводзь, Н. О. Жукова // *Запоріз. мед. журн.* – 2015. – № 4 (91). – С. 100–104.
13. Otto M. W. Benzodiazepine use, cognitive impair-ment, and cognitive-behavioral therapy for anxiety dis-orders: issues in the treatment of a patient in need / M. W. Otto, S. E. Bruce, T. Deckersbach // *J. Clin. Psy-chiatry*. – 2005. – **66** (2). – P. 34–38.
14. Stewart S. A. The effects of benzodiazepines on cognition / S. A. Stewart // *J. Clin. Psychiatry*. – 2005. – **66** (2). – P. 9–13.
15. Benzodiazepine pharmacology and central ner-vous system-mediated effects / C. E. 3rd Griffin, A. M. Kaye, F. R. Bueno, A. D. Kaye // *Ochsner J.* – 2013. – **13** (2). – P. 214–223.
16. Benzodiazepines act on GABAA receptors via two distinct and separable mechanisms / Rhodri J. Wal-ters, Stephen H. Hadley, Kendall D.W. Morris, Jahanshah Amin // *Nature Neuroscience*. – 2000. – **3**. – P. 1274–1281.
17. Smith T. A. Type A gamma-aminobutyric acid (GABAA) receptor subunits and benzodiazepine binding: significance to clinical syndromes and their treatment / T. A. Smith // *Br. J. Biomed. Sci.* – 2001. – **58** (2). – P. 111–121.
18. Sigel M. E. Steinmann Structure, Function, and Modulation of GABAA Receptors / M. E. Sigel // *J. Biol. Chem.* – 2012. – **23**; 287(48). – P. 40224–40231.

