

ПОИСК И ИЗУЧЕНИЕ ЭНДОТЕЛИОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ 2-СТИРИЛПРОИЗВОДНЫХ ПИРИМИДИН-4(1H)-ОНА НА ФОНЕ МОДЕЛИРОВАНИЯ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ

Воронков А.В.¹, Кодониди И.П.¹, Мамлеев А.В.¹, Сочнев В.С.¹, Глушко А.А.¹

¹ Пятигорский медико-фармацевтический институт - филиал ГБОУ ВПО «ВолгГМУ» Минздрава России, prohor77@yandex.ru

Проведено молекулярное конструирование новых 2-стирилпроизводных пиримидин-4(1H)-она и изучение их влияния на вазодилатирующую функцию эндотелия. Молекулярный прогноз осуществлялся с помощью программы PASS и программ молекулярного докинга, основанного на определении тропности исследуемых веществ к активным центрам протеинкиназы С. Моделирование недостаточности половых гормонов проводили у половозрелых крыс – самок линии Wistar путем экстерпации матки с придатками. По истечении 28 дней проводили оценку функционального состояния эндотелия. Оценка вазодилатирующей функции эндотелия проводили путем регистрации скорости кровотока доплерографическим методом (с помощью ультразвукового доплерографа, датчика УЗОП-010-01 с рабочей частотой 25 МГц и рабочей компьютерной программы ММ-Д-К-Minimax Doppler v.1.7. (Санкт-Петербург, Россия) при введении специфичных модификаторов выброса оксида азота – ацетилхолина. Результаты фармакологических исследований в значительной мере подтвердили обоснованность результатов молекулярного конструирования.

Ключевые слова: молекулярный докинг, протеинкиназа С, эндотелиальная дисфункция, недостаточность половых гормонов, мозговой кровотока.

SEARCH AND STUDY OF NEW ACTIVITY ENDOTHELIOPROTECTORS 2-STERIL DERIVATIVES PYRIMIDIN-4 (1H) -ONE ON BACKGROUND MODELING SEX HORMONE DEFICIENCY

Voronkov A.V.¹, Kodonidi I.P.¹, Mamleev A.V.¹, Sochnev V.S.¹, Glushko A.A.¹

¹Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, prohor77@yandex.ru

Conducted molecular design of new 2-steelproducing pyrimidine-4(1H)-she and study of their influence on the vasodilating function of endothelium. Molecular prediction was carried out using the PASS software and programs for molecular docking, based on determining the affinity of the investigated substances to the active centers of proteinkinase C. modeling of the insufficiency of sex hormones were performed in sexually Mature female rats of Wistar line by extirpate of the uterus with appendages. After 28 days to evaluate the functional state of the endothelium. Evaluation of the vasodilating function of endothelium was performed by registering the speed of blood flow ultrasound Doppler method (using ultrasonic Doppler, sensor USOP-010-01 with an operating frequency of 25 MHz and operating computer program MM-D-TO-v Doppler Minimax.1.7. (St. Petersburg, Russia) with the introduction of specific modifiers of the release of nitric oxide, acetylcholine. The results of pharmacological studies largely confirmed the validity of the results in molecular designing.

Keywords: molecular docking, proteinkinase C, endothelial dysfunction, sex hormone deficiency, cerebral blood flow.

По данным Всемирной организации здравоохранения, сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основными причинами преждевременной смертности, ранней инвалидизации и снижения качества жизни людей, особенно в условиях современного общества (стресс, экологические факторы и т.д.) [5]. На сегодняшний день установлено, что практически все сердечно-сосудистые, эндокринные аутоиммунные и др. заболевания сопряжены с эндотелиальной дисфункцией (ЭД) [4], которая является неблагоприятным прогностическим фактором в развитии сердечно-сосудистых осложнений [7]. В этой связи эндотелий сосудов становится самостоятельной мишенью терапевтического воздействия.

Известно, что в регуляции специфических функций эндотелия: противовоспалительной, вазодилатационной, антитромботической и антипролиферативной, участвует универсальный модулятор - эндогенный оксид азота [2; 3; 10]. Ключевую роль в выработке оксида азота выполняет эндотелиальная NO-синтаза (eNOS), в регуляции которой важную роль отводят эстрогеновым стероидным гормонам [8].

