МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

НЕБЕСНА ТЕТЯНА ЮРІЇВНА

УДК 615:615.015.23:577.175.522:612.084

МОЛЕКУЛЯРНО-ФАРМАКОЛОГІЧНІ ОСНОВИ ВЗАЄМОДІЇ АЛЬФА1-АДРЕНОБЛОКАТОРІВ З РЕЦЕПТОРАМИ, АЛЬБУМІНОМ ТА ДНК

14.03.05 – фармакологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук

Харків – 2010

Create PDF files without this message by purchasing novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

Create PDF files without this message by purchasing novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі фармакології та клінічної фармакології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, Міністерство охорони здоров'я України.

Науковий керівник:

доктор медичних наук, член-кореспондент НАН та НАМН України, професор **ЧЕКМАН Іван Сергійович,** Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, завідувач кафедри фармакології та клінічної фармакології, м. Київ.

Офіційні опоненти:

доктор медичних наук, професор **ДРОГОВОЗ Світлана Мефодіївна,** Національний фармацевтичний університет, завідувачка кафедри фармакології, м. Харків

доктор медичних наук, професор **АБРАМЕЦЬ Ігор Ігорович,** Донецький національний медичний університет імені М. Горького, професор кафедри фармакології, м. Донецьк

Захист дисертації відбудеться «__» _____ 2010 р. о _____ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д. 64.605.03 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Блюхера, 4).

Автореферат розісланий «__» _____ 2010 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
доктор фармацевтичних наук, доцент **Т.С. Сахарова**

Create PDF files without this message by purchasing novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

Create PDF files without this message by purchasing novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Альфа$_1$-адреноблокатори (альфа$_1$-АБ) є препаратами вибору для медикаментозного лікування доброякісної гіперплазії передміхурової залози (ДГПЗ) (J.C. Nickel et al., 2008). За даними вітчизняних та зарубіжних учених гістологічні ознаки ДГПЗ у віковій групі 50-59 років трапляються у 40% чоловіків, а віком 60 років і старше – більш як у 75%, клінічні прояви захворювання фіксуються у 20% та 35% відповідно. Тобто кожен третій чоловік, старший за 60 років, має симптоми ДГПЗ (С.П. Пасєчніков, Ю.В. Бухалов, 2004). Тому фармакологічні дослідження лікарських засобів для лікування ДГПЗ, що може поєднуватися з артеріальною гіпертензією у пацієнтів похилого віку, є важливим й актуальним завданням.

Сьогодні в клінічній практиці для лікування ДГПЗ застосовуються такі альфа$_1$-АБ, як празозин, доксазозин, теразозин, альфузозин і тамсулозин, які відрізняються за тривалістю дії та переносимістю пацієнтами (В.В. Поляков, 2007). Альфа$_1$-АБ мають високу терапевтичну ефективність (виявляють швидкий та тривалий лікувальний ефект у хворих з ДГПЗ), діють у низьких дозах, поліпшують обмін ліпідів, не впливають на рівень глюкози в крові. Однак за останні роки з’явилися нові дані про побічні ефекти препаратів цієї групи. Зокрема, пацієнти з артеріальною гіпертензією у разі застосування доксазозину мають несприятливий прогноз щодо розвитку серцевої недостатності. Такий побічний ефект пов’язують з проапоптотичною активністю препарату, яка не залежить від зв’язування з альфа$_1$-адренорецепторами (альфа$_1$-АР) і характерна не для всіх альфа$_1$-АБ (С.М. Дроговоз та співавт., 2010). Зросла потреба в лікарських засобах, селективних до окремих підтипів альфа$_1$-АР. Показано, що підвищення селективності альфа$_1$-АБ до альфа$_{1A}$-АР дає змогу знизити терапевтичну дозу препарату та уникнути впливу на серцево-судинну систему (G.K. Kinsella et al., 2007; L. Maccari et al., 2006). Тож сучасні роботи з фармакології альфа$_1$-АБ спрямовані на з’ясування механізмів розвитку біологічних ефектів цих препаратів і пошук нових, більш селективних та безпечних сполук. Розв’язання цих проблем потребує проведення фундаментальних досліджень процесів взаємодії альфа$_1$-АБ з рецепторами та іншими біологічними мішенями.

Чітке експериментально підтверджене уявлення про природу взаємодії адренорецепторів (АР) і їх лігандів відсутнє, що зумовлено неможливістю рентгеноструктурного аналізу (C.Y. Kuo, M.J. Wu, 2009; M.-Y. Li, H. Fang, L. Xia, 2005). За відсутності даних про структуру рецептора і його центру зв’язування в сучасній фармакології застосовуються такі методи, які визначають кількісне співвідношення залежності «структура – активність» (quantitative structure-activity relationship, QSAR) (М.Я. Головенко, 2004; І.С. Чекман та співавт., 2009). Одним із напрямків дослідження структури молекул лікарських засобів, що широко

Create PDF files without this message by purchasing novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

застосовується в світі та розробляється на кафедрі фармакології та клінічної фармакології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, є комп'ютерне моделювання їх квантово-хімічних параметрів (молекулярних дескрипторів фармакологічної активності) (В.Д. Орлов, 2005). Статистична обробка результатів комп'ютерних розрахунків дає можливість визначити кількісне співвідношення (у вигляді математичного рівняння регресії) між значеннями молекулярних параметрів структури лікарських засобів та показниками їх фармакологічної активності, зокрема альфа-адреноблокуючою активністю. Отримані таким чином співвідношення можуть застосовуватись для скринінгу нових селективних альфа$_1$-АБ, а їх аналіз спонукає до висновків щодо природи взаємодії лікарських засобів і рецепторів. Ефективним способом валідації моделі залежності «структура – активність» для альфа$_1$-АБ у фармакології є експериментальні дослідження на ізольованих органах тварин (зокрема сім'явиносній протоці щурів) (М.В. Шепетько, 2009). У літературі описані приклади встановлення залежності «структура-активність» для деяких груп речовин з альфа$_1$-адреноблокуючою активністю, однак не було проведено системного аналізу впливу квантово-хімічних параметрів молекул альфа$_1$-АБ на їх фармакологічну активність.

Значний науковий інтерес становить вивчення взаємодії альфа$_1$-АБ з біомакромолекулами. З'ясовано, що доксазозин на 98% зв'язується з білками плазми крові. Однак немає даних про молекулярні механізми такої взаємодії, зокрема про місця зв'язування та конформаційні зміни в молекулах сироваткового альбуміну людини (САЛ), що супроводжують цей процес. Не досліджена властивість альфа$_1$-АБ впливати на структуру та функції нуклеїнових кислот, що може бути пов'язано з їх цитотоксичною дією.

Сумісне застосування методів квантової хімії та експериментальної фармакології для досліджень альфа$_1$-АБ дасть змогу поглибити теоретичні знання про механізм дії цих лікарських засобів та створити програми для скринінгу нових, ефективніших та безпечніших препаратів для лікування ДГПЗ та артеріальної гіпертензії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація є фрагментом науково-дослідної держбюджетної теми кафедри фармакології та клінічної фармакології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України «Розробка та впровадження нових технологій ефективного лікування артеріальної гіпертензії» (№ держреєстрації 0107U003592). Авторка є співвиконавцем цієї теми.

Мета і завдання дослідження. *Метою* даної роботи стали вивчення молекулярних дескрипторів і фармакологічних властивостей альфа1-АБ для встановлення залежності «структура – активність» у цій групі лікарських засобів, а також з'ясування молекулярних механізмів взаємодії альфа1-АБ з АР, САЛ, ДНК.

