

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
фармацевтичний факультет
кафедра фармацевтичної хімії

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

з теми: «Аналіз перспективних біотаргетів та розробка алгоритму *in silico* пошуку антипаркінсонічних агентів»

Виконала: здобувачка вищої освіти Фм-19 (4,10 д)-05
спеціальності 226 Фармація, промислова фармація
освітньої програми Фармація

Тетяна МОГИЛЬНА

Керівник: професор закладу вищої освіти кафедри
фармацевтичної хімії, д.фарм.н., професор

Ганна СЕВЕРІНА

Рецензент: професор закладу вищої освіти кафедри
медичної хімії, д.фарм. н., професор

Ілля ПОДОЛЬСЬКИЙ

АНОТАЦІЯ

За результатами детального аналізу патогенезу та фармакотерапії хвороби Паркінсона визначені терапевтично значущі антипаркінсонічні біомішені. За результатами аналізу Protein Data Bank сепаровані доступні макромолекули у конформації з найбільш важливими антипаркінсонічними агентами та деталізовано амінокислотні взаємодії в активних сайтах. Проведено процедуру валідації методологій молекулярного докінгу за нативними лігандами для можливості їх застосування в подальших *in silico* дослідженнях при визначенні молекулярних механізмів антипаркінсонічної дії нових сполук. Проаналізовано існуючі *in vivo* моделі, які застосовують для скринінгу, визначено взаємозв'язок «макромолекула — ліганд — механізм дії — фармакологічна модель» та сформовано алгоритм *in silico* дослідження при пошуку антипаркінсонічних агентів.

Робота складається із вступу, п'яти розділів, загальних висновків, списку літератури. Робота викладена на 44 сторінках, ілюстрована 4 таблицями, 13 малюнків.

Ключові слова: хвороба Паркінсона, молекулярний докінг, дофамінові рецептори, глутаматні рецептори, моноамінооксидаза.

ANNOTATION

Based on a detailed analysis of the pathogenesis and pharmacotherapy of Parkinson's disease, therapeutically relevant anti-Parkinsonian biotargets were identified. Based on the results of the Protein Data Bank analysis, the available macromolecules in conformation with the most important antiparkinsonian agents were separated and the amino acid interactions in the active sites were detailed. The molecular docking methodologies using native ligands were validated for the possibility of their application in further *in silico* studies to determine the molecular

mechanisms of antiparkinsonian action of new compounds. The existing in vivo models used for screening are analysed, the relationship "macro-molecule - ligand - mechanism of action – pharmacological model" is defined, and an algorithm for in silico studies in the search for antiparkinsonian agents is formed.

The work consists of an introduction, five chapters, general conclusions, and a list of references. The work is presented on 44 pages, illustrated with 4 tables and 13 figures.

Keywords: Parkinson's disease, molecular docking, dopamine receptors, glutamate receptors, monoamine oxidase.

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень	7
Вступ	9
РОЗДІЛ 1 Паркінсонізм: епідеміологія, погляд на патогенез та стратегії лікування	12
1.1 Епідеміологія	12
1.2 Причини виникнення	12
1.2.1 Накопичення білка альфа-синуклеїну	12
1.2.2 Хронічне нейрозапалення.	13
1.2.3 Вплив "середовище-середовище"	14
1.2.4 Порушення роботи PGC-1 α	14
1.2.5 Накопичення заліза, підвищений оксидативний стрес і пошкодження перекисного окислення ліпідів	15
1.2.6 Генетична схильність	15
1.2.7 Фармакологічний анамнез	16
1.3 Препарати, які застосовуються в фармакотерапії хвороби Паркінсона	16
1.3.1 Попередники дофаміну	16
1.3.2 Антихолінергічні засоби	17
1.3.3 Антиглутаматергічні засоби	18
1.3.4 Препарати з класу інгібітори MAO-A та B	18
1.3.5 Агоністи дофаміну	20
1.3.6 Інгібітори катехол-О-метилтрансферази	22
1.3.7 Антагоніст рецепторів аденозину A ₂	23
РОЗДІЛ 2 Аналіз доступних макромолекул дофамінових рецепторів для <i>in silico</i> досліджень	24
2.1 Характеристика дофамінових рецепторів як біотаргетів	24

2.2	Аналіз макромолекул дофамінових рецепторів та валідація методології докінгу	26
	Висновки до розділу 2	29
РОЗДІЛ 3	Аналіз доступних макромолекул моноамінооксидази та її лігандів	30
3.1	Характеристика ензимів моноамінооксидази як біотаргетів	30
3.2	Аналіз доступних макромолекул MAO та валідація методології молекулярного докінгу	31
	Висновки до розділу 3	34
РОЗДІЛ 4	Аналіз макромолекул глутамінових рецепторів та їх лігандів	36
4.1	Характеристика іонотропних глутаматних рецепторів як біотаргетів	36
4.2	Аналіз макромолекул іонотропних NMDA-рецепторів та валідація методології молекулярного докінгу	38
4.3	Характеристика метаботропних глутаматних рецепторів як біотаргетів	40
4.4	Аналіз макромолекул метаботропних рецепторів глутамату та валідація методології молекулярного докінгу	43
	Висновки до розділу 4	45
РОЗДІЛ 5	Характеристика <i>in vivo</i> моделей та алгоритм <i>in silico</i> дослідження антипаркінсонічної активності	47
5.1	<i>In vivo</i> моделі дослідження антипаркінсонічної активності	47
5.1.1	<i>In vivo</i> модель – введення резерпіну	47
5.1.2	<i>In vivo</i> модель – введення галоперидолу	48
5.1.3	Гідроксильований аналог дофаміну 6-OHDA на моделі гризунів	48

5.1.4	Введення МФТП приматам для прояву паркінсонічного синдрому	49
5.1.5	Рибки даніо - потенційна модель ХП	50
5.2	Розробка алгоритму <i>in silico</i> дослідження антипаркінсонічних агентів	51
	Висновки до розділу 5.2	52
	ВИСНОВКИ	53

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

α -Syn, SNCA	альфа-синуклеїн
UPS	убіквітин-протеасомна система
TLR	Toll-подібні рецептори
NFs	нейротрофічні фактори
GSTT1	глутатіон-S-трансфераза-T1
(PGC)-1 α	рецептор-гамма-коактиватор, що активується проліфератором пероксисом
GBA	глюкоцереброзидаза
LRRK2	повторна кіназа 2
PON1	параоксоназа 1
ALDH2	альдегіддегідрогеназа
mGluRs	метаботропні глутаматні рецептори
iGluRs	іонотропні глутаматні рецептори
DRG	дорсальні корінцеві ганглії
LTP	довготривала потенціація
LTD	довготривала депресія
PKC	протеїнкіназа C
IPSC	інгібіторні постсинаптичні струми
PKA	протеїнкіназа A
AMPA	α -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонова кислота
NMDA	N-метил-d-аспартат
CMA	шаперон-опосередкована автофагія;
MAPK	мітоген-активована протеїнкіназа
MAO	моноамінооксидаза
МФТП	1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридин
ХП	Хвороба Паркінсона

АЛП	автофагічно-лізосомальні шляхи
ГЕБ	гематоенцефалічний бар'єр
АФК	активні форми кисню
6-ОНДА	6-гідроксидопамін
МХП	моногенна Хвороба Паркінсона
ЦНС	центральна нервова система
ПК	пірамідна кора
ЛНТ	латеральний нюховий тракт

ВСТУП

Актуальність теми.

Хвороба Паркінсона вважається складним прогресуючим нейродегенеративним захворюванням, яке було описане Джеймсом Паркінсоном у його публікації 1817 року «Нарис про тремтячий параліч». [1] Наразі лікування дозволяє лише полегшити симптоматику захворювання тому пошук нових біологічно активних речовин залишається вкрай важливим питанням сьогодення. Сучасні технології щодо виділення білкових макромолекул у конформації з відповідними лігандами, їх кристалографічний аналіз, деталізація взаємозв'язків «ліганд-рецептор» і визначення молекулярних механізмів модуляції, агонізму, антагонізму або інгібування – відкривають можливості для попереднього *in silico* пошуку потенційних лікарських засобів, що дозволяє оптимізувати drug-design нових молекул.

Мета дослідження: аналіз та систематизація доступних макромолекул біотаргетів у конформації з антипаркінсонічними лігандами, валідація методологій докінгу за нативними лігандами та розробка алгоритму *in silico* пошуку антипаркінсонічних агентів щодо механізму дії та *in vivo* моделей фармакологічного скринінгу.

Для досягнення поставленої мети були поставлені такі завдання:

1. Опрацювати літературні джерела щодо механізмів патогенезу, напрямків фармакокорекції та сучасних лікарських засобів для лікування ХП;
2. Проаналізувати та систематизувати наявні в Protein Data Bank доступні макромолекули терапевтично важливих рецепторів та ензимів у конформації з сучасними антипаркінсонічними агентами;
3. Схарактеризувати будову макромолекул, амінокислотний склад експериментально визначених активних сайтів біомішеней – глутаматних та дофамінових рецепторів, ензимів моноамінооксидаз;

4. Валідувати методології докінга за нативними референс-лігандами, розрахувати енергії зв'язування, схарактеризувати відтворюваність експериментально визначених взаємодій в активному сайті;
5. Проаналізувати *in vivo* методики при доклінічному дослідженні антипаркінсонічних агентів;
6. Побудувати алгоритм поетапного *in silico* дослідження нових БАР щодо бажаного механізму дії для оптимізації *in vivo* фармакологічного скринінгу.

Об'єкт дослідження – аналіз баз даних та мішень-орієнтований молекулярний докінг.

Предмет дослідження – доступні макромолекули біотаргетів у конформації з антипаркінсонічними лігандами, *in vivo* моделі фармакологічного скринінгу.

Методи дослідження. Protein Data Bank (PDB) як основна база для пошуку та аналізу кристалографованих біотаргетів. Для визначення координат розміщення нативних лігандів використали Grid box, також у ході дослідження були задіяні такі програми, як BioviaDraw2021, Chem3D, AutoDockTools – 1.5.6, Discovery Studio V17.2.0.16349, AutoDock Vina.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані дані щодо взаємозв'язку «макроолекула – ліганд – механізм дії – фармакологічна модель» та валідовані за нативними антипаркінсонічними лігандами методології дозволяють застосовувати їх для *in silico* досліджень потенційних лікарських засобів та раціоналізувати дизайн нових молекул з дофамінергічним та глутаматергічним механізмами дії. Зібраний матеріал дозволить полегшити, в подальшому, пошук та оптимізувати фармакологічні дослідження, що значною мірою скоротить час, трудові та матеріальні ресурси, а головне – збільшить шанс виявити найбільш ефективні речовини для лікування хвороби Паркінсона.

Елементи наукових досліджень. Візуалізовано доступні антипаркінсонічні сполуки в активних сайтах досліджувальних рецепторів для подальшого, ефективного застосування при лікуванні, а також валідовані за нативними антипаркінсонічними лігандами методологія докінгових досліджень. Розрахована аффіність нативних-референс лігандів до активних центрів молекул.

Апробація результатів дослідження і публікації. Результати випускної кваліфікаційної роботи були представлені на секційному засіданні кафедри фармацевтичної хімії в рамках XXX Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених та студентів «Актуальні питання створення нових лікарських засобів» (19 квітня 2024 р.), у конференції в Литві «Contemporary Pharmacy: Issues, Challenges and Expectations 2024». Тези доповіді опубліковані у збірнику конференції.

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи. Кваліфікаційна робота складається із вступу, п'яти розділів, загальних висновків, списку літератури. Робота викладена на 42 сторінках, ілюстрована 4 таблицями, 13 рисунками. Список використаної літератури містить 64 найменувань.

РОЗДІЛ 1

КЛЮЧОВІ АСПЕКТИ РОЗВИТКУ ТА ТЕРАПІЇ ХВОРОБИ ПАРКІНСОНА (огляд літератури)

Хвороба Паркінсона (ХП) є поширеним нейродегенеративним захворюванням, що характеризується насамперед погіршенням рухової активності внаслідок ураження дофамінергічної нігростріатальної системи. [1] На ризик розвитку ХП впливає багато факторів генетичного походження та навколишнього середовища. Ці чинники сходяться на певних шляхах, включаючи мітохондріальну дисфункцію, окислювальний стрес, агрегацію білків, порушення аутофагії та нейрозапалення. Зрештою, лікування ХП може зосередитися на цілеспрямованій терапії для патофізіологічно визначених підтипів пацієнтів з ХП та дією на різноманітні рецептори. [2]

1.1. Епідеміологія

Епідеміологія захворювання варіює залежно від географічного розташування та методології досліджень. В Європі, за оцінками, вона становить від 257 до 1400 випадків на 100 000 жителів. [3] Чоловіки страждають більше, ніж жінки, особливо у віковій групі 50-59 років де поширеність становить 134 чоловіки та 41 жінку на 100 000 осіб. [4] Ця закономірність може відображати важливість певних факторів у виникненні ХП та їх взаємодію з іншими змінними, такими як гени, рівень гормонів, вплив вагітності та різних професій або впливу навколишнього середовища. [5] В Україні – 134-154 випадки на 100 000 населення. Частіше хворіють чоловіки 73%, ніж жінки – 27%. Щорічно в Україні реєструється близько 6–10 тисяч нових випадків хвороби, щорічна захворюваність складає 12,1 на 100 000 населення. [6]

1.2. Причини виникнення ХП

1.2.1. Накопичення білка альфа-синуклеїну (α -Syn).

ХП належить до групи синуклеїнопатій, що характеризуються накопиченням білка α -Syn. Усі ознаки вказують на те, що олігомери або фібрили α -Syn відіграють вирішальну роль у поширенні патології. [7] При ХП цей білок аномально агрегує в нейронній тканині, утворюючи тільця Леві - патологічну характеристику цієї групи захворювань. Накопичення тілець Леві передують нейровізуалізаційним ознакам загибелі нейронів, що відповідає процесу нейродегенерації, який розвивається повільно і поширюється на різні ділянки нервової системи, а саме на чорну речовину компактного тіла, з подальшою втратою дофамінергічних нейронів і відповідними руховими симптомами захворювання, які корелюють зі ступенем нейродегенерації. [5] Попри інтенсивні дослідження, точний механізм деградації α -Syn залишається суперечливим і змінюється залежно від використовуваної системи. [8]

1.2.2.Хронічне нейрозапалення

Нові переконливі докази підтверджують, що хронічне нейрозапалення, спричинене порушенням механізмів вродженого та/або адаптивного імунітету, є одним з основних факторів, що сприяють розвитку ХП, при якому прозапальний стан може спровокувати або сприяти втраті нейронів. [9] Нейрозапалення виникає внаслідок перехресних перешкод між різними типами клітин у мозку. Нейрони, астроцити, мікрогліальні або ендотеліальні клітини є чутливими до агрегатів α -Syn, що може призвести до порушення їх гомеостатичних функцій та секреції прозапальних цитокінів, хемокінів та підвищення експресії рецепторів. Крім того, периферичні імунні клітини рекрутуються в паренхіму мозку. Ці імуномодулюючі медіатори та/або відсутність ефективних механізмів розсмоктування ще більше посилюють прозапальне середовище. [10] Мікроглія- це резидентні макрофаги ЦНС, вперше описані Піо дель Ріо Ортегою. В цілому, хронічно активована мікроглія виділяє високий рівень прозапальних медіаторів які пошкоджують нейрони і ще

більше її активують, що призводить до циклу зворотного зв'язку сприяючи запаленню та нейродегенерації. [10]

1.2.3. Вплив "середовище-середовище" на патогенез ХП

Комбінований вплив розчинників, пестицидів, металів та інших промислових побічних продуктів також необхідно враховувати, оскільки адитивні або синергічні ефекти цих сполук впливають на їхню індивідуальну токсикокінетику і, зрештою, на їхню комбіновану нейротоксичність. Наприклад, прості суміші, такі як два нейротоксиканти - марганець і мідь, спричиняли синергічну взаємодію з дофаміном. Характеристика сумішей та їхньої нейротоксичності може допомогти визначити стратегії втручання на основі відносного екологічного навантаження, наприклад, впливу металів у питній воді, впливу, пов'язаного з військовою службою, та осіб, які живуть у районах з високим рівнем забруднення повітря. Оскільки інгаляція є основним шляхом впливу багатьох забруднювачів навколишнього середовища, пов'язаних з ХП (наприклад, пестицидів, забруднення повітря, летких органічних сполук), патологія Леві в нюховій цибулині може бути безпосередньо пов'язана саме з цим шляхом впливу. На додаток, куріння, яке знижує ризик розвитку ХП, змінює носовий епітелій, що може впливати на ризик, пов'язаний з інгаляційними експозиціями або патогенами. Аналогічно, вплив фосфорорганічних пестицидів, таких як Діазинон і Хлорпірифос, спричиняє транскрипційні зміни генів, пов'язані з ХП. [11]

1.2.4. Порушення роботи рецептор-гамма-коактиватора, що активується проліфератором пероксисом (PGC)-1 α .