Таким образом, актуальным становится вопрос коррекции ЭД и сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе тех, которые ассоциированы с недостаточностью эстрогеновых половых гормонов (НПГ). Многие факторы влияют на активность NOS и, учитывая значительную роль в регуляции активности NOS протеинкиназы С [9], можно предположить, что фармакологическое воздействие на этот вид ферментов представляет собой большой научно-практический интерес.

Протеинкиназы представляют собой ферменты, осуществляющие перенос фосфатной группы от нуклеозид трифосфата на остатки таких аминокислот, как серин, треонин и тирозин. Фосфорилирование белка приводит к активации путей сигнальной трансдукции, а изменение активности протеинкиназ нарушает этот процесс, который связан с развитием большого числа болезней, включающих и сердечно-сосудистые заболевания [6].

Таким образом, поиск соединений, обладающих выраженным влиянием на активность протеинкиназы С, является перспективным направлением в создании препаратов для терапии сердечно-сосудистых патологий.

Цель исследования: молекулярное конструирование и изучение влияния прогнозируемых соединений на вазодилатирующую функцию эндотелия при недостаточности половых гормонов.

Материалы и методы

Исследуемые вещества представляют собой 2-стирилзамещенные производные 4-оксопиримидина, синтезированные на кафедре органической химии ПМФИ филиала ВолГМУ. Вероятность проявления различных видов биологической активности определена с помощью программы PASS, обновленная версия которой (Version 2006-09-28) позволяет прогнозировать не только фармакологические свойства моделируемых соединений, но и возможные молекулярные механизмы их действия.

Дальнейшее выявление эндотелиопротекторной активности у прогнозируемых соединений основано на их тропности к активным центрам ПКС, выявленной с помощью моделирования молекулярной динамики системы лиганд-фермент. В качестве макромолекулы-мишени была использована модель фермента протеинкиназы-С-η, полученная методом рентгеноструктурного анализа. Моделирование молекулярной динамики осуществлялось в области сайта связывания АТФ в субъединице С3. Трехмерные

модели молекул лигандов были построены с помощью программы HyperChem 8.0. Оптимизация геометрии молекул лигандов осуществлялась с использованием метода *ab initio* (UHF/3-21G*). Далее заряды рассчитывались методом *ab initio* DFT (B3LYP/6-31G(d,p)). Моделирование 196 нс времени системы «лиганд-фермент» в водном окружении осуществлялось при температуре 300 К в программе «Биоэврика».

Фармакологический эксперимент проводился на 66 крысах-самках, рандомизированных по массе (230-270 г) и возрасту (половозрелые – 4 месяца). Животные были разделены на 6 групп. Первая группа - ложнооперированные самки (14 крыс), 2-я группа - самки с моделью НПГ (12 крыс). Препарат сравнения Вессел Дуо Ф (сулодексид) вводили 3-й группе животных. Исследуемые вещества вводили 4-й группе (в-во № 1, 10 крыс), 5-й группе (в-во № 2, 10 крыс) и 6-й группе животных (в-во № 3, 10 крыс) (табл. 1). Для моделирования НПГ у самок осуществлялась экстерпация матки с придатками под наркозом (хлоралгидрат, 350 мг/кг).

Исследуемые вещества вводили внутривентриально в виде эмульсии (дистиллированная вода и твин) в дозе 50 мкг/кг (доза основана на ЛД₅₀) на 7-й день после экстерпации матки. Группам № 1 и № 2 вводили раствор твина в дистиллированной воде. Группе № 6 сулодексид (Весел Дуэ Ф) (Alfa Wassermann, Италия) вводился в дозе 30 ЕВЛ (единицы высвобождения липопротеинлипазы). Все вещества вводили в течение 3 недель.

На четвертой неделе, т.е. через месяц от начала эксперимента, измеряли скорость церебрального кровотока (СК) в теменной области головного мозга крыс. Для этого осуществляли вскрытие черепной коробки с помощью бормашины, периодически охлаждая поверхность с помощью физиологического раствора. Регистрацию кровотока осуществляли с помощью ультразвукового доплерографа, датчика УЗОП-010-01 с рабочей частотой 25 МГц и рабочей компьютерной программы ММ-Д-К-Minimax Doppler v.1.7. (Санкт-Петербург, Россия). Для оценки функционального состояния эндотелия сосудистого русла СМА осуществлялось стимулирование выброса эндогенного оксида азота с помощью анализатора - ацетилхолина (АХ (sigma, США)), в дозе 0,1 мг/кг [4].