Create PDF files without this message by purchasing novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

Для досягнення мети виконувалися такі *завдання*:

1. Визначити залежність фармакологічної активності альфа$_1$-АБ різних хімічних груп від електронних і просторових властивостей їх молекул. Провести аналіз прогностичної якості отриманих QSAR-моделей на ізольованих органах тварин.

2. Дослідити фізико-хімічні процеси, що супроводжують зв'язування доксазозину та фенілефрину з сироватковим альбуміном людини.

3. Провести комп'ютерне моделювання молекулярних механізмів взаємодії альфа$_1$-АБ з АР та САЛ.

4. Встановити наявність цитотоксичної активності альфа$_1$-АБ, проаналізувати фізико-хімічні та молекулярно-фармакологічні механізми її розвитку для зменшення даного побічного ефекту.

Об'єкт дослідження: механізми міжмолекулярної взаємодії альфа$_1$-адренергічних лікарських засобів.

Предмет дослідження: залежність взаємодії альфа$_1$-АБ з АР, САЛ, ДНК від просторової та електронної структури молекул.

Методи дослідження: для розв'язання поставлених завдань використовувались фармакологічні, фізіологічні, цитологічні, фізико-хімічні, квантово-хімічні та статистичні методи дослідження.

Наукова новизна одержаних результатів. У дисертаційній роботі вперше проведено системний аналіз залежності фармакологічних ефектів альфа$_1$-АБ різних хімічних груп від електронних та просторових параметрів структури молекул.

У результаті здійснених досліджень уперше встановлено:

– багатофакторну функціональну залежність афінності похідних апорфіну до альфа$_1$-АР від зарядів на атомах карбону і топологічних дескрипторів;

– залежність афінності похідних арилпіперазину (АП) до альфа$_1$-АР від константи зв'язування з альбуміном, зарядів на атомах нітрогену та карбону, електростатичного потенціалу на атомах карбону, а також дипольного моменту, молекулярної маси, топологічного діаметра молекул.

Уперше методами ядерного магнітного резонансу (^{1}H ЯМР-спектроскопії) та молекулярного докінгу досліджено взаємодію САЛ із доксазозином і фенілефрином. При цьому показано, що взаємодія САЛ із доксазозином і фенілефрином при концентрації препаратів 0,1% спричинює зменшення об'єму всіх типів заповнених водою компартментів у білковій глобулі (дегідратація становить 600 мг/г) і супроводжується значною конформаційною перебудовою молекул альбуміну. Визначено сайт зв'язування доксазозину.

Уперше методом спектрофотометричного титрування та гель-електрофорезу підтверджено наявність фізико-хімічної взаємодії доксазозину з ДНК і проведено молекулярно-фармакологічний аналіз цього явища.

Create PDF files without this message by purchasing novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

Практичне значення отриманих результатів. Результати здійсненого дослідження розширюють сучасні уявлення про механізми дії альфа$_1$-АБ та їх зв'язок зі структурою молекул.

Розроблені математичні моделі залежності альфа$_1$-адреноблокуючої активності від квантово-хімічних і топологічних дескрипторів молекул можуть використовуватися для скринінгу нових, ефективніших та безпечніших альфа$_1$-АБ.

Встановлена залежність цитотоксичного ефекту альфа$_1$-АБ від хімічної структури є теоретичним підґрунтям для спрямованого синтезу сполук цієї фармакологічної групи, що не впливають на проліферацію клітин і не виявляють побічних ефектів на серцево-судинну систему. Дані щодо місця зв'язування доксазозину в молекулі САЛ поглиблюють знання про фармакокінетику цього препарату та уможливлюють прогнозування його взаємодії з іншими лікарськими засобами, які характеризуються високою спорідненістю до білків плазми крові.

Отримані результати мають важливе методологічне значення для фармакології та фармації. Запропонована в роботі методика розрахунку квантово-хімічних і топологічних дескрипторів препаратів рецепторного типу дії, а також їх статистичний аналіз можуть використовуватися для побудови прогностичних QSAR-моделей сполук інших фармакологічних груп.

Особистий внесок здобувача. Дисертанткою особисто проаналізована наукова література та патентна інформація з досліджуваної проблеми. Проведено експериментальні дослідження, здійснено статистичну обробку та оформлення отриманих даних, узагальнено результати досліджень. Сформульовані та опубліковані основні положення дисертації.

Фізико-хімічні та квантово-хімічні дослідження проведено за сприяння відділу біомедичних проблем поверхні (завідувач – д-р хім. наук, професор В.В. Туров), відділу аморфних і структурно впорядкованих оксидів (завідувач – д-р хім. наук, професор В.М. Гунько) Інституту хімії поверхні імені О.О. Чуйка НАН України. Цитологічні дослідження проведено за сприяння відділу експериментальних клітинних систем (керівник – д-р біол. наук, професор Ю.І. Кудрявець) Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України. Разом із науковим керівником сформульовані висновки та запропоновані практичні рекомендації. Здобувач не використовувала ідей та розробок співавторів публікацій.

Апробація результатів дисертації. Результати роботи обговорені на засіданні кафедри фармакології та клінічної фармакології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

Матеріали дисертаційної роботи доповідались на IV Міжнародній медико-фармацевтичній конференції студентів і молодих вчених (м. Чернівці, 2007); VIII Національному конгресі кардіологів України (м. Київ, 2007); Науково-практичній конференції «Актуальні питання фармакології», присвяченій 70-річчю кафедри фармакології Вінницького

Create PDF files without this message by purchasing novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

національного медичного університету ім. М.І. Пирогова (м. Вінниця, 2007); Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій 60-річчю ВООЗ, Всесвітньому дню здоров'я 2008 р., захисту здоров'я від змін клімату (м. Київ, 2008); VIII International congress of medical sciences (м. Софія, 2009); Науково-практичній конференції «Биологически-активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения» (с.м.т. Новий світ, 2009); II (63) Міжнародному конгресі студентів і молодих вчених «Актуальні проблеми сучасної медицини» (м. Київ, 2009); Другій науково-практичній конференції «Безопасность лекарств: от разработки до медицинского применения» (м. Київ, 2009); Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій Всесвітньому дню здоров'я 2010 року (м. Київ, 2010).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 19 робіт: 8 статей, з яких 5 – у фахових наукових журналах, акредитованих ВАК України, 2 Деклараційні патенти, 9 тез доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Матеріали дисертації викладені на 168 сторінках машинописного тексту. Робота складається зі вступу, огляду літератури, 3 розділів власних досліджень (10 підрозділів), аналізу й узагальнення отриманих даних, висновків і переліку використаних джерел. Покажчик літератури містить 235 джерел, з яких 57 – кирилицею, 178 – латиницею. Робота ілюстрована 19 таблицями і 53 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень. У процесі виконання дисертаційної роботи здійснено фармакологічні, фізіологічні, цитологічні, фізико-хімічні, квантово-хімічні дослідження. Робота з тваринами проводилась у відповідності до вимог комісії з біоетики НМУ імені О.О. Богомольця, що узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Аналіз реакційних центрів молекул альфа$_1$-адреноблокаторів проводили методами PM3 та B3LYP/6-31G(d,p) за допомогою програм PC GAMESS/FireFly 7.1 (A.A. Granovsky, 2007), та GAMESOL, версія 3.1 (C.J. Cramer, D.G. Truhlar, 2002).