PGC-1 α – це транскрипційний коактиватор, який діє як так званий головний регулятор мітохондріального метаболізму. [12] Рецептор γ -коактиватора проліферації пероксисом γ є коактиватором численних факторів

транскрипції, які впливають на метаболізм і запалення шляхом активації ядерних рецепторів. Наприклад, він регулює процеси метаболізму ліпідів, виробництва клітинної енергії та біогенезу мітохондрій. У деяких дослідженнях повідомляється про зниження рівня PGC-1 α у посмертних зразках мозку пацієнтів з ХП, а також показано, що гіперекспресія PGC-1 α є захисною в моделі ХП, викликаній МРТР.[13]

1.2.5. Накопичення заліза, підвищений оксидативний стрес і пошкодження перекисного окислення ліпідів

Ферроптоз, регульований залізо залежний шлях загибелі клітин, що включає летальне накопичення перекисів ліпідів, має кілька спільних рис з патофізіологією ХП. Цікаво, що α -Syn функціонально пов'язаний з метаболізмом як заліза, так і ліпідів, що вказує на можливий взаємозв'язок між порушенням регуляції α -Syn та іншими патологічними ознаками ХП, пов'язаними з фероптозом. Цікаво, що кілька патологічних ознак ХП є відомими ключовими особливостями та/або тригерами фероптотичного шляху загибелі клітин. До них належать перевантаження залізом, підвищене перекисне окислення ліпідів, зниження рівня GSH, зниження регуляції ХСТ та зниження CoQ10. Разом ці добре встановлені ознаки захворювань переконливо свідчать про те, що цей регульований шлях загибелі клітин бере участь у нейродегенерації, що спостерігається при ХП. [14]

1.2.6. Генетична схильність

Генетика моногенної ХП зумовлена складними взаємодіями між генетичними та середовищними факторами. Мутації в SNCA (α -Syn), LRRK2 (кіназа 2, багата на лейцин) та VPS35 (компонент ретромерного комплексу VPS35) спричиняють аутосомно-домінантну форму ХП, тоді як мутації в PRKN (паркін), PINK1 (PTEN-індукована кіназа 1) та PARK7 (онкоген DJ-1)

асоціюються з аутосомно-рецесивною формою ХП. [15] Генетична мутація, пов'язана з ХП, що найчастіше зустрічається в популяції, відбувається в гені глюкоцереброзидази (GBA). Механізм, за допомогою якого мутації гена GBA підвищують ризик розвитку ХП, можливо, включає моделі посилення функції, які сприяють агрегації α -Syn, хоча цей зв'язок ще належить з'ясувати. У таких пацієнтів руховий фенотип подібний до спорадичної форми захворювання, хоча існує більший ризик когнітивної дисфункції. Серед найпоширеніших причин дегенеративного паркінсонізму - деменція з тільцями Леві, МСА, ПСП, кортико-базальна дегенерація та синдром крихкої Х-треморо-атаксії (FXTAS). [5]

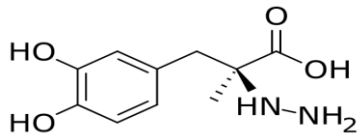
1.2.7. Фармакологічний анамнез.

Фармакологічний анамнез завжди повинен бути переглянутий, оскільки ятрогенез є другою за частотою причиною паркінсонізму, яка призводить до скерування на консультацію до невролога, що має важливі терапевтичні та прогностичні наслідки. Незважаючи на часту асоціацію з антипсихотичними препаратами, особливо першого та деяких з другого покоління (наприклад, Галоперидол, Хлорпромазин, Рисперидон, Оланзапін), причиною паркінсонізму можуть бути й інші лікарські засоби, такі як антиеметики (наприклад, Метоклопрамід), парасимпатоміметики (наприклад, інгібітори ацетилхолінестерази), антагоністи кальцієвих каналів (наприклад, Флунаризин, Циннаризин, Триметазидин, Верапаміл), антиаритмічні (наприклад, Амідарон) та протиепілептичні препарати (наприклад, Вальпроєва кислота) також можуть бути залучені. [5]

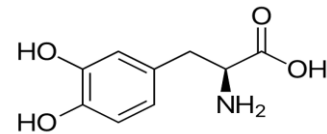
1.3. Препарати, які застосовуються в фармакотерапії ХП

1.3.1. Попередники дофаміну

Більшість пацієнтів з ХП потребують терапії Леводопою протягом 2 років від початку симптомів. Леводопа, найефективніший препарат у лікуванні ХП, майже завжди поєднується з Карбідопом або Бенсеразидом, інгібіторами декарбоксилази ароматичних кислот, які запобігають її периферичному метаболізму і помітно знижують ризик нудоти. Доведено, що збільшення співвідношення Карбідоп/Леводопа від поточного стандартного 1:4 збільшує час настання відсутності дискінезії та зменшує час відключення.



Карбідоп

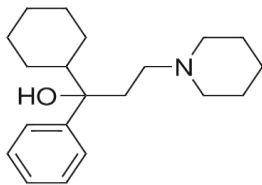


Леводопа

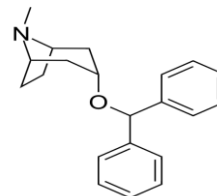
Механізм: Лєводопа циркулює в плазмі крові до гематоєнцефалічного бар'єра, де під дією стріатичних ферментів перетворюється на дофамін. Карбідопа інгібує розпад Лєводопи у периферичній плазмі шляхом пригнічення її карбоксилування, і таким чином збільшує доступність Лєводопи через гематоєнцефалічний бар'єр та зменшує периферичне утворення дофаміну. [16]

1.3.2. Антихолінергічні лікарські засоби

Антихолінергічні препарати, такі як Тригексифенідил і Бензтропін-протидіють впливу ацетилхоліну на мускаринові рецептори, постсинаптичні до стріарних інтернейронів. Вони переважно використовуються для зменшення тремору і не впливають на брадикінезію. [16]



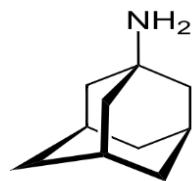
Тригексифенідил



Бензтропін

1.3.6. Антиглутаматергічні препарати.

Глутамат опосередковує нейротрансмісію більшості збудливих синапсів і є життєво важливим для нормальної фізіологічної функції мозку. [16]

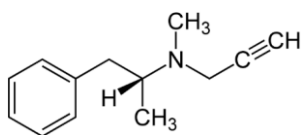


Амантадин

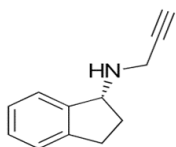
Амантадин маючи антиглутаматергічну дію, також стимулює вивільнення ендогенних запасів дофаміну, блокує його зворотне захоплення з синаптичної щілини та має антихолінергічні властивості. Встановлено, що пролонгована форма препарату, яку приймають перед сном, покращує як дискінезію, так і рухові флуктуації. [16]

1.3.4. Препарати з класу інгібітори MAO-A та Б

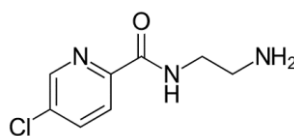
Селективні інгібітори MAO-B



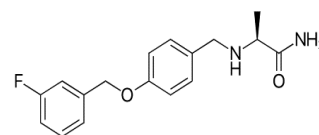
Селегілін



Разагілін



Лазабемід



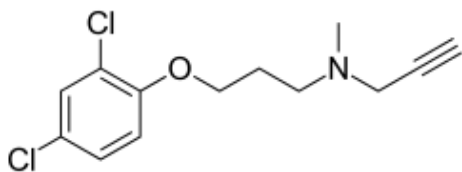
Сафінамід

Вище наведені препарати мають спільну властивість, а саме інгібування рецепторів MAO-B, проте мають різні механізми дії та ефекти. Селегілін та Разагілін відносяться до потужних, незворотних інгібіторів MAO, відіграють важливу роль у метаболізмі дофаміну. Проте, Селегілін на відміну від Разагіліну може підвищувати дофамінергічну активність, втручаючись у зворотне захоплення дофаміну в синапсі, в той час, як роль Разалгіну виступає у зниженні виснаження дофаміну в смугастому тілі головного мозку та полегшенні симптоматичних рухових дефіцитів при ХП. [16]

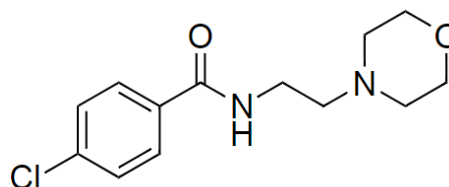
Лазабемід забезпечує подвійний ефект відносно дофаміну, він підвищує рівень нейромедіатора, що виробляється екзогенно введеною Леводопою і маючи оборотний механізм дії, блокує центральний метаболізм дофаміну що каталізується MAO-B, та уповільнює виснаження запасів нейромедіатора. Препарат може захищати організм від нейродегенерації при ХП шляхом зменшення утворення шкідливих побічних продуктів каталітичного циклу MAO-B. [17]

Ліцензований лікарський засіб Сафінамід для лікування "ідіопатичної хвороби Паркінсона як додаткова терапія до стабільної дози Леводопи окремо або в комбінації з іншими лікарськими засобами для лікування ХП у пацієнтів на середній та пізній стадіях хвороби, що коливаються", відрізняється від своїх попередників тим, що блокує залежні від напруги активовані натрієві канали і внутрішньоклітинний вхід кальцію, зменшуючи таким чином вивільнення глутамату в нейронах.

Селективні інгібітори MAO-A



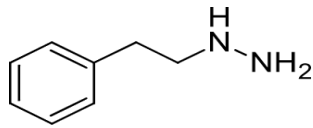
Клоргілін



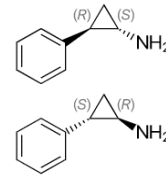
Моклобемід

Представники селективних інгібіторів MAO-A- Клоргілін та Моклобемід, завдяки своїй пригнічувальній дії призводять до зниження метаболізму і руйнування моноамінів у нейромедіаторах. Як наслідок, депресивні епізоди полегшуються через підвищення рівня моноамінів.

Неселективні інгібітори MAO



Фенелзин

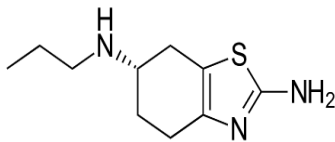


Транілципромін

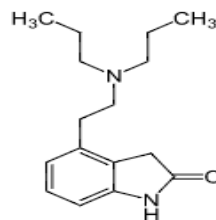
Механізм дії неселективних інгібіторів МАО полегшує депресивні симптоми, зокрема Фенелзин викликає підвищення рівня серотоніну, норадреналіну та дофаміну в нейроні, Транілципромін маючи складну будову, у вигляді рацемічної суміші двох стереоізомерів надає декілька механізмів дії, що полегшує лікування симптомів ХП. Так, (+)-ізомер є сильнішим інгібітором МАО як в організмі експериментальних тварин, так і в мозку людини, тоді як (-)-ізомер є більш ефективним інгібітором поглинання моноамінів. [18]

1.3.5. Агоністи дофаміну

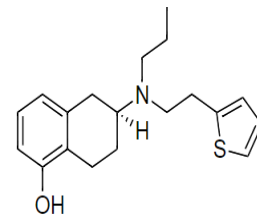
До поширених неерготичних агоністів дофаміну, що використовуються в клінічній практиці, належать Праміпексол, Ропінірол, Ротіготин, Бромкріптин, Перголід, Карбеголід та Лізурид. Агоністи дофаміну можуть використовуватися як монотерапія рухових симптомів або як додаткова терапія, коли симптоми недостатньо контролюються Леводопою або коли присутні рухові флуктуації.



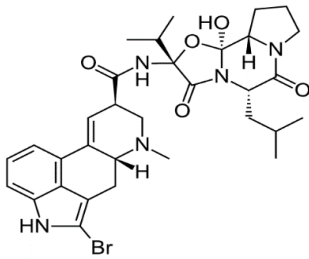
Праміпексол;



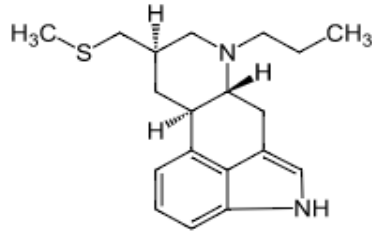
Ропінірол



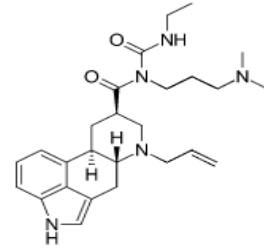
Ритигонін



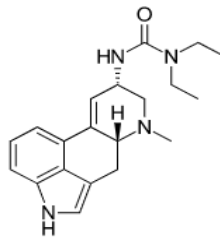
Бромкриптин



Перголід



Карбеголін



Лізурид

Кожен препарат з цієї групи має свій механізм дії, наприклад, Праміпексол зв'язуючись з дофаміновими рецепторами підродини D2, а також з рецепторами D3 та D4, може стимулювати активність дофаміну на нервах стріатуму та чорної субстанції.

Ропінірол має високу відносну специфічність *in vitro* та повну внутрішню активність щодо підтипів дофамінових рецепторів D2 та D3, зв'язуючись з більшою спорідненістю до D3, ніж до підтипів рецепторів D2 та D4. Хоча точний механізм дії невідомий, вважається, що він пов'язаний зі стимуляцією постсинаптичних дофамінових рецепторів D2-типу в хвостатому тілі мозку.

Ритигонін є неерговий агоніст дофамінових рецепторів зі специфічністю до D3-, D2- та D1-дофамінових рецепторів. Вважається, що його дія пов'язана зі стимуляцією постсинаптичних дофамінових авторецепторів D2-типу в чорній субстанції головного мозку, що призводить до покращення дофамінергічної передачі в рухових зонах базальних гангліїв, особливо в ділянках хвостатого ядра/путамена.