REFERENCES

1. Yu-Chen Chen, Totrov, M., & Abagyan, R. (2014). Docking to multiple pockets or ligand fields for screening, activity prediction and scaffold hopping. *Future of Medicinal Chemistry*, 6 (16), 1741-1755.
2. Kitchen, D.B., Decornez, H., Furr, J.R., & Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3, 935-949.
3. Pavlovsky, V.I., Tsybalyuk, O.V., Martynyuk, V.S., Kabanova, T.A., Semenishyna, E.A., Khalimova, E.I., & Andronati, S.A. (2013). Analgesic effects of 3-substituted derivatives of 1,4-benzodiazepines and their possible mechanisms. *Neurophysiology*, 45(5/6), 427-432.
4. Golovenko, N.Ya., Larionov, V.B., Reder, A.S., Voloshchuk, N.I., Valivodz, I.P., & Taran, I.V. (2016). Akti-vatsiya GAMK-ergicheskoy sistemy propiloksiroizvodnim z 1,4-benzodiazepina na modelyakh neyropaticheskoy boli i sudorog, indutsirovannykh korazolom [GABA-ergic system activation with 1,4-benzodiazepine propoxy-derivative on the models of neuropathic pain and pen-tylenetetrazol-induced seizures]. *Zhurnal Natsionalnoy Akademii meditsinskikh nauk Ukrainy – Journal of the National Academy of Medicinal Sciences of Ukraine*, 3, 247-252.
5. Golovenko, M.Ya., Reder, A.S., Larionov, V.B., & Valivodz, I.P. (2017). The effect of propoxazepam on development of thiosemicarbazide-induced GABA-deficient seizures in mice. *Klinichna Farmatsiia – Clinical Pharmacy*, 21 (2), 34-40.
6. Golovenko, M.Ya., Larionov, V.B., Reder, A.S., & Valivodz, I.P. (2017). Efektorny analiz vzaimodeystviya propoksazepama s antagonistami neyroretseptorov GAMK i gliTsina [Effect analysis of propoxazepam inter-actions with GABA and glycine antagonists]. *Neurokhimiya – Neurochemistry*, 34 (4), 1-8 [in Russian].
7. Yang, J.-M., & Chen, C.-C. (2004). "GEMDOCK: A generic evolutionary method for molecular docking". *Pro-teins: 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. Medyk, V.A., Tokmachev, M.S., Fishman, B.B. (2000). Statistika v meditsine i biologii: rukovodstvo v 2 t. [Statistics in medicine and biology: guideline in 2 vol.]. Komarov, Yu.M. (Ed.) Moscow: Meditsina [in Russian].
10. Lapach, S.N., Chubenko, A.V., & Babych, P.N. (2001). Statisticheskiye metody v medico-biologicheskikh issledovaniyakh s ispolzovaniyem Excel [Statistical methods in medical and biological studies using Excel]. Kyiv: Morion [in Russian].
11. Voronina, T.A., Golovenko, N.Ya., & Larionov, V.B. (2011). Rol 3-oksimetabolita fenazepamai levany v realizatsii ikh neyrotropnogo deystviya [The role of phenazepam and levan 3-oxymethabolite in their neurotropic action realization]. *Farmakokinetika i farmakodinamika – Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 1, 44-49 [in Russian].
12. Holovenko, M.Ya., Larionov, V.B., Valivodz, I.P., Zhukova, N.O. (2015). Mekhanizmy reaktsii metabolizmu etoksozepamu v homohenatak pechinky shchuriv [The metabolism reactions mechanisms of 3-ethoxozepam in rat liver homogenates]. *Zaporizkyi medychnyi zhurnal – Zaporizhian Medical Journal*, 4 (91), 100-104 [in Ukrainian].
13. Otto, M.W., Bruce, S.E., & Deckersbach, T. (2005). 1.4 Benzodiazepine use, cognitive impairment, and cognitive-behavioral therapy for anxiety disorders: issues in the treatment of a patient in need. *J. Clin. Psychiatry*, 66 (2), 34-38.
14. Stewart, S.A. (2005). The effects of benzodiazepines on cognition. *J. Clin. Psychiatry*, 66 (2), 9-13.
15. Griffin, C.E.3rd, Kaye, A.M., Bueno, F.R., & Kaye, A.D. (2013). Benzodiazepine pharmacology and central nervous system-mediated effects. *Ochsner J.*, 13 (2), 214-223.
16. Walters, R.J., Hadley, S.H., Morris, K.D.W., & Amin, J. (2000). Benzodiazepines act on GABAA receptors via two distinct and separable mechanisms. *Nature Neuroscience*, 3, 1274-1281.
17. Smith, T.A. (2001). Type A gamma-aminobutyric acid (GABAA) receptor subunits and benzodiazepine binding: significance to clinical syndromes and their treatment. *Br. J. Biomed. Sci.*, 58 (2), 111-121.
18. Sigel, M.E. (2012). Steinmann structure, function, and modulation of GABAA Receptors. *J. Biol. Chem.*, 287 (48), 40224-40231.

Н. Я. Головенко, В. И. Павловский, И. П. Валиводзь, В. Б. Ларионов
 ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМЕНИ А. В. БОГАТСКОГО НАН УКРАИНЫ, ОДЕССА

ПОЛУЭМПИРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АЛКОКСИПРОИЗВОДНЫХ 1,4-БЕНЗДИАЗЕПИНА С ГАМК_A-РЕЦЕПТОРОМ НА ОСНОВАНИИ ДАННЫХ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА

Резюме

Вступление. В фармакологическом спектре 3-алкоксипроизводных 1,4-бенздиазепина, в отличие от классических представителей, значительно более выражены анальгетические свойства, но даже среди синтезированных и изученных представителей существуют соединения с различной величиной этого эффекта.

Цель исследования – оценить параметры молекулярного докинга теоретически сгенерированных структур алкоксипроизводных 1,4-бенздиазепина с ГАМК_A-рецепторным комплексом и сопоставить эти данные с показателями фармакологической активности синтезированных соединений.

Методы исследования. Процедура молекулярного докинга была проведена с помощью программы iGEMDOCK v2.1, оптимизированы структуры уже синтезированных и теоретически предложенных молекул, которые различаются заместителями в ортоположении фенильного радикала и положении 7 конденсированной системы и сгенерированы в программе Avogadro (v 1.2.0). Средние эффективные дозы соединений по антагонизму с коразолом (120 мг/кг подкожно через 30 мин после введения соединений) изучали на белых мышах.