Для розробки математичних моделей залежності альфа$_1$-адреноблокуючої активності від молекулярних дескрипторів у роботі досліджували 19 похідних апорфіну (рис. 1) та 19 похідних АП (рис. 2). Показники констант зв'язування похідних апорфіну та АП з альфа$_1$-АР взяті з літератури (M.D. Ivorra et al., 2005; M.Y. Li, H. Fang, L. Xia, 2005).

Для статистичного аналізу даних застосовано регресійний аналіз за допомогою програмного засобу ПЗ ПРІАМ (С.Н. Лапач, 2000). Аналіз нормальності залишків і побудову статистичних графіків здійснено з використанням програм SPSS 13.0 та MS Excel.

Create PDF files without this message by purchasing novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

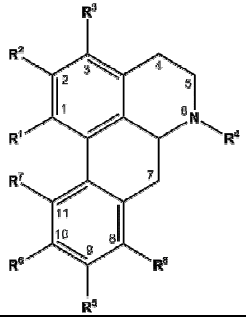
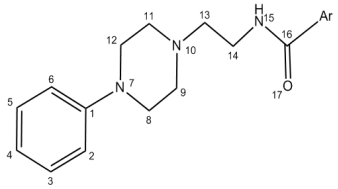
	

Рис. 1. Загальна структура похідних апорфіну.	Рис. 2. Загальна структура похідних арилпіперазину.

Фізіологічні дослідження проводили на препаратах ізольованої сім'явиносної протоки 55 щурів-самців лінії Вістар. Сегменти сім'явиносної протоки завдовжки 1 см закріплювали на двох гачках (один нерухомий, інший – приєднаний до датчика скорочень) в ванночці для міографічних досліджень об'ємом 1 мл. Скорочення викликали фенілефрином у зростаючих концентраціях. Скоротливу активність органу записували на персональному комп'ютері за допомогою програми IrisOscilographe. Силу скорочень оцінювали за амплітудою. Будували криву залежності доза-ефект для контрольного експерименту. Після експозиції найвищої концентрації орган відмивали протягом 40 хвилин і додавали антагоніст упродовж 20 хвилин до початку скорочень. Повторно проводили експозицію зростаючих концентрацій фенілефрину та будували криву залежності доза-ефект, змінену під впливом антагоніста. Як антагоністи застосовували доксазозину мезилат і похідні АП. Для кожного антагоніста розраховували значення pA_2 методом (O. Arunlakshana, H.O. Schild, 1945).

Моделювання взаємодії похідних хіназоліну (доксазозин), апорфіну (3-хлорболдин) та N-(2-(4-(2-метоксифеніл)піперазин-1-іл)етил)фуран-2-карбоксаміду (АП-1) з альфа$_{1A}$-АР, а також доксазозину з САЛ здійснювали методом молекулярного докінгу за допомогою програми AutoDock 4.0 (A.J. Olson et al., 1998). Конформаційний аналіз лігандів у протонованій формі проводили методом B3LYP/6-31G(d,p). Модель альфа$_{1A}$-АР отримана методом гомологічного моделювання за допомогою програми Swiss-Prot (E. Boutet et al., 2007). Модель молекули САЛ отримували з банку білкових структур PDB (Protein Data Bank). Візуалізацію отриманих даних здійснювали в програмі AutoDockTools 1.5.4.

Вивчення взаємодії доксазозину та фенілефрину з САЛ проводили методом ^{1}H ЯМР-спектроскопії в умовах пошарового виморожування рідкої фази (V.M. Gun'ko, V.V. Turov, 2005). Вимірювали концентрацію зв'язаної води в широкому температурному інтервалі при T<0°C і розраховували термодинамічні характеристики шарів води, які піддаються збурюючому

Create PDF files without this message by purchasing novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

впливу з боку білкових молекул. Спектри ЯМР отримували на ЯМР-спектрометрі високого розрізнення Varian Merkury з робочою частотою 400 МГц.

Дослідження цитотоксичної дії альфа$_1$-адреноблокаторів проводили на клітинах ліній Hep G2 (диференційована гепатоцелюлярна карцинома людини) та HeLa (карцинома шийки матки людини), які культивували в повному поживному середовищі RPMI-1640 з 10% ембріональної сироватки теляти, 40 мкг/мл гентаміцину у зволоженій атмосфері з 5% CO_2 при 37ºС. Суспензію клітин висаджували на 96-лункові планшети в концентрації 1-2×10^4 клітин/лунку в 100 мкл середовища. Через 24 години вносили препарати: доксазозин, АП-1 у досліджуваних концентраціях (від 200 до 0,16 мкМ). Інкубували клітини за стандартних умов 24 та 48 годин, після чого фарбували за допомогою 3-(4,5-диметилтіазол-2)2,5-дифенілтетразоліум броміду (МТТ). Оптичну густину вмісту лунок визначали за допомогою мультилункового спектрофотометру (Labsystems Multiskan PLUS) при довжині хвилі 540 нм.

Для вивчення взаємодії доксазозину з ДНК реєстрували зміну електронного спектра препарату при титруванні розчином ДНК у фізіологічному розчині, для обробки результатів застосовували модель МакГі та фон Хіппеля (К. Ванг и соавт., 1999; J. McGhee, 1974). Для проведення гель-електрофорезу ДНК використовували агарозний гель з трис-борат-ЕДТА буфером при pH 8,1-8,2 та бромистим етидієм (0,5 мкг/мл). Маркерну ДНК (фрагменти розміром від 50 до 1000 пар основ) брали з набору O'GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder.

Виграш енергії зв'язування (ΔE, кДж/моль) при взаємодії доксазозину з дезоксиаденіном розраховували за формулою:

$$\Delta E = E_{(комплексу)} - (E_{доксазозину} + E_{азотистої\ основи})$$

Усі величини енергій розраховані методом AM1.

Отримані результати оцінювали на підставі статистичної обробки методом варіаційної статистики. Вірогідність різниць між досліджуваними показниками оцінювали за t-критерієм Ст'юдента. Різницю між показниками вважали статистично вірогідною при $p \leq 0{,}05$. Усі статистичні розрахунки виконували на комп'ютері, використовуючи електронні таблиці (В.Д. Тавинцев, 1998).

Результати досліджень і їх обговорення. Оскільки альфа$_1$-АБ представлені двома хімічними класами, проводили комп'ютерне моделювання двох препаратів – доксазозину (похідне хіназоліну) та тамсулозину (похідне метоксибензолу сульфонаміду) з метою аналізу реакційних центрів молекул даних сполук. Найбільший негативний заряд у молекулі тамсулозину спостерігається на атомах оксигену метокси-групи (-0,206 ат. од.) та сульфонамідної групи (-0,836, -0,830 ат. од.), а також на атомі нітрогену сульфонамідної групи (-0,441 ат. од.). У молекулі доксазозину надлишок електронної густини зафіксовано в атомів оксигену метокси-груп, їх заряд

Create PDF files without this message by purchasing novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

становить -0,175 та -0,174 ат. од. Негативний заряд мають атоми нітрогену хіназолінового циклу -0,222 та -0,233 ат. од. У структурі піперазину лише один атом нітрогену має негативний заряд, який сягає -0,07 ат. од. В молекулах обох препаратів електронна густина скупчується на полюсах, що вказує на важливу роль цих ділянок під час взаємодії з альфа$_1$-АР та біомолекулами організму. В молекулах тамсулозину та доксазозину негативний електростатичний потенціал зосереджений навколо атомів оксигену та нітрогену, що вказує на можливість протонування цих атомів. Це відповідає уявленням про структуру фармакофору альфа$_1$-АБ, даним ЯМР-спектрів цих сполук і результатам обчислювальних експериментів, описаних у літературі (M.E. Kinsella, 2005).