Прикладом напівсинтетичного похідного алкалоїду ріжків та агоністом дофамінових рецепторів є Бромкриптин, який активує постсинаптичні дофамінові рецептори в тубероінфундибулярному (пригнічуючи секрецію гіпофізарного пролактину) та нігростріальному шляхах (посилюючи координований руховий контроль). Парадоксальним чином викликає стійке пригнічення секреції гормону росту при акромегалії. Також може відбуватися порушення регуляції активності серотоніну в мозку.

Перголід - полегшує симптоми паркінсонізму, імовірно, шляхом безпосередньої стимуляції постсинаптичних дофамінових рецепторів у смугастому тілі. Знижує концентрацію пролактину в сироватці крові шляхом пригнічення вивільнення пролактину з передньої частки гіпофіза. Спричиняє тимчасове підвищення концентрації соматотропіну (гормону росту) в сироватці крові та зниження концентрації лютеїнізуючого гормону.

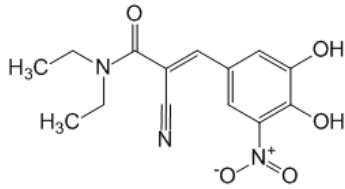
Каберголін має високу спорідненість до дофамінових D2-рецепторів і меншу спорідненість до D1, α_1 - і α_2 -адренергічних та серотонінових (5-HT1 і 5-HT2) рецепторів. Знижує концентрацію пролактину в сироватці крові шляхом пригнічення вивільнення пролактину з передньої частки гіпофіза (агоністична активність на D2-рецептори). [16]

Лізурид виявляє дофамінергічні, а отже, пролактин-редуючі властивості. Активна речовина має виражену афінність до дофамінових рецепторів у стріатумі та гіпофізі. [16]

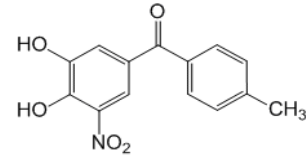
1.3.6. Інгібітори катехол-О-метилтрансфери

До представників цієї групи відносяться - Ентакапон, Толкапон і Опікапон, які блокують деградацію периферичної Леводопи, а Толкапон додатково блокує центральну деградацію Леводопи та дофаміну, підвищуючи їх центральний рівень. У присутності інгібітора декарбоксилази (наприклад, Карбідопи), селективні інгібітори (КОМТ) є основним шляхом розпаду

Леводопи. Інгібування КОМТ призводить до більш стійких рівнів Леводопи у плазмі крові та посилення центральної дофамінергічної активності. [16]



Ентакапон



Толкапон

1.3.7. Антагоніст рецепторів аденозину A2

У 2019 році FDA схвалила Істредєфілін (Nourianz), антагоніст аденозинових рецепторів A2, як додаткове лікування Леводопою/Карбідопою у пацієнтів з депресією, що не супроводжується епізодами. Препарат випускається у формі таблеток по 20 і 40 мг і дає помірну користь пацієнтам з асоційованими з Леводопою руховими коливаннями. [16]

Таким чином з огляду літератури зрозуміло, що причин виникнення та механізмів розвитку ХП безліч, арсенал наявних ЛЗ досить різноманітний, а наукові групи постійно працюють над пошуком ЛЗ для модуляції симптомів хвороби, але ж досі не вдається досягти не лише повного одужання пацієнтів, а й контрольованого перебігу хвороби.

РОЗДІЛ 2

АНАЛІЗ ДОСТУПНИХ МАКРОМОЛЕКУЛ ДОФАМІННОВИХ РЕЦЕПТОРІВ ДЛЯ *IN SILICO* ДОСЛІДЖЕНЬ

Роль дофаміна і дофамінових рецепторів у ХП вельми значуща, оскільки найголовніші симптоми – тремор і порушення координації тісно пов'язані і є першими провісниками цього захворювання.

2.1 Характеристика дофамінових рецепторів як біотаргетів

Дофамінові рецептори – це великі G-білокоспряжені метаботропні рецептори з яких виділяють п'ять підтипів: D1, D2, D3, D4 і D5. Ці підтипи поділяються на два підкласи: D1-подібні сімейні рецептори (типи 1 і 5) і D2-подібні сімейні рецептори (типи 2, 3 і 4). Чутливість до лікарських засобів і структура рецепторів типу 1 і типу 5 подібні, тоді як типи 2, 3 і 4 мають лише схожу структуру. [19]. Серед усіх типів дофамінових рецепторів для лікування ХП ключову роль відіграють D1 та D2-рецептори. У дослідженні мозкових антипсихотиків Seeman et al. мітили ділянку мозку дофаміном і повідомили, що зв'язування пригнічується наномолярними концентраціями неміченого Галоперидолу. Пізніше ця ділянка була названа D2-рецептором дофаміну. У хворих на паркінсонізм активація D2-подібних рецепторів відбувається через відкриття Na-каналів або збудження та закриття, або пригнічення K-каналів. Це може призводити до пригнічення нейронів-мішеней, що є кінцевим ефектом активації цих рецепторів. Вплив дофаміну на нейрон-мішень залежить від внутрішнього вмісту вторинного месенджера циклічного АМФ у цих нейронах і від типу рецепторів, присутніх на цій мембрані нейронів. D1-рецептори є найпоширеніші дофамінові рецептори в НС людини, а D2-рецептори є другими за поширеністю. До інших рецепторів, таких як D3, D4 та D5, також приділяється увага через їхню участь у різних клінічних проявах ХП.

Наприклад, D1 і D5 в основному беруть участь у постсинаптичному гальмуванні, а D2, D3 і D4- у пресинаптичних і постсинаптичних модифікаціях. Відмінності рецепторів D1 і D2 обумовлені різними ефекторними механізмами, різною спорідненістю до антагоністів та агоністів, а також різним розподілом у ЦНС. Терапевтична ефективність антипсихотичних препаратів, яка охоплює лікування ХП, тісніше пов'язана з D2-рецепторами, оскільки ці рецептори виявляють більшу афінність до цих препаратів. Таким чином, вони вважаються найважливішими місцями дії антипсихотичних препаратів. D1-рецептори схожі на D5-рецептори (50% гомологічності), але відрізняються від D2, D3, та D4 рецепторів. Їх спорідненість до різних типів дофамінергічних препаратів є подібною. Єдина особливість, яка відрізняє D1 і D5 рецептори – це сильніше зв'язування дофаміну D5-рецепторів у порівнянні з D1-рецепторами. D5-рецептори експресуються в ядрі гіпоталамуса. D5-рецептори відіграють певну роль у больовому процесі. [19]

D2-рецептори присутні в ядрі хвостатого мозку, спектрі, VTA та базальних гангліях. Первинною мішенню антипсихотичних препаратів вважаються D1 рецептори, але зараз вони вважаються несуттєвими для цих препаратів. Серед трьох D2-подібних рецепторів, D2-рецептори були безпосередньо пов'язані з антипсихотичними препаратами та блокуються ними. D1 рецептори при активації перетворюють аденілатциклазу на циклічний АМФ (вторинний месенджер). D2-рецептори інгібують аденілатциклазу, оскільки вона не має позитивного зв'язку з цим ферментом. Посередництво екстрапірамідної та поведінкової активності здійснюється за допомогою D2-рецепторів (постсинаптичних рецепторів). Дані рецептори блокуються нейролептиками (терапевтично ефективні) і активуються Бромокриптином (агоністом рецепторів), який використовується для лікування ХП. [19]

D2-подібні дофамінові рецептори

Дані молекули присутні в мигдалині, смугастому тілі та гіпокампі, гіпофізі, зазвичай контролюють поведінку людини. Коли дофамін зв'язується з D2-рецептором, він активується, на відміну від D1. Оскільки, D2 – це авторецептор, він може зупини синтез дофаміну і вивільнення його з клітин, завдяки цій функції дана група рецепторів надає можливість використання великої кількості препаратів при лікуванні ХП. [19]

Ці відкриття підкреслюють важливість ролі дофаміну та дофамінових рецепторів у патогенезі ХП і можуть вказувати на можливі шляхи лікування, спрямовані на їх модуляцію.

2.2 Аналіз макромолекул дофамінових рецепторів та валідація методології докінгу

З урахуванням важливості модуляції дофамінових рецепторів при лікуванні ХП, розробка нових високоафінних малих молекул є важливим завданням фармацевтичної науки. Інструментом сучасного раціонального дизайну лікарських засобів є *in silico* моделювання структури речовин. Тому ми розглянули за мету проаналізувати наявні у Protein Data Bank кристалографовані макромолекули терапевтично важливих для лікування ХП дофамінових рецепторів виключно у конформації з антипаркінсонічними лігандами в активному сайті, а також провести валідацію методології докінгу за нативними лігандами, що дозволить використовувати визначені параметри для подальших *in silico* досліджень при розробці нових антипаркінсонічних агентів.

Перелік усіх доступних для *in silico* досліджень макромолекул, валідаційні характеристики, координати та розміри Grid box, значення енергії зв'язування референс-лігандів наведені в таблиці 2.1 Валідацію методології докінгу здійснювали ре-докінгом нативних референс лігандів в активні сайти: алостеричного модулятора SKF-81297 та неселективного агоніста – Бромокриптина та антагоніста – Респеридона.

Таблиця 2.1

Характеристика активних сайтів дофамінових рецепторів та параметри
молекулярного докінгу

Фермент	PDBID/ організм виділення	Ліганд	Сайт зв'язування	Grid box Координати/роз мір	Енергія зв'язуван ня, ккал/моль
D1/D5R	7LJC/7JVP/ Homo sapiens [20]	SKF-81297 алостеричний модулятор	Chain A Ser198, Asp103, Asn292, Leu190, Phe288, Phe289, Ile104, Val100	x = -65,23, y = 24,76, z = - 143,59; розмір x =15, y = 18, z = 20	-8,5
D2R	7JVR/ Escherichia coli, Homo sapiens [20]	Бромокриптин неселективний агоніст	Thr119, Ile184, Val115(4), Phe390, Val111, Ile184, Leu94, Val190(2), Phe110(2), Phe389 (2), Phe390, His393, Tyr408	x = -32,65, y = 148,96, z = - 17,97; розмір x =22, y = 20, z = 20	-11,5
	6CM4/ Homo sapiens [21]	Респеридон - антагоніст	Ser197, Cys118, Ser197, Thr412, Trp386(3), Phe390, Cys118, Val91, Leu94, Trp100, Phe110, Phe389, Tyr408, Val115, Cys118(2)	x = 118,45, y = 45,87, z = -32,12; розмір x =22, y = 20, z = 24	-12,1

Механізм алостеричної модуляції D1/D5 рецепторів був визначений після кристалографування білку із організму Homo sapiens у 2021 р. Визначено активний сайт та участь певних амінокислотних залишків для можливості модуляції рецептора [22]: водневі зв'язки з Ser198, Asp103, Asn292 та гідрофобні взаємодії з Leu190, Phe288, Phe289, Ile104, Val100. Валідність методології докінгу продемонстрована на рис. 2.1 а та в таблиці 2.1, де продемонстровано відтворення зв'язків після ре-докінгу нативного ліганда визначеного в експерименті [22].

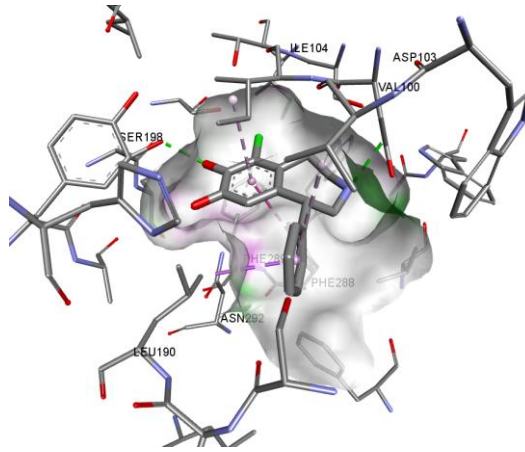
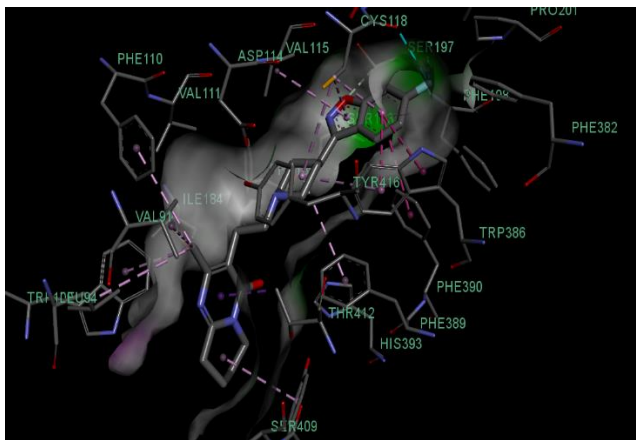
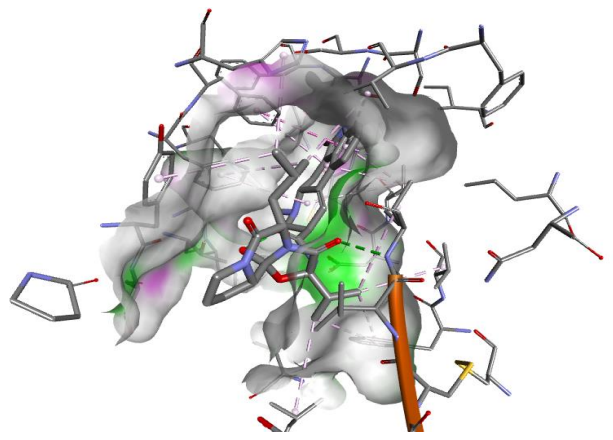


Рис. 2.1 Алостеричний модулятор в активному сайті D1/D5R SKF-81297, після процедури ре-докінгу.



а)



б)

Рис. 2.2 Розміщення референс-лігандів в активному сайті D2 рецептора: а) антагоніст Рисперидон та б) неселективний агоніст Бромкриптин.

Макромолекулу рецептора D2, у конформації з атипичним антипсихотиком Рисперидоном була кристалізована у 2018 р. (PDB ID 6CM4), шляхом виділення із *Spodoptera frugiperda* Homo sapiens [21]. Активний сайт формують амінокислоти Ser197 – водневі зв'язки, Cys118, Ser197 – Halogen (Fluorine), Thr412, Trp386(3), Phe390, Cys118, Val91, Leu94, Trp100, Phe110, Phe389, Tyr408, Val115, Cys118(2) – гідрофобні взаємодії. Валідність методології

докінгу продемонстрована на рис. 2.2 а та в таблиці 2.1, де відтворенно зв'язки визначені в експерименті [20].

Макромолекулу рецептора D2, виділена з *Escherichia coli* *Homo sapiens*, у конформації з Бромокриптином кристалізовано у 2021 році (PDB ID 5JVR). Експериментально визначена гідрофобна кишеня зв'язування Бромокриптину: водневі зв'язки Thr119, Ile184; гідрофобні взаємодії з Val115(4), Phe390, Val111, Ile184, Leu94, Val190(2), Phe110(2), Phe389 (2), Phe390, His393, Tyr408. Валідність методології докінгу продемонстрована на рис. 2.2 б та в таблиці 2.1, де очевидне відтворення зв'язків визначених в експерименті [20]. Афінність Бромокриптину до сайту зв'язування склала -11.5 ккал/моль.