Результаты опытов обрабатывали методом вариационной статистики. Вычисляли среднее значение и стандартную ошибку среднего значения. Полученные данные проверяли на нормальность распределения с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. В случае нормального распределения данных использовали параметрический t-критерий Стьюдента. При ненормальном распределении результатов эксперимента дальнейшую статистическую обработку данных проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни.

Результаты и их обсуждение

Предварительный анализ фармакологических свойств виртуальных структур программой PASS не является основополагающим и имеет лишь прогностическое значение для сужения круга соединений, для последующего молекулярного конструирования.

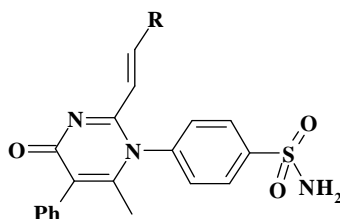


Таблица 1

Прогноз биологической активности 2-стирилпроизводных 4-(2,6-диметил-4-оксо-5-фенил-4Н-пиримидин-1-ил)-бензсульфамида

Вид биологической активности	Заместитель	Соединение		
		№ 1	№ 2	№ 3
	R			
Ra характеризует вероятность проявления активности				
Агонист D4-рецептора		0,88	0,83	0,82
Ингибитор ЦОГ		0,74	0,67	0,72
Мембраностабилизирующая		0,64	0,60	0,69
Нейропротекторная		0,56	0,50	0,56
Антагонист простагландина		0,47	0,37	0,45
Ингибитор нитрат редуктаз		0,41	0,41	0,39

Исходя из данных, приведенных в таблице 1, видно, что все соединения ряда 2-винилзамещенных производных 6-метил-4-оксо-5-фенилпиримидина с фрагментом *n*-аминобензсульфамида в положении № 1 могут обладать широким спектром фармакологических свойств. Наиболее характерными для большинства структур являются возможное влияние на дофаминергическую систему, ингибирование ЦОГ и нитрат редуктаз, а также проявление мембраностабилизирующей активности.

С целью повышения достоверности молекулярного конструирования структур, влияющих на активность протеинкиназ, осуществлен молекулярный докинг лиганд-биологическая мишень.

Результаты молекулярного докинга наиболее перспективных БАС показывают, что связывание лигандов с активным центром происходит различными способами. Одна из конформаций соединения № 1 в активном центре протеинкиназы С, полученная путем моделирования молекулярной динамики, приведена на рисунке 1.

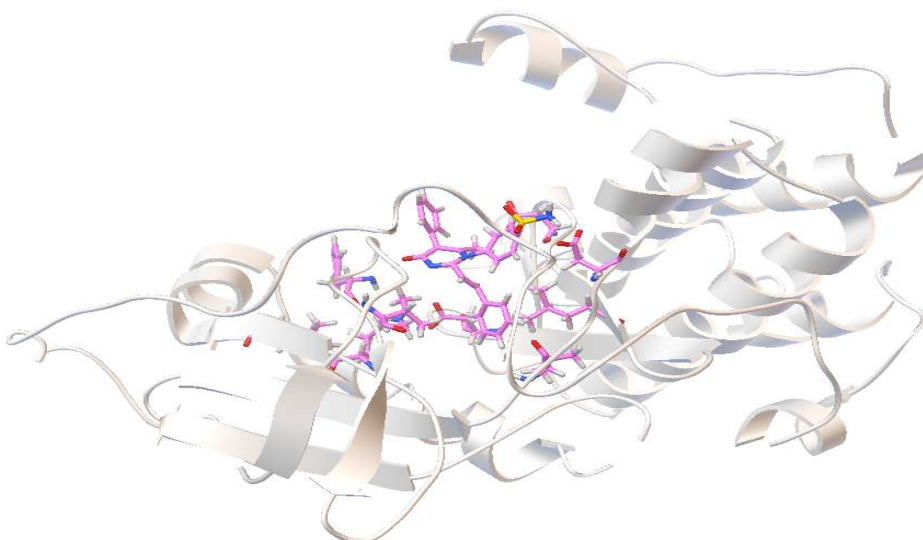


Рис. 1. Расположение вещества № 1 в активном центре протеинкиназы С-η.