Проведеними дослідженнями встановлено, що існує багатофакторна функціональна залежність показника зв'язування похідних апорфіну з альфа$_{1A}$-АР від зарядів на атомах карбону C^8, C^{11}, C^4 і таких топологічних дескрипторів, як сума валентних ступенів, топологічний діаметр, загальна молекулярна зв'язаність, індекс Вінера, яку можна описати залежністю (1) у вигляді полінома. Зв'язування досліджених речовин з альфа$_{1A}$-АР (тобто адреноблокуюча активність) зростає зі збільшенням значення негативного заряду на атомах C^{11} та C^4:

$$Y = 5{,}9194 - 1{,}1116x_{27} - 1{,}4036x_{34} + 0{,}96176x_{47}x_{48} + 0{,}7666x_{46}x_{50} + 0{,}4375x_{30}, \quad (1)$$

Відповідність позначень факторів у моделі (1) їх назвам наведено у табл. 1.

Таблиця 1

Відповідність позначень факторів у моделі (1) молекулярним дескрипторам

Позначення дескриптора у моделі (1)	Дескриптор
x_{27}	Заряд на атомі карбону C^{11}
x_{30}	Заряд на атомі карбону C^8
x_{34}	Заряд на атомі карбону C^4
x_{46}	Сума валентних ступенів (total valence degree)
x_{47}	Топологічний діаметр
x_{48}	Загальна зв'язаність (total connectivity)
x_{50}	Індекс Вінера
Y	pK_i – показник зв'язування речовини з альфа$_{1A}$-АР

Для аналізу структури математичної моделі (1) було застосовано дворівневий алгоритм послідовного включення ефектів у математичну модель, що ґрунтується на коефіцієнтах часткової кореляції ефектів, які аналізуються, з відгуком (залежною змінною). Найбільшу силу впливу на

Create PDF files without this message by purchasing novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

показник зв'язування речовини з альфа$_{1A}$-АР має заряд на атомі карбону C^{11} (приблизно 55%) та заряд на атомі карбону C^{4} (приблизно 28%). Зв'язування досліджених речовин з альфа$_{1A}$-АР (тобто адреноблокуюча активність) зростає зі збільшенням значення негативного заряду на атомах C^{11} та C^{4}. Така залежність може бути зумовлена наявністю електростатичної взаємодії АР та вказаних атомів похідних апорфіну.

9% впливу на відгук має ефект взаємодії топологічного діаметру та загальної зв'язаності. Вплив усіх інших ефектів на відгук коливається в межах декількох відсотків.

У результаті проведених досліджень альфа$_1$-АБ, похідних АП, одержано математичну модель (2):

$$Y = 7{,}14773 + 0{,}665025z_{62} + 0{,}978762z_{25} - 0{,}870575x_{23} + 0{,}971445z_{58} + \\ + 0{,}959196x_{16} - 0{,}883256x_{19} + 0{,}937153x_{7} - 0{,}310777z_{31} + 0{,}368731x_{35} + \\ + 0{,}433565z_{23} - 0{,}314298x_{21} \qquad (2)$$

У табл. 2 наведено перелік дескрипторів, які включили до математичної моделі (2).

Таблиця 2

Відповідність молекулярних дескрипторів їх позначенням у моделі (2)

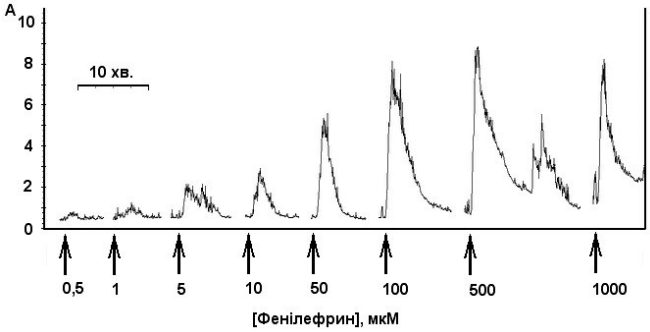
Позначення дескриптора у моделі (2)	Дескриптор
x_7	Дипольний момент молекули по осі *z*
x_{16}	Молекулярна маса
x_{19}	Заряд на атомі карбону C^{6}
x_{21}	Заряд на атомі карбону C^{8}
x_{23}	Заряд на атомі нітрогену N^{10}
x_{25}	Заряд на атомі карбону C^{12}
x_{31}	Електростатичний потенціал на атомі карбону C^{1}
x_{35}	Електростатичний потенціал на атомі карбону C^{5}
x_{58}	Топологічний діаметр молекули
x_{62}	pK_d зв'язування з САЛ
Y	pK_i – показник зв'язування речовини з альфа$_1$-АР

Найбільшу силу впливу на показник зв'язування АП з альфа$_1$-АР мають pA_2 зв'язування з альбуміном (38%), заряди на атомі нітрогену N^{10} (17%) та атомі карбону C^{12} (13%). Вплив усіх інших ефектів на відгук коливається в межах кількох відсотків.

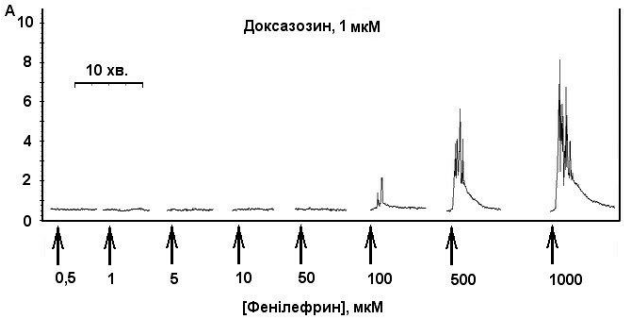
Одержані багатофакторні математичні моделі (1) і (2) інформативно й адекватно описують досліджувані залежності. Моделі є стійкими щодо структур рівнянь регресії та їх коефіцієнтів.

Create PDF files without this message by purchasing novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

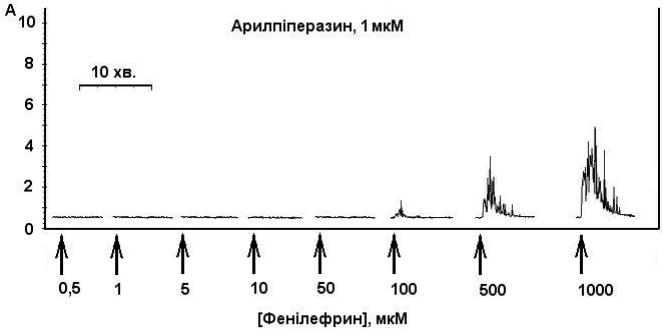
У міографічних дослідженнях фенілефрин у концентраціях від 0,5 до 1000 мкМ спричинює дозозалежні скорочення сім'явиносної протоки щурів (рис. 3.1). Досліджувані альфа$_1$-АБ – доксазозин та АП-1 – у концентрації 1 мкМ знижують амплітуду фенілефрин-індукованих скорочень (рис. 3.2, 3.3).



1



2



3

Рис. 3. Скорочення *vas deferens*, викликані фенілефрином в концентраціях від 0,5 до 1000 мкМ (1), на тлі доксазозину в концентрації 1 мкМ (2) та АП-3 в концентрації 1 мкМ (3).