Висновки до розділу 2

1. Проведено аналіз будови та терапевтичного значення модуляції дофамінових рецепторів різних типів при лікуванні ХП.
2. Проаналізовано доступні в Protein Data Bank макромолекули рецепторів типу D1/5 та D2 у конформації з терапевтично значущими для ХП лігандами.
3. Проведено валідацію процедури молекулярного докінгу за нативними лігандами: алостеричним модулятором D1/5 рецептора SKF-81297; неселективним агоністом D2 рецептора Бромокриптином та антагоністом Респеридоном.
4. Розраховано значення енергії зв'язування референс-лігандів, а також проведено деталізацію амінокислотних взаємодій в активних сайтах та порівняння з експериментально визначеними зв'язками.
5. Описано параметри молекулярного докінгу для вказаних дофамінових рецепторів, для можливості їх застосування в подальших *in silico* дослідженнях при розробці нових малих молекул.

РОЗДІЛ 3

АНАЛІЗ ДОСТУПНИХ МАКРОМОЛЕКУЛ МОНОАМІНООКСИДАЗИ ТА ЇЇ ЛІГАНДІВ

3.1 Характеристика ензимів моноамінооксидази як біотаргетів

Перше відкриття МАО ссавців було опубліковано майже 90 років тому (Nare1928), завдяки їх центральній ролі у метаболізмі нейромедіаторів, де спостерігали активність тирамінооксидази в печінці кролика. На додаток дотираміну, було виявлено, що фермент каталізує окислювальну деградацію ряду неврологічно важливих аміних субстратів, включаючи дофамін, норадреналін, адреналін, серотонін та фенетиламін. Акцептором електронів для окислення цих важливих первинних амінів є O_2 , який відновлюється безпосередньо до H_2O_2 . В наш час лікування ХП включає використання селективних інгібіторів МАО-В, таких як Расагілін і Сафінамід. Було показано, що інгібування МАО чинить загальний нейропротекторний ефект внаслідок зменшення окислювального стресу, спричиненого цими ферментами, що, як виявляється, має значення і в ненейронних контекстах. Ці ферменти характеризуються глобулярним водорозчинним основним тілом, яке прикріплене до мітохондріальної мембрани за допомогою С-кінцевої α -спіралі, подібно до інших бітопних мембранних білків. І в МАО-А, і в МАО-В активний центр ферменту складається з гідрофобної порожнини, вистеленої залишками, які є консервативними в обох ізоферментах, за винятком кількох деталей, що визначають специфічність до субстратів та інгібіторів. Зокрема, МАО-В людини має двопорожнинний активний центр, конформація якого залежить від розміру зв'язаного ліганду. [23] МАО-А дезамінує, зокрема, серотонін, норадреналін і тирамін і селективно інгібується низькими концентраціями (мкМ) Клоргіліну, тоді як МАО-В нечутливий до Клоргіліну і в мозку людини дезамінує ФЕА і,

значною мірою, дофамін. MAO типу А має найбільшу спорідненість до гідроксильованих амінів, таких як норадреналін і 5-НТ, тоді як MAO типу В має найбільшу спорідненість до негідроксильованих амінів, таких як β -фенілетиламін і бензиламін. Деякі аміни, зокрема DA і тирамін, мають однакову спорідненість до обох ізоформ ферменту. Використовуючи методи гібридизації *in situ* та імуногістохімії, MAO-A було локалізовано в норадренергічній перикарії блакитної плями, в той час, як MAO-B був найпоширенішим підтипом, експресованим в серотонінергічних тілах клітин ядра рафе і в гліальних клітинах. [24]

3.2 Аналіз доступних макромолекул MAO та валідація методології молекулярного докінгу

Розробка нових високоселективних інгібіторів MAO-B та MAO-A є важливим завданням, оскільки вони можуть модифікувати процеси нейродегенерації та/або запобігати її прогресуванню. Проаналізувавши чинні препарати-ліганди серед інгібіторів моноамінооксидази, нами були сепаровані ті, які виявляють найвищу ефективність для лікування ХП та оцінено наявність макромолекул MAO у конформації з відповідними лігандами у Protein Data Bank. Перелік усіх доступних для *in silico* досліджень макромолекул, валідаційні характеристики, координати та розміри Grid box та значення енергії зв'язування референс-ліганду наведені в таблиці 3.1 Валідацію методології докінгу здійснювали ре-докінгом нативного референс ліганда Сафінамід, Селегініну в активний сайт MAO-B.

Як видно на зображенні рис. 3.1 а, що конформація Сафінамід при референс взаємодії ідентична його експериментально доведеному розміщенню наведеному в літературі, Сафінамід вступає у всі необхідні взаємодії (за винятком Hydrogen Bond між амідною групою та фрагментами тирозину (Tyr

435, 343). Аналогічна ситуація спостерігається і для Селегіліну відтворюються усі експериментально визначені взаємодії (рис. 3.16)

Таблиця 3.1

Характеристика активних сайтів моноамінооксидази А та Б та параметри молекулярного докінгу

Фермент	PDBID/ організм виділення	Ліганд	Сайт зв'язування	Grid box Координати/розмір	Енергія зв'язування ккал/моль
МАО-Б	2V5Z/ Komagataella pastoris [25]	Сафінамід – селективний інгібітор (конкурентний)	Chain A Gln206(2), Ile199(2), Leu171, Cys172, Tyr326, Ile316	x = 51,90, y = 156,46, z = -28,56; розмір x =22, y = 24, z = 22	-9,5
	2BYB/ Komagataella pastoris [26]	Селегілін (депреніл) селективний інгібітор (незворотний)	Chain A Tyr435, Leu171(2), Ile199, Cys172, Tyr326, Leu171, Tyr326, Phe343(2), Tyr398(4)	x = 52,47, y = 156,38, z = 26,30; розмір x =10, y = 14, z = 10	-7,0
	1S2Q/ Komagataella pastoris [27]	Расагілін селективний інгібітор(нез воротний)	Arg42, Tyr60, Met436,Tyr60, Ser59, Gln206, Tyr435, Gly57, Leu171, Tyr326, Phe343, Trp388(5)	x = 72,47, y = 256,38, z = 76,30; розмір x =20, y = 24, z = 14	-7.2
МАО-А	2Z5X/Homo sapiens [28]	Гармін (селективний інгібітор)	Tyr 69, Tyr 407, Tyr 444, Phe 208, Phe 352, Asn 101, Gln 215, Cys 32, Ile 325, Leu 337. Val 93, Glu 95, Tyr 109, Pro 112, Phe 208, Asp212	x = 40,58, y = 26,93, z = -14,54; розмір x =22, y = 20, z = 20	-8.7

Також було оцінено здатність фіксуватися в активному сайті ще одного селективного інгібітора Расагіліну, однак його розміщення не відрізнялося від Селегіліну, тому на окремий рисунок не виносили.

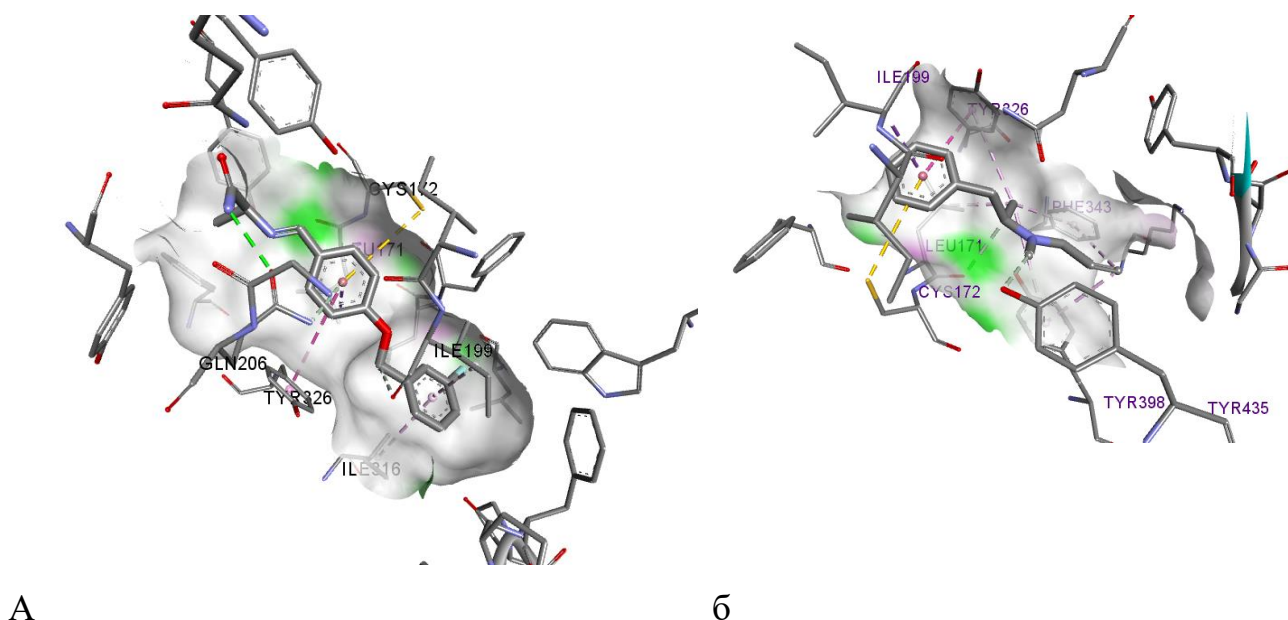


Рис. 3.1 Селективні інгібітори в активному сайті MAO-B: Сафінамід (а) та Селегілін (б) після процедури ре-докінгу.

Макромолекула ензиму MAO-A, виділена *Saccharomyces cerevisiae* Homo sapiens у конформації з алкалоїдом Гарміном, який її інгубіє, кристалізовано в 2019 році (PDB ID 2Z5X). Експериментально визначена гідрофобна кишеня зв'язування Гарміну Tyr 69, Tyr 407, Tyr 444, Ile 325, Phe 208, Asn 101, Phe 352, Gln 215, Cys 32, Leu 337. Гармін поєднується з ФАД двома водневими зв'язками. Валідність методології докінгу продемонстрована на рис. 3.2 та в таблиці 3.1, де очевидне відтворення зв'язків визначених в експерименті [28]. Афінність Гарміну до сайту зв'язування склала -8.7 ккал/моль.

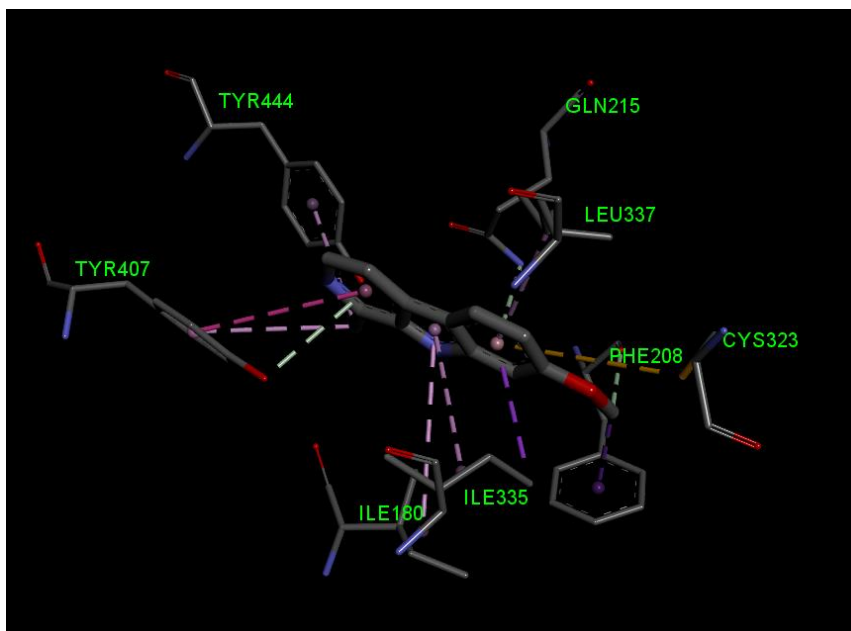


Рис. 3.2 Візуалізація Гарміну при референс конформації в активному сайті MAO-A

Висновки до розділу 3.

6. Проведено аналіз значення ферментів моноамінооксидази типів А та Б у розвитку та терапії ХП.
7. Проаналізовано доступні в Protein Data Bank макромолекули ензимів типів А та Б у конформації з терапевтично значущими для ХП лігандами.
8. Проведено валідацію процедури молекулярного докінгу за нативними лігандами: селективним інгібітором Сафінамідом, Селегініном, Расагіліном в активні сайти MAO-Б, а також селективного інгібітора Гарміну в активний сайт MAO-A.
9. Розраховано значення енергії зв'язування референс-лігандів, а також проведено деталізацію амінокислотних взаємодій в активних сайтах та порівняння з експериментально визначеними зв'язками.

10. Описано параметри молекулярного докінгу в ензими MAO-A та Б для можливості їх застосування в подальших *in silico* дослідженнях при розробці нових малих молекул.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ МАКРОМОЛЕКУЛ ГЛУТАМІНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ ТА ЇХ ЛІГАНДІВ

Глутамат опосередковує більшість збуджувальних нейротрансмісій у ЦНС ссавців шляхом зв'язування з метаботропними глутаматними рецепторами (mGluRs), які є рецепторами, пов'язаними з білком G, та іонотропними глутаматними рецепторами (iGluRs), які є катіонопроникними іонними каналами з лігандним затвором. Активація mGluRs та iGluRs викликає різні клітинні реакції.