Результаты и обсуждение. Энергия связи всех сгенерированных структур находится в пределах 81,6–96,8 ккал/моль. Анализ показателей виртуального докинга замещенных алкоксипроизводных позволяет выделить несколько мест связывания, характерных для 7-хлор- или 7-бромзамещенных производных бенздиазепина. Наибольшее влияние на связывание хлорзамещенных алкоксипроизводных имеют участки с высокой полярностью аминокислот (16-23Д) и близкими показателями гидрофильности и гидрофобности. Вклад вандерваальсовых и водородных взаимодействий в общую энергию связи определяется наличием галогена (хлора или брома). В тесте антагонизма с коразолом наиболее активными

были соединения, содержащие хлорфенильный заместитель в гетерокольце, – (0,42±0,10) мкмоль/кг для пропилкоксипроизводного и (0,51±0,17) мкмоль/кг для этилкоксипроизводного, тогда как для соединений с фенильным радикалом величина ED_{50} по этому тесту почти на порядок выше – (5,1±2,7) и (17,75±1,93) мкмоль/кг соответственно.

Вывод. Анальгетический эффект преимущественно обусловлен возможностью связывания алкоксипроизводных с центром, содержащим остатки основных аминокислот.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: молекулярный докинг; алкоксипроизводные 1,4-бенздиазепина; противосудорожное действие; анальгетическое действие.

M. Ya. Golovenko, V. I. Pavlovskiy, I. P. Valivodz, V. B. Larionov
O. BOHATSKYI PHYSICO-CHEMICAL INSTITUTE OF NAS OF UKRAINE

SEMIEMPIRICAL ANALYSIS OF 1,4-BENZODIAZEPINE ALKOXY DERIVATIVES INTERACTIONS WITH GABA_A-RECEPTOR ON THE BASE OF MOLECULAR DOCKING DATA AND PHARMACOLOGICAL EFFECT

Summary

Introduction. Pharmacological spectrum of 1,4-benzodiazepine 3-alkoxy derivatives, in contrast to classical substances, has more prominent analgesic properties, but even among the synthesized and studied molecules there are compounds with different magnitude of this effect.

The aim of the study – to evaluate the molecular docking parameters of the theoretically generated structures of 1,4-benzodiazepine alkoxy derivatives with the GABA receptor complex and to compare these data with the pharmacological activity of the synthesized compounds.

Research Methods. The molecular docking procedure was carried out using the iGEMDOCK v2.1 program, optimized structures of already synthesized and theoretically designed molecules with differing substituents in the ortho position of the phenyl radical and the "7" position of the condensed system are generated in the Avogadro program (v 1.2.0). The average effective doses of compounds (pentylenetetrazole-induced seizures, 120 mg/kg, subcutaneously 30 min after compounds administration) were studied in white mice.

Results and Discussion. The binding energy of all the generated structures is within the ranges of 81.6–96.8 kcal/mol. Virtual docking data analysis of substituted alkoxy derivatives allows identifying several binding sites inherent for 7-chloro- or 7-bromo-substituted benzodiazepine derivatives. The greatest influence on the binding of chlorine-substituted alkoxy derivatives have regions with a high polarity amino acids (16-23 D) and similar hydrophilicity and hydrophobicity. The contribution of Van der Waals and hydrogen interactions to the total binding energy is determined by the presence of halogen (chlorine or bromine). In pentylenetetrazole-induced seizures test the compounds containing the chlorophenyl substituent in the hetero ring were most active (ED_{50} (0.42±0.10) μ mol/kg for the propyloxy derivative and (0.51±0.17) μ mol/kg for the ethyloxy derivative) while for the compounds with the phenyl radical, the ED_{50} value were much higher (5.1±2.7) μ mol/kg and (17.75±1.93) μ mol/kg, respectively).

Conclusion. The analgesic effect is mainly due to the alkoxy derivatives possibility of binding to a center containing residues of basic amino acids.

KEY WORDS: molecular docking; alkoxy derivatives of 1,4-benzodiazepine; anticonvulsive action; analgesic action.

Отримано 08.11.17

Адреса для листування: В. Б. Ларіонов, Фізико-хімічний інститут імені О. В. Богатського НАН України, Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна, e-mail: lvb_78@ukr.net.