Create PDF files without this message by purchasing novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

Доксазозин викликає дозозалежне зниження інтенсивності скорочень *vas deferens* під впливом фенілефрину (рис. 4). Це відображається на кривих залежності доза-ефект паралельним зміщенням EC_{50} у бік вищих концентрацій агоніста, що відповідає моделі конкурентного антагонізму; pA_2 для доксазозину у проведених дослідженнях становить 8,51±0,8 (рис. 4).

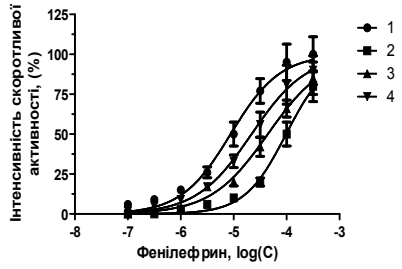


Рис. 4. Залежність доза-ефект для фенілефрину (1), на тлі доксазозину в концентраціях 3 нМ (2), 10 нМ (3), 30 нМ (4); pA_2=8,51±0,8 (n=6; p<0,05).

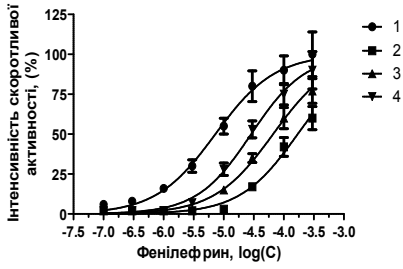


Рис. 5. Залежність доза-ефект для фенілефрину (1), на тлі АП-1 в концентраціях 3 нМ (2), 10 нМ (3), 30 нМ (4); pA_2=8,85±0,9 (n=6; p<0,05).

На рис. 5 наведено залежність доза-ефект для фенілефрину на тлі АП-1. Для сполук АП-1, N-(2-(4-о-толілпіперазин-1-іл)етил)нікотинаміду (АП-2) та N-(2-(4-п-толілпіперазин-1-іл)етил)нікотинаміду (АП-3) здійснено дослідження квантово-хімічних і топологічних дескрипторів. Згідно з розрахунками за моделлю (2) очікувані значення pA_2 становили: 9,18; 7,72; 5,95. Експериментальне дослідження pA_2 сполук АП-1, АП-2 та АП-3 проводили з метою валідації статистичної моделі (2) залежності альфа$_1$-адреноблокуючої активності арилпіперазинів.

Згідно з даними рис. 3-5 досліджувані АП, як і доксазозин, виявляють конкурентну альфа$_1$-адреноблокуючу активність на ізольованому *vas deferens*. Показники pA_2 для цих сполук становлять: АП-1 – 8,85±0,9; АП-2 – 7,5±0,8; АП-3 – 5,59±0,85. Спираючись на результати розрахункового експерименту та дослідження *in vitro*, можна зробити висновки, що сполуки з класу арилпіперазинів мають альфа$_1$-адреноблокуючу активність, порівнювану з класичним препаратом альфа$_1$-АБ – доксазозином; математична QSAR-модель (2) дає змогу в процесі скринінгу на основі квантово-хімічних розрахунків прогнозувати співвідношення показника pA_2 для арилпіперазинів.

До центру зв'язування антагоністів в альфа$_{1A}$-АР за даними мутагенетичного аналізу та попередніх досліджень, описаних у літературі, можуть входити такі амінокислотні залишки: Ser^{192}, Asp^{106}, Thr^{111}, Ser^{188} (D. Perez, 2007). В дисертаційні роботі показано, що в структурі комплексу,

Create PDF files without this message by purchasing novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

який доксазозин утворює з альфа$_{1A}$-АР, метокси-групи хіназолінового циклу електростатично взаємодіють з Asp^{106} та Ser^{192}. Піперазиновий фрагмент розташовується паралельно до Arg^{166}. Навколо бензодіксанового фрагменту розташовуються неполярні амінокислоти – Phe^{308} та Gly^{295}. Енергія зв'язування комплексу становить -38,67 кДж/моль. Альфа$_1$-АБ апорфінової структури утворює водневий зв'язок між протоном біля атому нітрогену та киснем Ser^{188}. Енергія комплексу складає -27,97 кДж/моль. При формуванні комплексу АП з альфа$_{1A}$-АР також утворюється водневий зв'язок між протоном в піперазиновому фрагменті та киснем Ser^{188}. У взаємодію з лігандом також вступають Val^{107}, Cys^{110}, Arg^{166}, Asp^{106}, Gln^{177}, Ile^{178}, Tyr^{316}, Met^{292}, Val^{185}, Ala^{189}, Ser^{296}, Pro^{293}, Phe^{289}, Phe^{288}, Trp^{285}. Енергія зв'язування для вказаного комплексу становить -40,78 кДж/моль. Таким чином, для всіх досліджуваних комплексів розраховані негативні енергії зв'язування, що свідчить про можливість їх утворення при взаємодії лігандів з АР. Дані, отримані за результатами молекулярного докінгу, можуть бути використані для доповнення фармакофорної моделі альфа$_1$-АБ та підвищення ефективності скринінгу нових препаратів даного класу.

Характеристики зв'язаної води в системі САЛ-доксазозин наведені в табл. 3 (C_{uw}^{s}, C_{uw}^{w} – концентрації сильнозв'язаної (SBW) та слабкозв'язаної (WBW) незамерзаючої води; ΔG – залежність диференціальної енергії Гіббса від C_{uw}; ΔS – величина міжфазної енергії біологічного об'єкта), C_{Dox} – концентрація доксазозину.

Таблиця 3

Характеристики шарів зв'язаної води в 5% розчинах альбуміну з доксазозином

C_{Dox}, %	C_{uw}^{s}, мг/г	C_{uw}^{w}, мг/г	ΔG^{s}, кДж/моль	ΔG^{w}, кДж/моль	ΔS, Дж/г
0	480	320	-2,3	-0,5	29,4
0,1	130	50	-2,3	-0,7	5,1
0,2	440	260	-1,7	-0,5	14,6
0,4	530	220	-1,9	-0,5	17,8
0,6	550	450	-2,3	-0,5	33,2

За даними табл. 3 мінімальні значення концентрації як SBW, так і WBW спостерігаються для зразка, що містить 0,1% доксазозину. Для нього концентрація SBW зменшується більш ніж втричі, а WBW – в 6,5 разів. З підвищенням C_{dox} до 0,2%, концентрація SBW знову збільшується і при $C_{dox} \geq 0{,}4\%$ стає більшою, ніж для вихідного розчину САЛ, який не містив доксазозину. Концентрація WBW суттєво зростає лише для зразка, який містить 0,6% доксазозину.

Create PDF files without this message by purchasing novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

Однією з головних причин зміни співвідношення внесків різних типів зв'язаної води може бути зміна об'ємів заповнених водою порожнин різного розміру, локалізованих як усередині білкових глобул, так і в міжмолекулярному просторі. Оскільки лінійні розміри білкових глобул не перевищують 4 нм, можна очікувати, що внутрішні порожнини мають менші розміри. Зіставляючи величину зміни вільної енергії Гіббса з радіусами заповнених водою порожнин, можна дійти висновку, що WBW відповідає порожнинам, розмір яких перевищує розмір білкових глобул. Таким чином, основна частина WBW – це вода, яка міститься в міжглобулярному просторі. З підвищенням C_{Dox} відбувається переважне зростання внеску від пор (порожнин) різного розміру. Для зразка, який містив 0,1% доксазозину, зареєстровано зменшення об'єму всіх типів заповнених водою компартментів із сильно- та слабкозв'язаною водою, що свідчить про компактизацію молекул САЛ під впливом доксазозину. Під час взаємодії з даною сполукою білкові молекули стають значно більш компактними та формують менше число місць зв'язування з іншими білковими молекулами.