4.1 Характеристика іонотропних глутаматних рецепторів як біотаргетів

iGluRs поділяються на різні функціональні класи, а саме: α -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонової кислоти (AMPA) рецептори, каїнатні рецептори, N-метил-d-аспартатні (NMDA) рецептори та GluD рецептори (також відомі як дельта- або δ -рецептори). [29]. Амінокислота глутамат, як збудливий нейромедіатор, відіграє ключову роль у порушенні нормальної функції базальних гангліїв, що регулюється через взаємодію з його рецепторними білками. Доведено, що глутаматні рецептори беруть участь у модуляції збудливості нейронів, вивільненні трансмітерів і довготривалій синаптичній пластичності, а також пов'язані зі зміненою нейротрансмісією при ХП. Тому вони вважаються новими мішенями для покращення терапевтичних стратегій, що використовуються для лікування ХП. [30]

Глутаматні рецептори типу NMDA – це іонні канали з лігандним затвором, які опосередковують Ca^{2+} -проникний компонент збудливої нейротрансмісії в ЦНС. Вони експресуються по всій ЦНС і відіграють ключову фізіологічну роль у синаптичних функціях, таких як синаптична пластичність, навчання та пам'ять. NMDA-рецептори також беруть участь у патофізіології деяких розладів ЦНС. NMDA-рецептори існують у вигляді різноманітного

набору підтипів, утворених варіаціями в збірці семи субодиниць (GluN1, GluN2A-D і GluN3A-B) в тетрамерні рецепторні комплекси. Ці підтипи NMDA-рецепторів мають унікальні структурні особливості, які пояснюють їхні відмінні функціональні та фармакологічні властивості, що дозволяють точно налаштувати їхню фізіологічну роль. Кілька унікальних властивостей відрізняють NMDA-рецептори від інших глутаматних рецепторів, включаючи потенціалзалежне блокування позаклітинним магнієм, високу проникність для кальцію і необхідність зв'язування двох лігандів – глутамату і гліцину (або d-серину) для активації каналу. [31]

AMPA-рецептори – це іонотропні глутаматні рецептори, які відіграють важливу роль у збудливій нейротрансмісії. AMPA-рецептори розташовані як на пресинаптичних, так і на постсинаптичних плазматичних мембранах. [32] AMPAR побудовані чотирма субодиницями (GluR1-4) і поділяються на GluR2-відсутні (Ca^{2+} -проникні AMPA-рецептори, CP-AMPA) та GluR2-вмісні AMPAR (Ca^{2+} -непроникні AMPA-рецептори, CI-AMPA). [33]. Субодиниці мають подібний розмір (приблизно 900 амінокислот кожна) і мають 68-73% ідентичності амінокислотної послідовності. Величезна кількість досліджень присвячена вивченню ролі постсинаптичних AMPA-рецепторів у нормальному та аномальному функціонуванні ЦНС ссавців. Ці дослідження показали, що зміни функціональних властивостей або кількості постсинаптичних AMPA-рецепторів є основними механізмами, що лежать в основі явищ синаптичної пластичності, надаючи молекулярне пояснення процесам навчання і пам'яті. І навпаки, роль AMPA-рецепторів на пресинаптичних терміналах поки що недостатньо з'ясована. Все більше даних свідчить про те, що пресинаптичні AMPA-рецептори можуть модулювати вивільнення різних нейротрансмітерів. Недавні дослідження також припускають, що пресинаптичні AMPA-рецептори можуть мати подвійні іонотропно-метаботропні властивості і що вони беруть участь у локальній регуляції динаміки актину як у дендритному, так і в

аксональному компартментах. Крім того, дані свідчать про ключову роль пресинаптичних AMPA-рецепторів в аксональній патології, в регуляції передачі болю і в фізіології слухової системи. [32]

4.2. Аналіз макромолекул іонотропних NMDA-рецепторів та валідація методології молекулярного докінгу

Розробка нових високоселективних модуляторів іонотропних рецепторів глутамату є важливим напрямком фармацевтичної хімії. Проаналізувавши наявні препарати-ліганди серед модуляторів цих рецепторів, нами були сепаровані ті, які виявляють найвищу ефективність для лікування ХП та оцінено наявність макромолекул iGluRs у конформації з відповідними лігандами у Protein Data Bank. Перелік усіх доступних для *in silico* досліджень макромолекул, валідаційні характеристики, координати та розміри Grid box, значення енергії зв'язування референс-ліганду наведені в таблиці 4.1. Валідацію методології докінгу здійснювали ре-докінгом нативних референс лігандів Іфенпроділу, NBQX, Талампанелу в активному сайті NMDA- та AMPA-рецепторів.

Макромолекула NMDA-рецептора, виділена *Xenopus laevis*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* у конформації з інгібітором Іфенпроділом, кристалізовано в 2016 році (PDB ID 5B3J). Експериментально визначена гідрофобна кишеня зв'язування Гарміну Glu236, Leu135(2), Phe114, Phe176, Ala107, Pro78, Ile111, Pro177. Валідність методології докінгу продемонстрована на рис. 4.1 та в таблиці 4.1, де показано відтворення зв'язків визначених в експерименті [34]. Афінність Іфенпроділу до сайту зв'язування склала -11.3 ккал/моль.

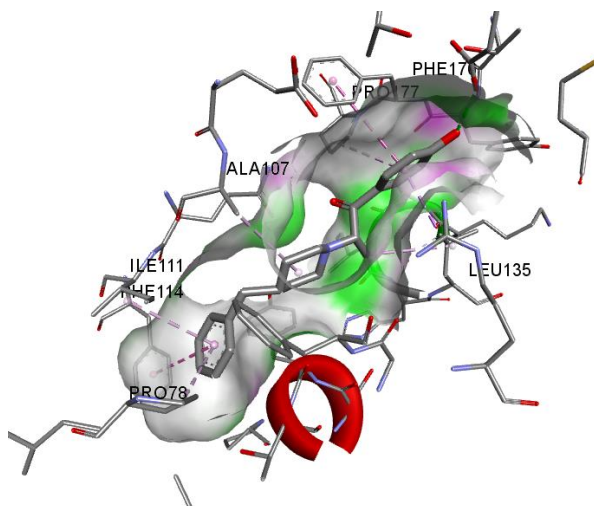


Рис. 4.1 Селективний інгібітор Іфенепроділ в активному сайті NMDA-рецептора після ре-докінгу

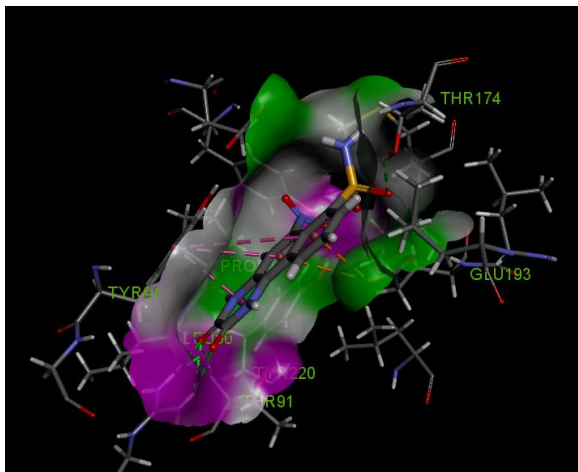
Таблиця 4.1

Характеристика активних сайтів NMDA- та AMPA- рецепторів та параметри молекулярного докінгу

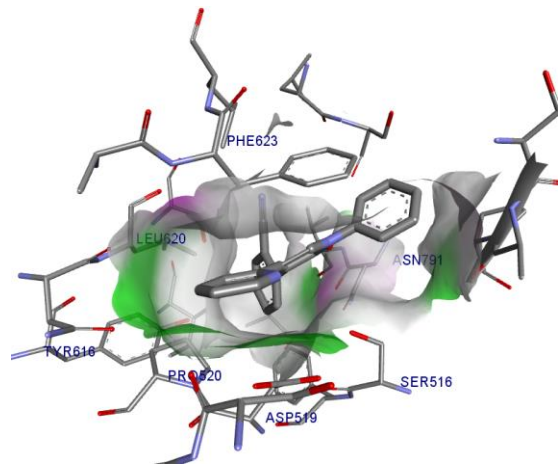
Рецептор	PDBID/ організм виділення	Ліганд	Сайт зв'язування	Grid box Координати/розмір	Енергія зв'язування, ккал/моль
NMDA	5B3J/ Trichoplusia ni [34]	Іфенпроділ НАМ	Chain A Glu236, Leu135(2), Phe114, Phe176, Ala107, Pro78, Ile111, Pro177	x = 85,79, y = 6,47, z = -31,77; розмір x =26, y = 22, z = 22	-11,3
AMPA	6FQH/ Rattus norvegicus [35]	NBQX НАМ	Thr91, Arg96(4), Thr174, Tyr220, Pro89, Leu90, Glu193(2), Tyr61 (3)	x = -0,22, y = 44,18, z = -5,31; розмір x =28, y = 26, z = 30	-8,2
	5L1G/ Rattus norvegicus [36]	Талампанел НАМ	Asn791 (2), Asp519, Ser516, Tyr616, Phe623(2), Leu620, Pro520	x = -34,85, y = - 6,07, z = -39,15; розмір x =32, y = 30, z = 26	-10,6

Макромолекули AMPA-рецепторів виділені у конформації з негативним алостеричним модулятором NBXQ з *Rattus norvegicus* в 2019 році (PDB ID

6FQH) [35] та у конформації з негативним алостеричним модулятором Талампанелем – у 2016 році (PDB ID 5L1G) [36]. Експериментально визначена гідрофобна кишенька зв'язування NBXQ Thr91, Arg96(4), Thr174, Tyr220, Pro89, Leu90, Glu193(2), Tyr61 (3), а Талампанел – Asn791 (2), Asp519, Ser516, Tyr616, Phe623(2), Leu620, Pro520. Валідність методології докінгу продемонстрована на рис. 4.2а, б та в таблиці 4.1, де показано відтворення зв'язків визначених в експерименті.



а)



б)

Рис. 4.2 Конформація негативних алостеричних модуляторів а) NBXQ та б) Талампанел в активному сайті АМРА-рецепторів після процедури ре-докінгу.

4.3 Характеристика метаботропних глутаматних рецепторів як біотаргетів
 Метаботропні глутаматні рецептори (mGlu) групи 1 – це G-білкові рецептори, що включають близькоспоріднені mGluR1 і 5, де mGluR1 існує у двох ізоформах, що відрізняються лише на С-кінці. Метаботропний GluR5 переважно локалізований у постсинапсі, де він регулює коротко- та довготривалу синаптичну пластичність, зокрема довготривалу депресію. Активація метаботропних mGluR1/5 через білки Gq/G11 призводить до ініціації фосфоліпази-С β , викликаючи таким чином IP3 і діацилгліцерину

сигналізацію. Крім того, активація mGluR1/5 може призводити до активації MAPK/ERK та MTOR/p70 S6 кінази, які беруть участь у синаптичній пластичності. Несинаптичний mGluR5 також існує, і нещодавно було показано, що він активує інші сигнальні системи, ніж синаптичні mGluRs. Негативні або позитивні алостеричні модулятори mGluR5 мають терапевтичний потенціал для низки розладів мозку, включаючи розумову відсталість з лабільною Х-хромосомою і шизофренію. Відповідно, mGluR5 вважається перспективною лікарською мішенню, спрямованою на полегшення різних неврологічних та психіатричних розладів шляхом фармакологічного втручання в активність рецептора. [37]

mGlu2/3 – це Gai/o-зв'язані рецептори, які переважно розташовані на пресинаптичних аксональних закінченнях у ЦНС. Фармакологічні дані свідчать про те, що кілька серин/треонінових протеїнкіназ мають здатність регулювати mGlu2/3 рецептори. Детальне картування залишків фосфорилювання показало, що протеїнкіназа A фосфорилує mGlu2/3 рецептори за специфічним сериновим сайтом на їх внутрішньоклітинному С-кінцевому хвості в гетерологічних клітинах або нейронах, що лежить в основі фізіологічної модуляції сигналізації mGlu2/3. Рецептори групи II мають традиційну мембранну топологію для GPCR класу C: великий позаклітинний N-кінець, внутрішньоклітинний С-кінець (СТ) і сім трансмембранних доменів, які дають початок трьом внутрішньоклітинним петлям. Рецептори mGlu2/3 дифузно експресуються в широких регіонах ЦНС, а mGlu3 також виявлено в В-лімфобластах. Помірний і високий рівень експресії mGlu2/3 в лімбічній системі, включаючи префронтальну кору, мигдалину, гіпокамп, таламус і стріатум, заслуговує на увагу, оскільки ці регіони підтримують емоції, навчання і пам'ять, мотивацію, винагороду і поведінку. Як пресинаптичні авторецептори, mGlu2/3 динамічно інгібують вивільнення глутамату для підтримки гомеостазу збудливої синаптичної передачі. Крім того, mGlu2/3 функціонують як гетерорецептори, що негативно модулюють

вивільнення неглютаматергічних передавачів, таких як інгібіторні амінокислоти, моноаміни та нейропептиди. [38]

Авто- та гетерорецептори mGluR4/7/8 групи III розташовані переважно на нервових закінченнях глутаматергічних кортикостріарних та ГАМК-ергічних стріатопалідарних шляхів відповідно. Їх активація інгібує аденілілциклазу та утворення цАМФ, тим самим обмежуючи подальшу активацію РКА. Як і в інших ділянках мозку, локалізація mGluRs групи III в базальних гангліях є переважно пресинаптичною. Як mGluR4, так і 7 пресинаптичних авторецепторів спостерігаються на глутаматергічних кортикостріальних терміналах. Вважається, що mGluR6 відіграє незначну роль у розвитку наркоманії. Порівняно з основним пресинаптичним розподілом, постсинаптичний розподіл mGluRs групи III в базальних гангліях є менш чітким і обмежується деякими постсинаптичними mGluR7 у стріарних нейронах. Рецептори групи III також інгібують ГАМК-ергічний стріатопалідарний шлях. L-AP4 пригнічує стріатично-викликані синаптичні відповіді, інгібіторні постсинаптичні струми (IPSC), у блідій кулі. Цей ефект може бути пов'язаний з інгібуванням вивільнення ГАМК зі стріатопаллідальних терміналів, а активація mGluR4, здається, має вирішальне значення. Таким чином, у глутаматергічних або ГАМК-ергічних синаптичних ділянках, досліджених до цього часу в схемі винагороди базальних гангліїв, mGluRs групи III (один або кілька підтипів) послідовно діють, щоб пригнічувати синаптичну передачу через пресинаптичний механізм. [39] До групи III – mGluR4, -6, -7, -8, які також з'єднуються з Gi/o і негативно модулюють активність аденілатциклази. Відомо, що mGluRs II і III групи також регулюють різні іонні канали, включаючи потенціалкеровані кальцієві канали. Показано, що mGluR4 і mGluR8 експресуються в клітинах нюхової цибулини. Відповідно до цих даних, застосування агоніста mGluR групи III, L-AP4, зменшує збуджувальну

синаптичну передачу в синапсі LOT-PC в декількох електрофізіологічних дослідженнях [40].

4.4. Аналіз макромолекул метаботропних рецепторів глутамату та валідація методології молекулярного докінгу

Проаналізувавши наявні препарати-ліганди серед модуляторів метаботропних рецепторів глутамату, нами були виділені ті, які мають значення для лікування ХП та оцінено наявність макромолекул iGluRs у конформації з відповідними лігандами у Protein Data Bank. Перелік усіх доступних для *in silico* досліджень макромолекул, валідаційні характеристики, координати та розміри Grid box, значення енергії зв'язування референс-ліганду наведені в таблиці 4.2. Валідацію методології докінгу здійснювали ре-докінгом нативних референс лігандів Мавоглюрану, LY379268, ADX88178.

Макромолекула трансмембранного домену mGluR1/5 рецептора, виділена *Spodoptera frugiperda* *Homo sapiens* у конформації з негативним алостеричним модулятором Мавоглюран, кристалізовано у 2014 році (PDB ID 4OO9). Експериментально визначена гідрофобна кишеня зв'язування Мавоглюрану: Asn747, Ser805(1), Ser809, Leu744, Val740, Ser654, Ala813, Ile625, Pro655, Leu744(2), Ile651, Val740, Pro743, Tyr659, Trp785, Phe788, Pro655. Валідність методології докінгу продемонстрована на рис. 4.3 та в таблиці 4.2, де показано відтворення зв'язків визначених в експерименті [41]. Афінність Мавоглюран до сайту зв'язування склала -8.7 ккал/моль.