По результатам анализа молекулярных траекторий оценивалась средняя длительность связывания лигандов с аминокислотами активного центра протеинкиназы-С-η (табл. 1).

Таблица 2

Результаты моделирования молекулярной динамики лиганд-ферментного взаимодействия для исследуемых веществ

Вещество	Длительность связывания, нс
№ 1	0,576
№ 2	0,416
№ 3	0,416

Данные, приведенные в таблице 2, свидетельствуют о возможности проникновения в сайт связывания в центре протеинкиназы С-η всех исследуемых соединений. При этом наибольшим временем удерживания характеризуются соединения № 1.

На основании результатов прогноза фармакологической активности БАС можно предположить, что соединение № 1 будет проявлять выраженную эндотелиопротекторную активность.

Таблица 3

Изменение скорости кровотока при введении АХ различным группам животных

Группа	Исх. Кровоток, см/с	АХ, см/с	% изменения
1. ЛО	4,23±0,15	6,01±0,22	42,99±4,81
2. НПГ	2,61±0,08	3,29±0,11	26,11±0,77*
3. НПГ+Сулодексид	4,5±0,27	6,01±0,38	33,72±3,06**,#
4. НПГ+В-Во № 1	4,22±0,2	5,6±0,25	33,05±2,91**,#
5. НПГ+В-во № 2	3,14±0,28	3,95±0,34	25,66±1,25*, α

б.	НПГ+В-во № 3	2,95±0,29	3,69±0,35	25,58±1,25 ^{*, α}
----	--------------	-----------	-----------	----------------------------

* - $P \leq 0,01$; ** - $P \leq 0,05$, достоверно по отношению к аналогичному показателю ЛО – группы животных;

- $P \leq 0,05$, достоверно по отношению к аналогичному показателю НПГ- группы крыс;

α - $P \leq 0,05$, достоверно по отношению к аналогичному показателю б группы крыс (НПГ+Сулодексид).

В группе № 1 у ЛО-животных исходная линейная средняя систолическая скорость кровотока (СК) составляла $4,23 \pm 0,15$ см/с. Введение специфичного стимулятора выброса вазодилатирующих веществ эндотелием (основным из которых является оксид азота) АХ приводило к увеличению СК до $6,01 \pm 0,22$ см/м, что превышает исходные показатели на $42,99 \pm 4,81\%$. Такой ответ на введение АХ характерен для интактных животных и согласуется с литературными данными [4].

В группе № 2 у животных с НПГ исходная СК составляла $2,61 \pm 0,08$ см/с, а введение АХ приводило к увеличению кровотока до $3,29 \pm 0,11$ см/с, т.е. на $26,11 \pm 0,77\%$, что в 1,65 раза достоверно ниже такого прироста у ЛО-группы. Т.о., у животных с НПГ недостаток эстрогенов может приводить к нарушению вазодилатирующей функции эндотелия [8], выраженной в снижении СК в ответ на введение АХ [1; 4], что, вероятнее всего, связано с уменьшенным выбросом эндотелием сосудорасширяющих веществ (в том числе и оксида азота).

В группе № 3 животным с НПГ, которым вводили препарат сравнения – Весел Дуо Ф, исходная СК составляла $4,5 \pm 0,27$ см/с, а кровоток, стимулированный введением АХ, составлял $6,01 \pm 0,38$ см/с, т.е. на $33,72 \pm 3,06\%$ превышающий исходные показатели. Прирост кровотока в ответ на введение АХ у животных, которым вводили Весел Дуо Ф, достоверно выше в 1,3 раза, чем у негативного контроля (группа № 2), что может говорить об эндотелиопротекторной активности препарата, выраженной в улучшении эндотелиозависимой вазодилатации при стимулировании выброса сосудорасширяющих веществ с помощью АХ [4].