Дослідження системи САЛ-фенілефрин показали, що препарат цілковито зв'язується з білковими молекулами доти, доки його концентрація не перевищить 0,1%. Максимальна дегідратація САЛ сягає 600 мг/г і супроводжується значною конформаційною перебудовою білкових глобул, в яких унаслідок взаємодії з препаратом різко зменшується об'єм гідрофільних порожнин.

У субдомені САЛ ІВ сайт зв'язування низькомолекулярних лігандів утворений 20 амінокислотними залишками. Під час взаємодії з САЛ доксазозин утворює водневий зв'язок між атомом оксигену та ОН-групою Tyr^{138}. Відбувається взаємодія доксазозину з такими амінокислотними залишками, як Leu^{115}, Met^{123}, Phe^{134}, Phe^{149}, Tyr^{161}, Leu^{185}, Arg^{186}, Gly^{189}, Leu^{185}, Ile^{142}. Зв'язування доксазозину з гідрофобними амінокислотами САЛ зумовлене слабкою полярністю молекули самого препарату.

За результатами МТТ-тесту доксазозин достовірно спричинює загибель 50-60% гепатоцитів (клітинна культура Hep G2) у концентрації 4 мкМ та тривалості культивування 24 та 48 годин, що відповідає даним візуального контролю росту клітинної культури. За концентрації препарату 20 мкМ у культурі зберігається лише 9% живих клітин після 24 годин та 5% після 48 годин. Виживання клітин під впливом доксазозину в концентраціях 0,8 та 0,16 мкМ розрізняється не достовірно (78 та 85% відповідно). Таким чином, спостерігається дозозалежний цитотоксичний вплив доксазозину на культуру гепатоцитів.

Під час культивування клітин лінії Hep G2 з АП-1 протягом 24 годин не спостерігається достовірної різниці з контролем, тобто ця речовина не проявляє цитотоксичної дії. Однак після обробки гепатоцитів АП-1 у концентрації 40 мкМ протягом 48 годин живими залишаються лише 65% клітин. Підвищення концентрації АП-1 до 200 мкМ зменшує кількість живих клітин до 50%.

Create PDF files without this message by purchasing novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

За результатами МТТ-тесту доксазозин достовірно викликає загибель 98% клітин лінії HeLa при концентрації 40 мкМ. При концентрації препарату 8 мкМ у культурі зберігається лише 78% живих клітин. Тобто, відбувається дозозалежний цитотоксичний вплив доксазозину на культуру клітин HeLa. Під час культивування клітин лінії HeLa протягом 24 годин АП-1 не виявляє цитотоксичної дії (відсоток живих клітин достовірно не відрізняється від контрольного досліду). Таким чином, проведені дослідження підтверджують, що вплив альфа$_1$-АБ на проліферацію клітин залежить від хімічної структури і характерний для похідних хіназоліну.

При спектрофотометричних дослідженнях додавання ДНК до розчину доксазозину поступово зменшувало поглинання даного розчину при 332 нм. Це явище можна пояснити зниженням концентрації доксазозину у розчині за рахунок утворення комплексів з ДНК, які відрізняються спектром оптичної густини від чистого розчину доксазозину. Розрахована константа стійкості комплексу доксазозину та ДНК становить 99 (±0,6) M^{-1}, а кількість пар основ ДНК, що приймають участь у зв'язуванні доксазозину – 1,7 (±0,3). За результатами гель-електрофорезу встановлено, що під дією доксазозину в концентраціях 5, 20, 40 μМ ДНК змінює свою нативну структуру.

Результати квантово-хімічних досліджень свідчать, що доксазозин має властивості інтеркалятора. При цьому в ланцюг ДНК вбудовується не вся молекула, а лише хіназоліновий фрагмент. Піперазиновий фрагмент доксазозину не знаходиться в одній площині з хіназоліновим фрагментом і залишається збоку від ланцюга ДНК. Утворення комплексу є енергетично вигідним, оскільки його ΔE складає -33,20 кДж/моль. Похідні арилпіперазину не мають хіназолінового фрагменту і не є інтеркаляторами. Тому їх вплив на проліферацію клітин значно менш виражений, ніж у доксазозину.

ВИСНОВКИ

У роботі проведено моделювання електронно-просторової будови молекул альфа$_1$-АБ, похідних хіназоліну, апорфіну, АП. Досліджені молекулярні механізми взаємодії цих сполук з альфа$_1$-АР, САЛ, ДНК. Проаналізована залежність фармакологічних ефектів препаратів від параметрів структури молекул.

1. Афінність похідних апорфіну до альфа$_1$-АР визначається зарядами на атомах карбону C^8, C^{11}, C^4 і топологічними дескрипторами (сума валентних ступенів, топологічний діаметр, загальна молекулярна зв'язаність, індекс Вінера).

2. На афінність похідних АП до альфа$_1$-АР впливають заряди на атомах нітрогену N^{10}, карбону C^{12}, C^6, C^8, електростатичний потенціал на атомах карбону C^1, C^5, константа зв'язування з альбуміном, а також дипольний момент, молекулярна маса, топологічний діаметр молекул.

Create PDF files without this message by purchasing novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

3. Залежність функціональних показників зв'язування похідних апорфіну та АП з альфа$_1$-АР описана у вигляді поліноміальних QSAR-моделей. Константи зв'язування (pA_2) арилпіперазинів з альфа$_1$-АР, отримані за допомогою QSAR-моделі, статистично відповідають результатам досліджень на ізольованій сім'явиносній протоці щурів.

4. Методом ^{1}Н ЯМР-спектроскопії показано, що взаємодія САЛ з доксазозином та фенілефрином за концентрації препаратів 0,1% спричинює зменшення об'єму всіх типів заповнених водою компартментів у білковій глобулі (дегідратація становить 600 мг/г) і супроводжується значною конформаційною перебудовою молекул альбуміну.

5. За результатами молекулярного докінгу центр зв'язування адреноблокаторів включає такі амінокислотні залишки:

з альфа$_1$-АР: Ser^{192}, Asp^{106}, Ser^{188}, Gln^{177}, Ile^{178}, Tyr^{316}, Met^{292};

з САЛ: Leu^{115}, Met^{123}, Phe^{134}, Phe^{149}, Tyr^{161}, Leu^{185}, Arg^{186}, Leu^{185}, Ile^{142}.

Комплекси САЛ та альфа$_1$-АР з адреноблокаторами стабілізуються водневими зв'язками та гідрофобною взаємодією.

6. Доксазозин у цитологічних дослідженнях на культурах клітин HeLa та Hep G2 проявляє дозозалежний цитотоксичний ефект у концентраціях від 4 до 200 мкМ. Альфа$_1$-АБ із групи арилпіперазинів має менш виражену здатність до гальмування проліферації клітин, яка спостерігається при концентрації препарату 40 мкМ.

7. Методом спектрофотометричного титрування та гель-електрофорезу підтверджено наявність фізико-хімічної взаємодії доксазозину з ДНК ($K_{ст} = 0{,}99\times10^2\ M^{-1}$). Молекулярно-фармакологічний аналіз показує, що доксазозин зв'язується з ДНК по типу інтеркаляторів. Хіназоліновий фрагмент вступає у стекінг-взаємодію з нітрогенистими основами з енергією -33,20 кДж/моль. У похідних АП відсутній хіназоліновий фрагмент, тому їх вплив на проліферацію клітин значно менш виражений, аніж у доксазозину.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Чекман І. С. Методи комп'ютерних розрахунків у квантовій фармакології / І. С. Чекман, О. О. Казакова, Т. Ю. Небесна // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2008. – № 1. – С. 48–56. (Внесок здобувача: пошук літературних джерел, аналіз і узагальнення інформації, написання статті).