Таблиця 4.2

Характеристика активних сайтів метаботропних рецепторів глутамату та параметри молекулярного докінгу

Рецептор	PDBID/ організм виділення	Ліганд	Сайт зв'язування	Grid box Координати/розмір	Енергія зв'язування, ккал/моль
mGluR1/5	4OO9/ Homo sapiens [41]	Мавоглюран НАМ	Chain A Asn747, Ser805(1), Ser809, Leu744, Val740, Ser654, Ala813, Ile625, Pro655, Leu744(2), Ile651, Val740, Pro743, Tyr659, Trp785, Phe788, Pro655	x = -24,24, y = 16,64, z = 42,92; розмір x =22, y = 24, z = 32	-8,7
mGlu2/3	4XAR/ Homo sapiens [42]	LY379268 ПАМ	Arg68(2), Ser151(2),Thr174(2), Ala172, Asp301, Ser149, Tyr150, Tyr222	x = 50,51, y = - 25,88, z = 8,92; розмір x =24, y = 25, z = 26	-8,2
mGluR4,6 ,7,8	8JD5/ Homo sapiens [43]	ADX88178 ПАМ	Arg57, Glu902, Arg61(2),Glu902(6), Arg57, Ser143, Thr168, Ser145, Tyr216	x = 34,22, y = -- 134,21, z = 14,43; розмір x =20, y = 22, z = 20	-7,2

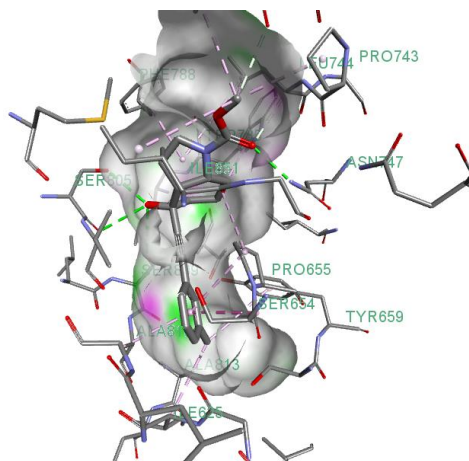
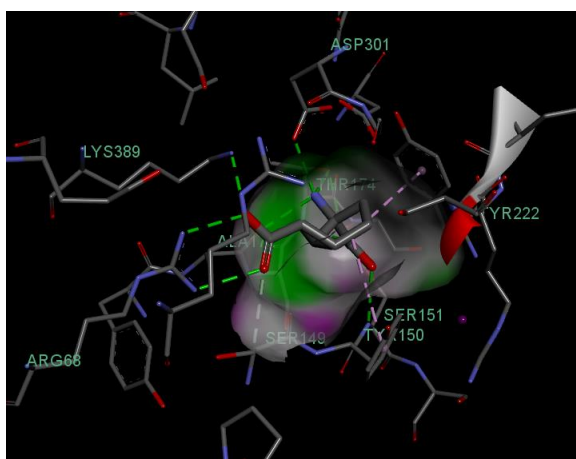


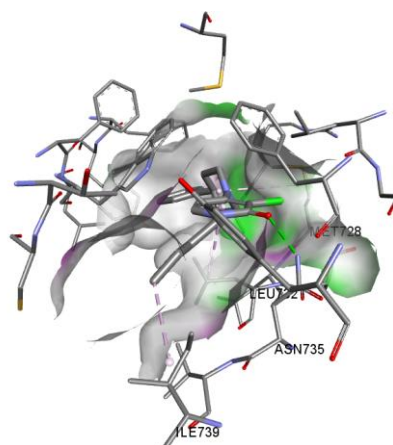
Рис. 4.3 Конформація негативного алостеричного модулятору Мавоглюрану в активному сайті mGluR1/5 після процедури ре-докінгу.

Макромолекула mGlu2/3 рецептора, виділена Homo sapiens у конформації з позитивним алостеричним модулятором LY379268, кристалізовано в 2014 році

(PDB ID 4XAR). Експериментально визначена гідрофобна кишенька зв'язування Мавоглюрану: Arg68(2), Ser151(2), Thr174(2), Ala172, Asp301, Ser149, Tyr150, Tyr222. Валідність методології докінгу продемонстрована на рис. 4.4 а та в таблиці 4.2, де показано відтворення зв'язків визначених в експерименті [42]. Афінітність LY379268 до сайту зв'язування склала -8.2 ккал/моль.



а)



б)

Рис. 4.4 Конформація позитивних алостеричних модуляторів а) LY379268 та б) ADX88178 в активних сайтах mGlu2/3 та mGluR4,6,7,8, відповідно, після процедури ре-докінгу

Структура гетеродимеру mGluR4,6,7,8-рецептора, виділена з *Homo sapiens* у конформації з позитивним алостеричним модулятором ADX88178 та кристалізована лише у 2014 році (PDB ID 8JD5). Експериментально визначена гідрофобна кишенька зв'язування Мавоглюрану: Arg57, Glu902, Arg61(2), Glu902(6), Arg57, Ser143, Thr168, Ser145, Tyr216. Валідність методології докінгу продемонстрована на рис. 4.4 б та в таблиці 4.2, де показано відтворення зв'язків визначених в експерименті. [43] Афінітність LY379268 до сайту зв'язування склала -7.2 ккал/моль.

Висновки до розділу 4.

11. Проведено аналіз значення іонотропних та метаботропних рецепторів глутамату у розвитку та терапії різноманітних неврологічних захворювань, зокрема і хвороби Паркінсона.
12. Проаналізовано доступні в Protein Data Bank макромолекули іонотропних та метаботропних рецепторів глутамату у конформації з терапевтично значущими для ХП лігандами.
13. Проведено валідацію процедури молекулярного докінгу за нативними лігандами: Іфенпроділом – негативного алостеричного модулятора NMDA-рецептора; NBQX та Талампанелем – позитивним алостеричним модулятором AMPA-рецепторів; Мавоглюран – негативного алостеричного модулятора mGluR1/5; LY379268 та ADX88178 – позитивних алостеричних модуляторів mGluR2/3 та mGluR4,6,7,8, відповідно.
14. Розраховано значення енергії зв'язування референс-лігандів, а також проведено деталізацію амінокислотних взаємодій в активних сайтах та зіставлення з експериментально визначеними зв'язками.
15. Описано параметри молекулярного докінгу в іонотропні та метаботропні рецептори глутамату для можливості їх застосування в подальших *in silico* дослідженнях при розробці нових малих молекул як антипаркінсонічних агентів.

РОЗДІЛ 5

ХАРАКТЕРИСТИКА *IN VIVO* МОДЕЛЕЙ ТА АЛГОРИТМ *IN SILICO* ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИПАРКІНСОНІЧНОЇ АКТИВНОСТІ

5.1 *In vivo* моделі дослідження антипаркінсонічної активності

5.1.1 *In vivo* модель – введення Резерпіну

Однією з перших *in vivo* моделей, які використовувалися в дослідженні ХП, була модель на тлі введення резерпіну щурам. Вперше продемонстрував здатність L-DOPA, скасовувати описаний тоді «заспокійливий» ефект попереднього лікування резерпіном у мишей. Резерпін (звичайна доза 4–5 мг·кг⁻¹ підшкірно) діє шляхом пригнічення везикулярного транспортера моноамінів, VMAT2. Це призводить до втрати місткості для зберігання і, отже, виснаження мозкових (і периферичних) моноамінів, включаючи норадреналін і 5-НТ, а також дофамін. Поведінково Резерпін викликає ознаки акінезії та ригідності задніх кінцівок у щурів, які характерні для симптомів, пов'язаних із хворобою. Щури, які отримували Резерпін, виявилися дуже корисними для прогнозування ефективності як дофамінергічних, так і недофамінергічних препаратів. Дійсно, усі дофамінергічні препарати, які зараз клінічно використовуються для лікування симптомів хвороби Паркінсона, включаючи Апоморфін, Праміпексол, Ропінірол, Перголід, Бромокриптин і Каберголін, як і L-DOPA, виявили ефективність у щурів, які отримували Резерпін, що підтверджує прогностичну вірогідність цієї моделі. Інші засоби, наприклад антагоністи мускарину, такі як Бензтропін і Тригексифенідил, інгібітори MAO-B або COMT, такі як Селегілін, Разагілін або Толкапон і Амантадин демонструють ефективність як окремо, так і в комбінації з підпороговою дозою L-DOPA в Резерпін - лікованих щурів. Ця позиція підтверджується його постійним використанням сьогодні для оцінки антипаркінсонічної ефективності як дофамінергічних агентів, наприклад, агоністів рецептора D3, так і

недофамінергічних агентів, включаючи агоністи метаботропного глутаматного (mGlu) рецептора групи III або позитивні алостеричні модулятори та змішані антагоністи аденозину A2A/A1. [44]

5.1.2 *In vivo* модель – введення Галоперидолу

Іншою фармакологічною моделлю ХП є введення щурам Галоперидолу. Галоперидол діє як антагоніст рецепторів дофаміну D2 і, меншою мірою, рецептори D1. Блокада передачі дофаміну в смугастому тілі призводить до симптомів м'язової ригідності та каталепсії протягом 60 хвилин після ін'єкції Галоперидолу (0,5–5 мг·кг⁻¹, внутрішньовенно). Для аналізу даних використовується загальний «тест на стовпчик», за допомогою якого каталепсія вимірюється як час, потрібний тварині, щоб відірвати передні лапи від стовпчика, хоча варіації у висоті стовпчика (встановлено на рівні 6–10 см), граничний час (60–300 с), доза Галоперидолу (0,5–10 мг/кг) і чутливість тварин все ще ускладнюють міжлабораторні порівняння. Низка препаратів, які зараз клінічно використовуються для лікування ХП, показали ефективність на моделі Галоперидолу, включаючи L-DOPA, Бромокриптин, Праміпексол, Тригексифенідил і Амантадин. Інші препарати, включаючи Бензтропін, Толкапон, Селегілін і Разагілін, також показали, що посилюють ефекти L-DOPA, що підтверджує прогностичну валідність цієї моделі, хоча ефекти Апоморфіну непередбачувані. [44]

5.1.3 Гідроксильований аналог дофаміну 6-OHDA на моделі гризунів

Характеристика гідроксильованого аналога дофаміну, 6-OHDA, як токсин-індукуючої дегенерації дофамінергічних нейронів у чорно-смугастому тракті призвела до того, що він став широко використовуваним інструментом для індукції паркінсонізму у гризунів. 6-OHDA не ефективно долає ГЕБ і тому потребує безпосереднього введення в мозок. Після ін'єкції 6-OHDA поглинається дофамінергічними нейронами через транспортер дофаміну – DAT.

Враховуючи, що 6-OHDA також демонструє високу спорідненість з транспортером норадреналіну, Деспірамін, введений за 30–60 хвилин до 6-OHDA, забезпечує покращену специфічність токсину для дофамінергічних нейронів. Паргілін також можна призначати як попередню терапію, щоб зменшити будь-яке потенційне розщеплення 6-OHDA MAO-B, тим самим зменшуючи ефективну дозу необхідного токсину. [45] Звичайно, 6-OHDA легко окислюється з утворенням активних форм кисню, таких як H_2O_2 , для зниження рівня антиоксидантних ферментів в смугастому тілі, щоб підвищити рівень заліза і безпосередньо взаємодіяти з комплексами I і IV мітохондріального дихального ланцюга, що призводить до подальшого пригнічення дихання та подальшого окисного стресу. Крім того, запалення також бере участь у патогенезі та прогресуванні ХП з мікрогліальною активацією в ГМ при ХП, при посмертному дослідженні за допомогою ПЕТ-візуалізації з лігандом PK11195. Однією патологічною ознакою ХП, яка чітко відображається моделлю 6-OHDA, є дегенерація чорно-смугастого тракту. [44]

5.1.4 Введення МФТП приматам для прояву паркінсонічного синдрому

Відкриття здатності МФТП (1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридин) індукувати паркінсонізм у людини призвело до можливості використовувати системне введення токсинів для створення моделі ХП у приматів з високим ступенем валідності конструкції. Усі види приматів, на яких було перевірено МФТП, виявляються чутливими до токсину. Повторне системне введення МФТП шляхом внутрішньочеревного, підшкірного та внутрішньовенного введення в дозах, які варіюють залежно від виду та шляху протягом 3–5 днів, призводить до появи паркінсонічного синдрому майже негайно та, звичайно, протягом кількох днів після початку лікування. Він складається з акінезії, брадикінезії, ригідності кінцівок і тулуба та аномалій постави, які формують кардинальні симптоми ХП, оскільки вони виникають у людини. Тому, без тіні

сумніву, ця модель має найсильнішу зовнішню валідність серед усіх тваринних моделей ХП. У гемі-паркінсонічних тварин відбуваються асиметричні зміни рухової здатності та ротація відбувається під час лікування дофамінергічними препаратами. У деяких випадках МФТП призначався у невеликих повторних дозах або протягом тривалих періодів часу, щоб викликати часткове ураження чорно-смугастого шляху або спробувати створити модель ХП, яка є більш «прогресивною» за своєю природою, ніж при лікуванні гострим токсином. Згодом було показано, що всі дофамінергічні препарати, що використовуються для лікування хвороби Паркінсона, є ефективними – Бромкриптин, Перголід, Каберголін, Апоморфін, Ропінірол, Праміпексол і Пірибедил, а також тестовані антимускаринові засоби, такі як Тригексифенідил і Бензтропін. Інгібітори МАО-В Селегілін і Разагілін спричинили легке покращення моторики та посилили ефекти L-DOPA. Так само було показано, що Ентакапон і Толкапон, посилюють дію L-DOPA. Отже, це була модель із сильною прогностичною валідністю щодо терапевтичного ефекту при ХП, яка зараз є важливим кроком між доклінічними та клінічними дослідженнями. [44]

5.1.5 Рибки даніо- потенційна модель ХП

Хребетна рибка даніо довжиною 3–4 см, яку протягом багатьох років використовували для вивчення розвитку та функції генів, є останнім із претендентів на потенційну модель хвороби ХП, яка піддається високопродуктивному скринінгу на ліки *in vivo*. У рибок даніо дофамінергічні нейрони в задньому горбку вентрального проміжного мозку (загалом ~14; аналогічно людському SNpc) підіймаються до смугастого тіла і, таким чином, анатомічно більш схожі з чорно-смугастим трактом у ссавців. Ці нейрони чутливі до деяких токсинів класичної моделі ХП, а саме 6-OHDA та МФТП, демонструючи зниження рівнів дофаміну, норадреналіну та гістаміну в мозку протягом 2 днів після системної ін'єкції. Паралельні дослідження впливу МФТП на рибок даніо через воду в акваріумі виявили подібне зниження

плавання після лікування, яке тривало понад 7 днів і супроводжувалося зменшенням на ~20% TH-позитивних нейронів у проміжному мозку, але зберігаючи locus coeruleus. Навпаки, вплив Ротенону або Параквату через воду в резервуар був неефективним у цій моделі. На сьогодні інактивація або нокдаун різноманітних генів, пов'язаних із ХП, в ембріоні за допомогою морфоліно-олігонуклеотидних підходів створила рибок даніо з широким розмаїттям фенотипів. Було показано, що риби даніо з дефіцитом паркіна демонструють 20% втрату висхідних дофамінергічних нейронів у задньому горбку, хоча, на жаль, не змінюється плавальна поведінка, в той час, як майже дзеркальне відображення PINK1 нокдаун не призвів до втрати DA-нейронів, але змінив їхні моделі проєкції та призвело до зменшення плавання. Було показано, що, мабуть, найбільш перспективний тепер нокдаун LRRK2 зменшує експресію TH і DAT у проміжному мозку, зменшує кількість TH-позитивних клітин приблизно на 25–30% (хоча інші типи клітин також постраждали) і половину відстані, яку пропливає рибка даніо. Попри те, що він менш піддається високопродуктивному скринінгу, мутант LRRK2, зокрема, виглядає дуже перспективний як майбутня модель хребетних, на якій можна досліджувати деякі аспекти генетики хвороби Паркінсона. [44]