В группе № 4 животным с НПГ, которым вводили исследуемое вещество № 1, при введении АХ кровоток увеличивался на $33,05 \pm 2,91\%$, что в 1,3 раза достоверно выше, чем у крыс группы № 2. Причем прирост кровотока близок к показателям группы № 3 (т.е. с препаратом сравнения). Улучшение способности сосудов к эндотелий-зависимому расширению, выраженному в увеличении СК, стимулированной АХ, может говорить о наличии эндотелиотропной активности вещества № 1.

В группах № 5 и № 6 животным с НПГ, которым вводили вещества № 2 и № 3, соответственно, прирост кровотока в ответ на введение АХ достоверно не отличался от

группы негативного контроля, что может говорить об отсутствии или наличии слабой эндотелиопротекторной активности данных соединений.

Выводы

В результате проведенных исследований можно сделать следующие выводы.

1. Недостаточность половых гормонов может приводить к эндотелиальной дисфункции, выраженной в изменении вазодилатирующей функции эндотелия, проявляющейся в снижении кровотока при введении АХ в 1,7 раза, по сравнению с ложнооперированной группой.
2. Вессел Дуо Ф, как препарат сравнения, обладает эндотелиопротекторной активностью, выраженной в увеличении скорости кровотока при введении АХ в 1,3 раза, по сравнению с группой негативного контроля.
3. Исследуемое вещество № 1 приводит к улучшению эндотелиальной функции, выраженной в увеличении СК, стимулированной АХ, аналогично препарату сравнения (в 1,3 раза), что может указывать на наличие выраженной эндотелиотропной активности у данного соединения.
4. Результаты фармакологических исследований в значительной мере подтвердили обоснованность результатов молекулярного конструирования.

Список литературы

1. Белоус А.С., Арустамова А.А., Покровский М.В. и др. Оценка коррекции L-Name и гипостроген-индуцированной эндотелиальной дисфункции препаратом импаза // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. - 2011. - Т. 4, № 13. - С. 116-120.
2. Воронков А.В., Глушко А.А. Новая математическая модель для прогнозирования эндотелиопротекторной активности веществ на основе молекулярного докинга // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2013. - № 3. - С. 42-47.
3. Трещинская М.А. Теоретические и практические аспекты применения L-аргинина с целью профилактики цереброваскулярной патологии // Украинский медицинский журнал. - 2011. - № 5. - С. 97.
4. Тюренков И.Н., Воронков А.В. Методический подход к оценке эндотелиальной дисфункции в эксперименте // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2008. - Т. 71, № 1. - С. 49-51.

5. Bonow R.O., Smaha L.A., Smith et. al. World Heart Day 2002 The international burden of cardiovascular disease: responding to the emerging global epidemic // *Circulation*. - 2002. - Vol. 106. - P. 1602-1605.
6. Cohen P. Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century // *Nat. Rev. Drug Discov.* - 2002. - Vol. 1 (4). - P. 309-315.
7. Karpov Iu.A. Disfunctciia arterial'nogo e`ndoteliia i ee znachenie dlia ocenqi prognoza u bol'ny`kh serdechno-sosudisty`mi zabolevaniami // *Kardiovasquliarnaia terapiia i profilaqtiqa*. – 2010. – Vol. 2. – P. 69–73.
8. Kim K.H., Bender J.R. Membrane-initiated actions of estrogen on the endothelium // *Mol Cell Endocrinol*. - 2009. - Vol. 308 (1-2). - P. 3-8.
9. Kolluru G.K., Siamwala J.H., Chatterjee S. eNOS phosphorylation in health and disease // *Biochimie*. - 2010. - Vol. 92. - P. 1186-1198.
10. Terpolilli N.A., Moskowitz M.A., Plesnila N. Nitric oxide: considerations for the treatment of ischemic stroke // *Cereb. Blood Flow Metab*. - 2012. - Vol. 32 (7). - P. 1332-1346.

Рецензенты:

Черников М.В. д.м.н., профессор, зав. кафедрой биологии и физиологии ГБОУ ВПО «Пятигорский медико-фармацевтический институт - филиал Волгоградского государственного медицинского университета», г. Волгоград;

Погорельый В.Е. д.б.н., профессор кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии ГБОУ ВПО «Пятигорский медико-фармацевтический институт - филиал Волгоградского государственного медицинского университета», г. Волгоград.