2. Чекман І. С. Квантово-хімічні та топологічні дескриптори в дослідженнях залежності «структура-активність» (огляд літератури та власних досліджень) / І. С. Чекман, О. О. Казакова, Т. Ю. Небесна // Журн. Акад. мед. наук України. – 2008. – Т. 14, № 4. – С. 636–649. (Внесок здобувача: пошук літературних джерел, аналіз і узагальнення інформації, написання статті).

Create PDF files without this message by purchasing novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

3. Небесна Т. Ю. Дослідження електронної структури та квантово-фармакологічних властивостей молекули альфа$_1$-адреноміметика мезатону / Т. Ю. Небесна // Наук. вісн. Нац. мед. ун-ту ім. О.О. Богомольця. – 2007. – № 4. – С. 66–73.

4. Чекман І. С. Залежність між альфа$_{1A}$-адреноблокувальною активністю та квантово-хімічними показниками похідних апорфіну / І. С. Чекман, Т. Ю. Небесна, П. М. Бабіч // Доп. НАН України. – 2008. – № 5. – С. 192–196. (Внесок здобувача: розрахунок молекулярних дескрипторів, розробка QSAR-моделі, аналіз і узагальнення результатів, участь у написанні статті).

5. Влияние доксазозина на состояние воды в молекулах сывороточного альбумина человека / И. С. Чекман, В. Н. Барвинченко, Т. Ю. Небесная, Н. Ф. Косачевская, В. В. Туров // Журн. Акад. мед. наук України. – 2009. – Т. 15, № 4. – С. 818–826. (Внесок здобувача: дослідження впливу доксазозину на стан води в молекулах САЛ, аналіз і узагальнення результатів, участь у написанні статті).

6. Чекман І. С. Дослідження фізико-хімічної взаємодії доксазозину з ДНК: фармакологічний аспект / І. С. Чекман, Т. Ю. Небесна // Вісн. пробл. біології і медицини. – 2009. – Вип. 4. – С. 103–107. (Внесок здобувача: проведення спектрофотометричних досліджень та гель-електрофорезу, аналіз і узагальнення результатів, участь у написанні статті).

7. Розробка математичної моделі залежності альфа$_1$-адреноблокуючої активності похідних арилпіперазину від структури молекул / Т. Ю. Небесна, І. С. Чекман, О. О. Казакова, П. М. Бабіч // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2010. – № 1-2 (14-15). – С. 82–89. (Внесок здобувача: розрахунок молекулярних дескрипторів, розробка QSAR-моделі, аналіз і узагальнення результатів, участь у написанні статті).

8. Дослідження взаємодії альфа-адреноміметика мезатону з молекулами сироваткового альбуміну за даними 1Н ЯМР спектроскопії / І. С. Чекман, В. Н. Барвінченко, Т. Ю. Небесна, В. В. Туров // Мед. хімія. – 2010. – Т. 12, № 1. – С. 5–10. (Внесок здобувача: дослідження впливу мезатону на стан води в молекулах САЛ, аналіз і узагальнення результатів, участь у написанні статті).

9. Пат. № 46700 Україна, МПК А61К 31/00. Спосіб визначення альфа$_{1A}$-адреноблокуючої активності похідних апорфіну / Т. Ю. Небесна, І. С. Чекман, П. М. Бабіч; заявник Національний медичний університет імені О.О. Богомольця. – № u 2009 10952; заявл. 30.10.2009; опубл. 25.12.2009, Бюл. № 24. (Внесок здобувача: обгрунтування спосібу визначення альфа$_{1A}$-адреноблокуючої активності похідних апорфіну, підготовка та оформлення заявки).

10. Пат. № 48423 Україна, МПК А61К 31/00. Спосіб визначення альфа$_1$-адреноблокуючої активності похідних арилпіперазину / Т. Ю. Небесна, І. С. Чекман, О. О. Казакова, П. М. Бабіч; заявник Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця. – № u 2009 13462;

Create PDF files without this message by purchasing novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

заявл. 24.12.2009; опубл. 10.03.2010, Бюл. № 5. (Внесок здобувача: обгрунтування способу визначення альфа$_1$-адреноблокуючої активності похідних арилпіперазину, підготовка та оформлення заявки).

11. Небесна Т. Ю. Комп'ютерне моделювання лікарських засобів: квантово-фармакологічний аспект / Т. Ю. Небесна // Хист. – 2007. – № 9. – С. 164.

12. Небесна Т. Ю. Дослідження топологічних дескрипторів фармакологічної активності антигіпертензивних препаратів / Т. Ю. Небесна // Укр. кардіол. журнал. – 2007. – № 5. – С. 129.

13. Небесна Т. Ю. Дослідження залежності структура-активність для похідних апорфіну з альфа$_{1A}$-адреноблокуючими властивостями / Т. Ю. Небесна // Вісн. Вінниц. Нац. мед. ун-ту. – 2007. – № 2/2. – С. 792–793.

14. Небесна Т. Ю. Квантова фармакологія: етично-науковий аспект / Т. Ю. Небесна // Наук. вісн. Нац. мед. ун-ту ім. О. О. Богомольця. – 2008. – спец. випуск. – С. 138.

15. Чекман І. С. Квантово-фармакологічні дослідження в розробці та вивченні лікарських засобів / І. С. Чекман, Т. Ю. Небесна, М. О. Говоруха // Биологически-активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения : тез. докл. науч.-практ. конференции, 25–30 мая 2009 г. – К., 2009. – С. 192.

16. Nebesna T. Yu. Interactions of alpha$_1$-adrenergic blocker doxazosin with biomolecules / T. Yu. Nebesna, I. S. Chekman // 8 International congress of medical sciences, 7–10 May, 2009 : abstract book. – Sofia, 2009. – P. 79.

17. Небесна Т. Ю. Дослідження взаємодії альфа$_1$-адренорецепторів з антагоністами групи арилпіперазину методом гомологічного моделювання та молекулярного докінгу / Т. Ю. Небесна // Укр. наук.-мед. молодіж. журнал. – 2009. – № 3. – С. 342.

18. Небесна Т. Ю. Молекулярні механізми побічної дії альфа$_1$-адреноблокаторів та безпека фармакотерапії / Т. Ю. Небесна // Безопасность лекарств: от разработки до медицинского применения : материалы Второй науч.-практ. конференции, 3–4 дек. 2009 г. – К., 2009. – С. 71.

19. Небесна Т. Ю. Дослідження цитотоксичних ефектів препаратів, що застосовуються для лікування соціально-значущих захворювань / Т. Ю. Небесна // Укр. наук.-мед. молодіж. журнал. – 2010. – спец. випуск. – С. 135.

АНОТАЦІЯ

Небесна Т. Ю. Молекулярно-фармакологічні основи взаємодії альфа$_1$-адреноблокаторів з рецепторами, альбуміном та ДНК. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія. – Національний фармацевтичний університет, Харків, 2010.

Create PDF files without this message by purchasing novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

Дисертаційна робота присвячена вивченню молекулярних механізмів взаємодії між альфа$_1$-адреноблокаторами та адренорецепторами, сироватковим альбуміном людини, ДНК.