5.2 Розробка алгоритму *in silico* дослідження антипаркінсонічних агентів

Наведена вище інформація щодо існуючих *in vivo* моделі, які застосовують для скринінгу, та активності лікарських препаратів на вказаних моделях, дозволили нам визначити взаємозв'язок між макромолекулою – антипаркінсонічним лігандом – механізмом його дії – фармакологічною моделлю та сформовано алгоритм *in silico* дослідження при пошуку антипаркінсонічних агентів (рис. 5.1)

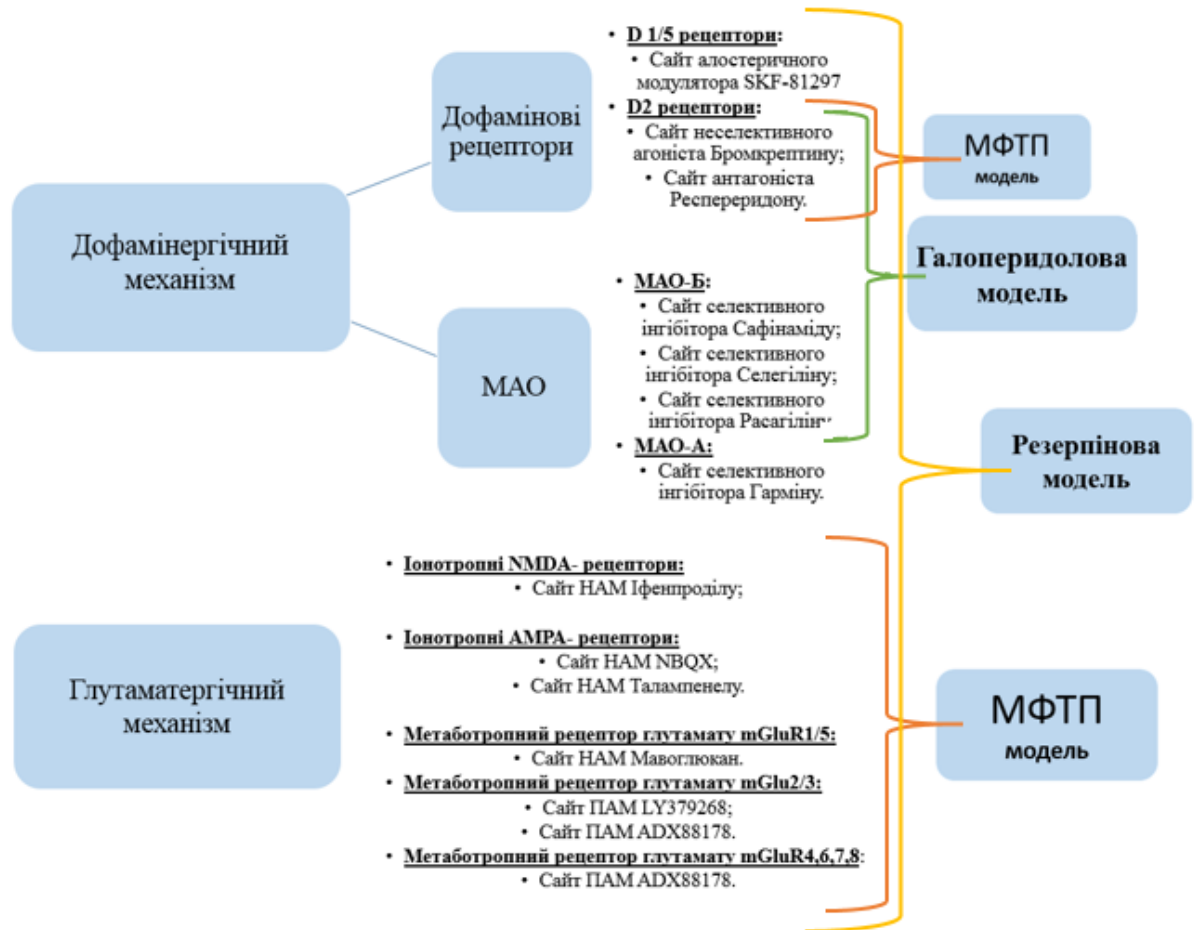


Рис. 5.1 Алгоритм *in silico* дослідження антипаркінсонічних агентів

Висновки до розділу 5.

- Проведено аналіз *in vivo* моделей, які застосовуються при скринінгу нових речовин на антипаркінсонічну дію, проаналізовано та визнано кореляції щодо ефективності наявних антипаркінсонічних ЛЗ на цих моделях.
- Сформовано алгоритм *in silico* пошуку нових біологічно активних речовин з дофамінергічними та глутаматергічними механізмами через модуляцію дофамінергічних рецепторів, ензимів MAO та іонотропних, метаботропних рецепторів глутамату.

ВИСНОВКИ

1. Опрацьовано та систематизовано літературні джерела щодо епідеміології, механізмів патогенезу, напрямків фармакокорекції та сучасних лікарських засобів для лікування хвороби Паркінсона, зокрема їх будови та механізму дії.
2. Проаналізовано та систематизовано наявні в Protein Data Bank доступні макромолекули терапевтично важливих рецепторів та ензимів у конформації з сучасними терапевтично значущими антипаркінсонічними агентами.
3. Охарактеризовано будову макромолекул, амінокислотний склад експериментально визначених активних сайтів біомішеней – метаботропних mGlu1/5, mGlu2/3 mGlu4/7/8 та іонотропних NMDA- та AMPA- рецепторів глутамату, дофамінових рецепторів типу D1 та D2, ензимів моноамінооксидази А та Б.
4. Валідовано методології докінгу за нативними референс-лігандами, розраховано енергії їх зв'язування, охарактеризовано відтворюваність експериментально визначених взаємодій в активному сайту.
5. Описано параметри молекулярного докінгу для досліджуваних рецепторів з антипаркінсонічною дією, для їх майбутнього відтворення *in silico* при розробці нових макромолекул.
6. Проведено аналіз *in vivo* моделей, які застосовуються при скринінгу нових речовин на антипаркінсонічну активність, визнано кореляції щодо ефективності наявних антипаркінсонічних ЛЗ на цих моделях та механізму їх дії.
7. Визначено взаємозв'язок між макромолекулою – антипаркінсонічним лігандом – механізмом його дії – фармакологічною моделлю та сформовано алгоритм *in silico* дослідження при пошуку антипаркінсонічних агентів

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Inflammation in Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications / M. Pajares et al. *Cells*. 2020. Vol. 9, Iss. 7. P. 1687. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32674367/> (Date of access: 05.03.2023).
2. Simon D. K., Tanner K. M., Patrik B. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. *Clinics in Geriatric Medicine*. 2020. Vol. 36, Iss. 1. P. 1–12. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31733690/> (Date of access: 05.03.2023).
3. Cabreira V., Massano J. Parkinson's Disease: Clinical Review and Update. *Acta Médica Portuguesa*. 2019. Vol. 32, Iss. 10. P. 661–670. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31625879/> (Date of access: 05.03.2023).
4. Delamarre A., Meissner W. G. Epidemiology, environmental risk factors and genetics of Parkinson's disease. *Presse Médicale*. 2017. Vol. 46, Iss. 2. P. 175–181. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28189372/> (Date of access: 05.03.2023).
5. Cabreira V., Massano J. Doença de Parkinson: Revisão Clínica e Atualização. *Acta Médica Portuguesa*. 2019. Vol. 32, Iss. 10. P. 661–670. URL: <file:///C:/Users/sven1/Downloads/amp,+661-670+%2311978.pdf> (Date of access: 05.03.2023).
6. Хвороба Паркінсона у практиці лікаря-невролога: метод. рек. / О. Р. Пулик та ін. Ужгород: Говерла, 2023. 28 с.
7. Elsworth J. D. Parkinsons disease treatment: past, present, and future. *Journal of Neural Transmission*. 2020. Vol. 127, Iss. 5. P. 785-791. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32172471/> (Date of access: 05.03.2023).
8. Pathogenesis of α -Synuclein in Parkinson's Disease: From a Neuron-Glia Crosstalk Perspective / S. Yi et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23, Iss. 23. P. 14753. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36499080/> (Date of access: 17.02.2024).

9. Immunogenetic Determinants of Parkinson's Disease Etiology / P.-J. Kung et al. *Journal of Parkinson's Disease*. 2022. Vol. 12, Iss. 1. P. 13–27. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35367971/> (Date of access: 17.02.2024).
10. Inflammation in Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications / M. Pajares et al. *Cells*. 2020. Vol. 9, Iss. 7. P. 1687. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32674367/> (Date of access: 17.02.2024).
11. Preventing Parkinson's Disease: An Environmental Agenda / R. Briana et al. *Journal of Parkinson's Disease*. 2022. Vol. 12, Iss. 1. P. 45–68. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34719434/> (Date of access: 17.02.2024).
12. Elsworth J. D. Parkinson's disease treatment: past, present, and future. *Journal of Neural Transmission*. 2020. Vol. 127, Iss. 5. P. 785–791. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32172471/> (Date of access: 17.02.2024).
13. The Parkinson's disease-associated mutation *LRRK2* G2385R alters mitochondrial biogenesis via the PGC-1 α -TFAM pathway / X. Jian et al. 2023. Vol. 73. P. 10–18.
14. Ferroptosis and its potential role in the pathophysiology of Parkinson's Disease / L. Mahoney-Sánchez et al. *Progress in Neurobiology*. 2021. Vol. 196. P. 101890. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32726602/> (Date of access: 17.02.2024).
15. Prasuhn J., Brüggemann N. Genotype-driven therapeutic developments in Parkinson's disease. *Molecular Medicine*. 2021. Vol. 27, Iss. 1. P. 42. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33874883/> (Date of access: 17.02.2024).
16. Jankovic J., Tan E. K. Parkinson's disease: etiopathogenesis and treatment. 2020. *Journal Neurology Neurosurgery Psychiatry*. Vol. 91, Iss. 8. P. 795–808. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32576618/> (Date of access: 17.02.2024).
17. The Design and Evaluation of an l-Dopa–Lazabemide Prodrug for the Treatment of Parkinson's Disease / M. Hoon et al. *Molecules*. 2017. Vol. 22, Iss. 12. P. 2076. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29186917/> (Date of access: 17.02.2024).

18. Reynolds G. P, Riederer P., Sandler M. Tranylcypromine Isomers and Parkinson's Disease: New Aspects of an Old Drug. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 1981. Vol. 74, Iss. 9. P. 649–652. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7288807/> (Date of access: 17.02.2024).
19. Dopamine in Parkinson's disease / S. Latif et al. *Clinica Chimica Acta*. 2021. Vol. 522. P. 114–126. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34389279/> (Date of access: 17.02.2024).
20. Structural insights into the human D1 and D2 dopamine receptor signaling complexes / Y. Zhuang et al. *Cell*. 2021. Vol. 184, Iss. 4. P. 931–942. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33571431/> (Date of access: 17.02.2024).
21. Structure of the D2 dopamine receptor bound to the atypical antipsychotic drug risperidone / S. Wang et al. *Nature*. 2018. Vol. 555. P. 269–273. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29466326/> (Date of access: 17.02.2024).
22. Mechanism of dopamine binding and allosteric modulation of the human D1 dopamine receptor / Y. Zhuang et al. *Cell Research*. 2021. Vol. 31, Iss. 5. P. 593–596. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33750903/> (Date of access: 17.02.2024).
23. Harris J. R., Boekema E. J. Monoamine Oxidases. *Subcellular Biochemistry*. 2018. Vol. 87. P. 117–139. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29464559/> (Date of access: 17.02.2024).
24. Finberg J. P. M. Pharmacology of rasagiline, a new MAO-B inhibitor drug for the treatment of Parkinson's disease with neuroprotective potential. *Rambam Maimonides Med J*. 2010. Vol. 1, Iss. 1. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23908775/> (Date of access: 17.02.2024).
25. Structures of Human Monoamine Oxidase B Complexes with Selective Noncovalent Inhibitors: Saffinamide and Coumarin Analogs / B. Claudia et al. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2007. Vol. 50, Iss. 23. P. 5848–5852. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17915852/> (Date of access: 17.02.2024).

26. Three-Dimensional Structure of Human Monoamine Oxidase A (MAO A): Relation to the Structures of Rat MAO A and Human MAO B / L. D. Colibuset et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005. Vol. 102, Iss. 36. P. 12684-12689.
27. Crystal Structures of Monoamine Oxidase B in Complex with Four Inhibitors of the Propargylaminoindan Class / B. Claudia et al. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2004. Vol. 47, Iss. 7. P. 1767–1774. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15027868/> (Date of access: 17.02.2024).
28. Structure of human monoamine oxidase A at 2.2-Å resolution: The control of opening the entry for substrates/inhibitors / S.-Y. Son et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008. Vol. 105, Iss. 15. P. 5739–5744. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18391214/> (Date of access: 19.09.2023).
29. Structure, Function, and Pharmacology of Glutamate Receptor Ion Channels / B. Kasper et al. *Pharmacol Rev*. Vol. 73, Iss. 4. P. 298–487.
30. Roles of Glutamate Receptors in Parkinson's Disease / Z. Zhang et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20, Iss. 18. P. 4391. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31500132/> (Date of access: 19.09.2023).
31. Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors / B. Kasper et al. *J. Gen. Physiol*. 2018. Vol. 150, Iss. 8. P. 1081–1105.
32. Presynaptic AMPA Receptors in Health and Disease / L. Zanetti et al. *Cells*. 2021. Vol. 10. P. 2260. DOI: 10.3390/cells10092260 (Date of access: 19.09.2023).
33. Activation of AMPA Receptors in the Lateral Habenula Produces Anxiolytic Effects in a Rat Model of Parkinson's Disease / J. Zhang et al. *Front. Pharmacol*. 2022. Vol. 13. P. 821–975. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35145415/> (Date of access: 19.09.2023).
34. Activation of NMDA receptors and the mechanism of inhibition by ifenprodil / T. Nami et al. *Nature*. 2016. Vol. 534. P. 63–68. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27135925/> (Date of access: 19.09.2023).

35. Homomeric GluA2(R) AMPA receptors can conduct when desensitized / I. D. Coombs et al. *Nature Communications*. 2019. Vol. 10, Iss. 1. P. 4312. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31541113/> (Date of access: 19.09.2023).
36. Structural Bases of Noncompetitive Inhibition of AMPA-Subtype Ionotropic Glutamate Receptors by Antiepileptic Drugs / M. V. Yelshanskaya et al. *Neuron*. 2016. Vol. 91, Iss. 6. P. 1305–1316. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27618672/> (Date of access: 19.09.2023).
37. Group 1 metabotropic glutamate receptors 1 and 5 form a protein complex in mouse hippocampus and cortex / N. J. Pandya et al. *Proteomics*. 2016. Vol. 16, Iss. 20. P. 2698–2705. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27392515/> (Date of access: 19.09.2023).
38. Phosphorylation and regulation of group II metabotropic glutamate receptors (mGlu2/3) in neurons / L.-M. Mao et al. *Front. Cell Dev. Biol.* 2022. Vol. 10. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36407098/> (Date of access: 19.09.2023).
39. Group III metabotropic glutamate receptors and drug addiction / L. Mao et al. *Frontiers of Medicine*. 2013. Vol. 7, Iss. 4. P. 445–451. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24078068/> (Date of access: 19.09.2023).
40. Paulianda J. J., Zixiu X. P., Jeffrey C. Metabotropic glutamate receptors mGluR4 and mGluR8 regulate transmission in the lateral olfactory tract–piriform cortex synapse. 2008. Vol. 55, Iss. 4. P. 440–446. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18625254/> (Date of access: 19.09.2023).
41. Structure of class C GPCR metabotropic glutamate receptor 5 transmembrane domain / A. S. Doré et al. *Nature*. 2014. Vol. 511, Iss. 7511. P. 557–562. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25042998/> (Date of access: 19.09.2023).
42. Synthesis and Pharmacological Characterization of C4-Disubstituted Analogs of 1*S*,2*S*,5*R*,6*S*-2-Aminobicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate: Identification of a Potent, Selective Metabotropic Glutamate Receptor Agonist and Determination of

- Agonist-Bound Human mGlu2 and mGlu3 Amino Terminal Domain Structures / A. M. P. James et al. *J. Med. Chem.* 2015. Vol. 58, Iss. 4. P. 1776–1794.
43. Structural insights into dimerization and activation of the mGlu2–mGlu3 and mGlu2–mGlu4 heterodimers / W. Xinwei et al. *Cell Research*. 2023. Vol. 33. P. 762–774. DOI: 10.1038/s41422-023-00830-2 (Date of access: 19.09.2023).
44. Susan D., Peter J. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br J Pharmacol*. 2011. Vol. 164, Iss. 4. P. 1357–1391. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21486284/> (Date of access: 19.09.2023).
45. Le W., Sayana P., Jankovic J. Animal Models of Parkinson's Disease: A Gateway to Therapeutics?. *Neurotherapeutics*. 2014. Vol. 11, Iss. 1. P. 92–110. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24158912/> (Date of access: 19.09.2023).
46. Inflammasome inhibition prevents alpha-synuclein pathology and dopaminergic neurodegeneration in mice / R. Gordon et al. *Sci. Transl. Med.* 2018. Vol. 10, Iss. 465. P. 4066.
47. Detrimental effect of type 2 diabetes mellitus in a large case series of Parkinson's disease / S. J. Chung et al. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2019. Vol. 64. P. 54–59.
48. Widespread transneuronal propagation of alpha-synucleinopathy triggered in olfactory bulb mimics prodromal Parkinson's disease / N. L. Rey et al. *J. Exp. Med.* 2016. Vol. 213, Iss. 9. P. 1759–1778.
49. Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases / A. Cuadrado et al. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2019. Vol. 18, Iss. 4. P. 295–317.
50. Steinhoff B. J. The AMPA receptor antagonist perampanel in the adjunctive treatment of partial-onset seizures: clinical trial evidence and experience. *Ther. Adv. Neurol. Disorder.* 2015. Vol. 8, Iss. 3. P. 137–147.
51. Kim H. J., Jeon B. Decision under risk: argument against early deep brain stimulation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2019. Vol. 69. P. 7–10.

52. Apomorphine subcutaneous infusion in patients with Parkinson's disease with persistent motor fluctuations (TOLEDO): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial / R. Katzenschlager et al. *Lancet Neurol.* 2018. Vol. 17, Iss. 9. P. 749–59.
53. Nonpharmacological, nonsurgical treatments for freezing of gait in Parkinson's disease: a systematic review / M. Delgado-Alvarado et al. *Mov Disord.* 2020. Vol. 35, Iss. 2. P. 204–14.
54. Prognosis and neuropathologic correlation of clinical subtypes of Parkinson disease / E. De Pablo-Fernández et al. *JAMA Neurol.* 2019. Vol. 76, Iss. 4. P. 470–479.
55. Architecture and subunit arrangement of native AMPA receptors elucidated by cryo-EM / Y. Zhao et al. *Science.* 2019. Vol. 364. P. 355–362.
56. GBA Variants in Parkinson's disease: clinical, metabolomic, and multimodal neuroimaging phenotypes / A. Greuel et al. *Mov Disord.* 2020. Vol. 35, Iss. 12. P. 2201–2210.
57. Prasuhn J., Davis R. L., Kumar K. R. Targeting mitochondrial impairment in Parkinson's disease: challenges and opportunities. *Front Cell Dev Biol.* 2021. Vol. 8. P. 1704.
58. LRRK2 and GBA variants exert distinct influences on Parkinson's disease-specific metabolic networks / K. A. Schindlbeck et al. *Cereb Cortex.* 2020. Vol. 30, Iss. 5. P. 2867–2878.
59. Developing and validating Parkinson's disease subtypes and their motor and cognitive progression / M. Lawton et al. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2018. Vol. 89, Iss. 12. P. 1279–1287.
60. Fereshtehnejad S. M., Postuma R. B. Subtypes of Parkinson's disease: what do they tell us about disease progression? *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2017. Vol. 17, Iss. 4. P. 34. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28324303/> (Date of access: 19.09.2023).

61. The effects of anodal tDCS over the supplementary motor area on gait initiation in Parkinson's disease with freezing of gait: a pilot study / C. Lu et al. *J Neurol*. 2018. Vol. 265, Iss. 9. P. 2023–2032.
62. Neuropsychological and imaging profile of patients with Parkinson's disease and freezing of gait / M. Jha et al. *Parkinsonism Relat Disord*. 2015. Vol. 21, Iss. 10. P. 1184–1190.
63. Lewis S. J. G., Shine J. M. The next step: a common neural mechanism for freezing of gait. *Neuroscientist*. 2016. Vol. 22, Iss. 1. P. 72–82.
64. Effect of three cueing devices for people with Parkinson's disease with gait initiation difficulties / P. J. McCandless et al. *Gait Posture*. 2016. Vol. 44. P. 7–

ДОДАТКИ

Додаток А.1

Glutamate Receptors for In Silico Evaluation of Antiparkinsonian Activity of New Compounds

H. Severina^{1*}, S. Vlasov¹, T. Mogylina¹, V. Georgiyants¹

¹National University of Pharmacy, 53 Pushkinska St., 61002 Kharkiv, Ukraine

*Corresponding author e-mail: severina.ai@ukr.net

Background: Neurodegenerative diseases are debilitating conditions that lead to progressive deterioration or death of nerve cells [1], causing cognitive dysfunction, dementia, and slow down motor function in various parts of the brain [2]. It is now evident glutamatergic signalling in brain plays the central role in its functioning, as well as in the modulation of neurodegenerative pathologies, including Parkinson's disease [3]. Modulation of glutamate receptors (GluRs) has been shown to improve the motor symptoms of Parkinson's disease, increase the effectiveness of antiparkinsonian dopaminergic agents and protect substantia nigra neurons. The search for new ligands-modulators of glutamate receptors is a priority for the development of new drugs.

Aim: The aim of the study is to review the available crystallised glutamate receptors in conformation with promising antiparkinsonian ligands and validate docking methodologies for their further use for *in silico* studies.

Methods: The following programs were used Discovery studio Visualizer 2021, AutoDock Tool1.5.6rc3, Autodock Vina. Crystallographic data for all glutamate receptors were obtained from the Protein Data Bank.

Results: The results of the study are presented below:

Receptor	PDBID/ Expression System	Native ligand / Finding an active site	Binding energy kkal/mol	Amino acid residues of the active site GluR
NMDA	3QEL/ Trichoplusia ni	Ifenprodil –NAM, ATD	-11.2	Glu236, Leu135, Phe114, Phe176,Ala107, Leu135, Pro78, Ile111, Pro177
	5UOW/ Homo sapiens	Dizocilpine – NAM, TMD	-8.0	Leu630, Leu649,Leu636, Ala643, Ala 631
AMPA	6FQH/ Escherichia coli	NBQX – NAM, LBD	-8.2	Tyr61, Tyr220, Thr91, Thr 174, Glu193, Pro89, Arg96
	5L1G/ Homo sapiens	Talampanel, LBD	-10.2	Asn791, Ser615, Ser790, Asp519, Phe623, Leu620, Leu624, Leu787, Pro520
mGluR1/ 5	4OO9/ Homo sapiens	Mavoglurant, NAM, TMD	-9.0	Asn747, Ser805, Ser809, Val740, Ser654, Pro65, Ala813, Ile625, Ile651, Val740, Pro743, Leu744, Tyr659, Trp785, Phe788, Pro655, Ala810
	6FFH/ Homo sapiens	Fenobam –NAM, TMD	-8.7	Trp785, Val806, Ser809 Ser658, Gly624, Tyr659, Ala810
mGlu 2/3	4XAQ/ Homo sapiens	LY379268 – agonist, ATD	-7.9	Ala166, Asp295, Thr168, Ser145, Lys377, Arg61, Ser143, Tyr 216, Tyr 144, Glu273
mGluR4, 6,7,8	8JD5/ Homo sapiens	ADX88178 – PAM mGluR4	-11.2	Leu774, Ala775, Ala800, Ile804, Leu777, Pro778, Leu828, Pro778, Val824, Leu590, Pro591, Val824

NAM – negative allosteric modulator; PAM – positive allosteric modulator; ATD – amino-terminal domain; TMD – transmembrane domain, LBD – ligand-binding domain.

Conclusions: The available crystallographic structures of glutamate receptors in conformations with NAM and PAM, which are promising as antiparkinsonian agents, were selected; docking methodologies for native ligands were validated, and parameters for future *in silico* studies of the glutamatergic effect of new ligands were determined.

Funding: The research was funded by the Ministry of Health Care of Ukraine at the expense of the State Budget on the topic "Molecular modeling and synthesis of innovative pyrimidine derivatives as promising agents for the treatment of neurodegenerative diseases", 2024-2026.

References:

1. Gan L., Cookson M.R., Petrucelli L., La Spada A.R. Converging pathways in neurodegeneration, from genetics to mechanisms. *Nat. Neurosci.* 2018; 21 (10): 1300–1309.
2. Kim JH, Marton J, Ametamey SM, Cumming P. A Review of Molecular Imaging of Glutamate Receptors. *Molecules.* 2020;25(20):4749

ФЕРМЕНТИ МОНОАМІНООКСИДАЗИ ЯК ТАРГЕТИ ДЛЯ *IN SILICO* ПОШУКУ АНТИПАРКІНСОНІЧНИХ АГЕНТІВ

Могильна Т.

Науковий керівник: проф. Северіна Г.І.

Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна

tanayulka2001@gmail.com

Вступ. За останні двадцять п'ять років розповсюдженість хвороби Паркінсона (ХП) зросла вдвічі. В Європі випадки ХП становить від 257 до 1400 випадків на 100 000 жителів. Патогенез розвитку хвороби Паркінсона багатогранний, ключовим вектором є дегенерація дофамінергічних нейронів у чорній субстанції та інших відділах головного мозку, що призводить до розвитку симптомів ХП – тремору та порушення координації. Наразі відсутні способи лікування хвороби Паркінсона, можливе лише покращення симптомів її перебігу медикаментозним та/або хірургічним шляхом. Одним із ключових напрямків лікування є інгібування ферментів моноамінооксидази, який каталізує окислювальну деградацію ряду неврологічно важливих аміних субстратів, включаючи дофамін, норадреналін, адреналін, серотонін та фенетиламіну. Інгібування MAO чинить загальний нейропротекторний ефект внаслідок зменшення окислювального стресу, спричиненого цими ферментами. Розробка нових високоселективних інгібіторів MAO-B та MAO-A є важливим завданням, оскільки вони

XXX Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених та студентів
«АКТУАЛЬНІ ПИТАННЯ СТВОРЕННЯ НОВИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ»

можуть модифікувати процеси нейродегенерацію та/або запобігати її прогресуванню. Сучасні технології щодо виділення білкових макромолекул рецепторів та ензимів у конформації з відповідними лігандами, їх кристалографічний аналіз, деталізація взаємозв'язків «ліганд-рецептор» і механізмів модуляції, агонізму, антагонізму або інгібування відкривають можливості для попереднього *in silico* пошуку потенційних лікарських засобів, що дозволяє оптимізувати drug-design нових молекул.

Мета дослідження. Метою представленого дослідження був аналіз та сепарація доступних макромолекул ензимів моноамінооксидази у конформації з антипаркінсонічними лігандами та валідація методології молекулярного докінгу за нативними лігандами.

Матеріали та методи. Молекулярний докінг здійснювали за допомогою програм AutoDock Vina та AutoDockTools4. Protein Data Bank використано як базу даних для аналізу біомішеней. Discovery Studio Visualizer 2021 використано для візуалізації результатів.

Результати дослідження. Проаналізувавши існуючі препарати-ліганди серед інгібіторів MAO, нами були сепаровані ті, які виявляють найвищу ефективність при лікуванні ХП та оцінено наявність макромолекул MAO у конформації з відповідними лігандами у Protein Data Bank. Перелік усіх доступних для *in silico* досліджень макромолекул, валідаційні характеристики, координати та розміри Grid box, а також значення енергії зв'язування референт-ліганду наведені в таблиці.

Таблиця. Характеристика сайтів MAO А та Б та параметри молекулярного докінгу

Фермент	РДВІД/ організм виділення	Ліганд	Сайт зв'язування	Grid box Координати/розм ір	Енергія зв'язування, ккал/моль
MAO-Б	2V5Z/ Komagataella pastoris	Сафінамід – селективний інгібітор (конкурентний)	Chain A Gln206(2), Ile199(2), Leu171, Cys172, Tyr326, Ile316	x = 51,90, y = 156,46, z = -28,56; розмір x =22, y = 24, z = 22	-9,5
	2BYB/ Komagataella pastoris	Селегілін селективний інгібітор (незворотний)	Chain A Tyr435, Leu171(2), Ile199, Cys172, Tyr326, Leu171, Tyr326, Phe343(2), Tyr398(4)	x = 52,47, y = 156,38, z = 26,30; розмір x =10, y = 14, z = 10	-7,0
	1S2Q/ Komagataella pastoris	Расагілін селективний інгібітор (незворотний)	Arg42, Tyr60, Met436, Tyr60, Ser59, Gln206, Tyr435, Gly57, Leu171, Tyr326, Phe343, Trp388(5)	x = 72,47, y = 256,38, z = 76,30; розмір x =20, y = 24, z = 14	-7.2
MAO-A	2Z5X/Homo sapiens	Гармін (селективний інгібітор)	Tyr 69, Tyr 407, Tyr 444, Phe 208, Phe 352, Asn 101, Gln 215, Cys 32, Ile 325, Leu 337. Val 93, Glu 95, Tyr 109, Pro 112, Phe 208, Asp212	x = 40,58, y = 26,93, z = -14,54; розмір x =22, y = 20, z = 20	-8.7

Валідацію методології докінгу здійснювали ре-докінгом нативного референс ліганда сафінаміду, селегіліну в активний сайт MAO-Б.

Висновки. Визначено доступні в Protein Data Bank структури MAO у конформації з найбільш ефективними інгібіторами як антипаркінсонічних агентів, описано амінокислотний склад активних сайтів та валідовано методологію докінгу за нативними лігандами, що дозволяє застосовувати параметри докінгу для подальшого їх застосування в in silico аналізі.



МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ДИПЛОМ

III СТУПЕНЯ

нагороджується

Могильна Тетяна

у секційному засіданні студентського наукового товариства кафедри
фармацевтичної хімії

XXX Міжнародна науково-практична
конференція молодих вчених та студентів
**"Актуальні питання створення нових
лікарських засобів"**

В.о. ректора
Національного фармацевтичного
університету



Алла КОТВИЦЬКА

17-19 квітня 2024 р.
м. Хорків