У результаті досліджень розроблено QSAR-моделі залежності альфа$_1$-адреноблокуючої активності похідних апорфіну та арилпіперазинів від квантово-хімічних та топологічних дескрипторів. Показано, що константи зв'язування арилпіперазинів з альфа$_1$-адренорецепторами, отримані за допомогою QSAR-моделі, статистично відповідають результатам досліджень на ізольованій сім'явиносній протоці щурів. Встановлено, що взаємодія сироваткового альбуміну людини з доксазозином супроводжується значною конформаційною перебудовою молекул альбуміну. Доксазозин у дослідженнях на культурах клітин HeLa та Hep G2 виявляє дозозалежний цитотоксичний ефект у концентраціях від 4 до 200 мкМ. Альфа$_1$-адреноблокатор із групи арилпіперазинів має менш виражену властивість гальмувати проліферацію клітин, яка спостерігається при концентрації препарату 40 мкМ. Методом спектрофотометричного титрування та гель-електрофорезу підтверджено наявність фізико-хімічної взаємодії доксазозину з ДНК. Молекулярно-фармакологічний аналіз показує, що доксазозин зв'язується з ДНК по типу інтеркаляторів.

Ключові слова: альфа$_1$-адреноблокатори, залежність «структура-активність», молекулярні дескриптори.

АННОТАЦИЯ

Небесная Т. Ю. Молекулярно-фармакологические основы взаимодействия альфа$_1$-адреноблокаторов с рецепторами, альбумином и ДНК. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.03.05 – фармакология. – Национальный фармацевтический университет, Харьков, 2010.

Диссертационная работа посвящена исследованию молекулярных механизмов взаимодействия альфа$_1$-адреноблокаторов с рецепторами, альбумином и ДНК.

В результате исследований разработаны QSAR-модели зависимости альфа$_1$-адреноблокирующей активности производных апорфина и арилпиперазинов от квантово-химических и топологических дескрипторов. Показано, что константы связывания арилпиперазинов с альфа$_1$-адренорецепторами, полученные с помощью QSAR-модели, статистически соответствуют результатам исследований на изолированном симявыносящем протоке крыс. Установлено, что взаимодействие сывороточного альбумина человека с доксазозином сопровождается значительной конформационной перестройкой молекул альбумина. Доксазозин в цитологических исследованиях на культурах клеток HeLa и Hep G2 проявляет дозозависимый цитотоксический эффект в концентрациях от 4 до 200 мкМ. Альфа$_1$-

Create PDF files without this message by purchasing novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

адреноблокатор из группы арилпиперазинов имеет менее выраженную способность к торможению пролиферации клеток, которая наблюдается при концентрации препарата 40 мкМ. Методами спектрофотометрического титрования и гель-электрофореза подтверждено наличие физико-химического взаимодействия доксазозина с ДНК. Молекулярно-фармакологический анализ показывает, что доксазозин связывается с ДНК по типу интеркаляторов.

Ключевые слова: альфа$_1$-адреноблокаторы, зависимость «структура-активность», молекулярные дескрипторы.

ABSTRACT

Nebesna T. Yu. Molecular pharmacological grounds of interaction alpha$_1$-adrenergic blockers with receptors, albumin and DNA. – The manuscript.

The thesis is for reaching the scientific degree of candidate of pharmaceutical sciences (Ph.D.) on specialty 14.03.05 – pharmacology. – National pharmaceutical university, Kharkov, 2010.

The thesis is devoted to the study of quantum-chemical and pharmacological properties of alpha$_1$-adrenergic blockers to determine the quantitative structure-activity relationship (QSAR) in this group of drugs, as well as studying the molecular mechanisms of interaction between alpha$_1$-adrenergic blockers and adrenoceptors, human serum albumin, DNA.

The dependence of alpha$_1$-adrenergic blockers (different chemical groups) pharmacological activity on the electronic and spatial properties of their molecules were determined. Physicochemical processes accompanying the binding of doxazosin and phenylephrine with human serum albumin, by ^{1}H NMR spectroscopy were studied. Computer simulations of molecular mechanisms of interaction alpha$_1$-adrenergic blockers with alpha$_1$-adrenoceptors and human serum albumin by molecular docking have been performed. Research of the cytotoxic activity of alpha$_1$-adrenergic blockers and analyzis the physical-chemical and quantum-chemical mechanisms of this process were made.

As a result of research QSAR-models for predicting alpha$_1$-adrenoceptor blocking activity of aporphine and arylpiperazine derivatives from quantum-chemical and topological descriptors were developed. Affinity of aporphine derivatives to alpha$_1$-adrenoceptors is determined by charges on carbon atoms C8, C11, C4 and topological descriptors (sum of valence degrees, topological diameter, the total molecular connectivity, Wiener index). Affinity of arylpiperazine derivatives to alpha$_1$-adrenoceptors is determined by charges on nitrogen N10, carbon C12, C6, C8 atoms, electrostatic potential of carbon atoms C1, C5, binding constant to albumin, and dipole moment, molecular weight, topological diameter of molecules.

Doxazosin and arylpiperazine derivative displayed similar potency in vas deferens (pA_2=8.51±0.8 and 8.85±0.9, respectively). It has been shown that the

Create PDF files without this message by purchasing novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

binding constants for arylpiperazines with alpha$_1$-adrenoceptors predicted by QSAR-model are statistically consistent with the results of studies on isolated rats *vas deferens*.

The interaction of human serum albumin with doxazosin and phenylephrine at a concentration of 0.1% of drugs causes a decrease in the volume of all types of water-filled compartments in the protein globule and is accompanied by a significant conformational rearrangement of albumin molecules. The results of molecular docking suggest that binding center of adrenoblokers includes amino acids in alpha$_1$-adrenergic receptor: Ser192, Asp106, Ser188, Gln177, Ile178, Tyr316, Met292; in human serum albumin: Leu115, Met123, Phe134, Phe149, Tyr161, Leu185, Arg186, Leu185, Ile142. Human serum albumin and alpha$_1$-adrenergic receptor complexes with adrenergic blockers are stabilized by hydrogen bonds and hydrophobic interactions.

Doxazosin in cytological studies on cultures of HeLa and Hep G2 cells exhibits a dose-dependent cytotoxic effect at concentrations ranging from 4 to 200 μM. Alpha$_1$-adrenergic blocker from the arylpiperazines group has a less pronounced ability to inhibition of cell proliferation, which is observed at drug concentrations 40 μM. Spectral changes in UV absorption titration shows the interaction of doxazosin with the DNA double helix. The binding constant for the interaction between doxazosin and DNA was K = 99 (±0,6) M^{-1} and the binding site size was 1,7 (±0.3) base pairs. Destruction of DNA with increasing concentrations of the doxazosin in agarose gel has been observed. Molecular pharmacologic analysis showed that doxazosin is associated with the DNA as intercalator.

The dependence of the cytotoxic effect of alpha$_1$-adrenergic blockers from chemical structure is a theoretical basis for synthesis of new compounds that do not affect cell proliferation and show no adverse effects on the cardiovascular system. Data about doxazosin binding site in human serum albumin expands knowledge of this drug pharmacokinetics and enable prediction of its interaction with other drugs, characterized by high affinity to plasma proteins. The results are methodologically important for pharmacology and pharmacy. Proposed methods of quantum-chemical and topological descriptors calculation for the receptor-targeted dugs, and their statistical analysis can be used to build predictive QSAR-models for compounds of other pharmacological groups.

Key words: alpha$_1$-adrenergic blockers, quantitative structure-activity relationships, molecular descriptors.

Create PDF files without this message by purchasing novaPDF printer (http://www.novapdf.com)