

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри супрамолекулярної хімії

Проф. Сергій Вікторович Рябухін

Протокол № ____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 20__ р.

ВИЗНАЧЕННЯ БІОМОЛЕКУЛЯРНОЇ МІШЕНІ БЕНЗИДАМІНУ ТА
ПРОЯСНЕННЯ ЙОГО МОЖЛИВОГО МЕХАНІЗМУ ДІЇ

Випускна кваліфікаційна робота магістра студента

напряму підготовки

102 Хімія

ОП Високі технології (Хемоінформатика)

Ключинського Антона Юрійовича

Науковий керівник, доцент

Завідувач кафедри молекулярної

біотехнології та біоінформатики

к. б. н. Нипорко Олексій Юрійович

Оцінка захисту роботи

АНОТАЦІЯ

В даній роботі проведено аналіз можливих бімолекулярних мішеней маловивченого лікарського препарату бензидаміну із метою дослідження його впливу на центральну нервову систему. Потенційні мішені, а саме ряд рецепторів ЦНС, були перевірені на спорідненість до препарату за методів докінгу, після чого отримані комплекси бензидамін-рецептор були досліджені методами молекулярної динаміки із метою визначення приблизних значень енергій зв'язування та оцінки вкладу тих амінокислотних залишків, які беруть найбільшу участь у взаємодії. На основі результатів були зроблені висновки щодо можливих застосувань препарату у терапевтичній практиці лікування захворювань ЦНС.

This work concentrates on analyzing possible bimolecular targets of little-studied drug benzydamine to explore its effect on central nervous system. Affinity of potential targets, namely group of CNS receptors, was checked by docking. The resulting complexes were then studied by means of molecular dynamics with the goal of estimation of binding energy as well as input of particular aminoacid residues, which participate the most in the binding. Conclusion about potential uses of benzydamine in therapy were drawn based on results.

Ключові слова: молекулярна динаміка, докінг, розрахункова хімія, дизайн лікарських засобів

ЗМІСТ

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	6
РОЗДІЛ 1. СИНТЕЗ ТА ІСТОРІЯ ДОСЛІДЖЕННЯ БЕНЗИДАМІНУ	6
1.1 Синтез	6
1.2 Фармакологічні властивості.....	6
РОЗДІЛ 2. ВПЛИВ БЕНЗИДАМІНУ НА ЦЕНТРАЛЬНУ НЕРВОВУ СИСТЕМУ	8
2.1 Загальні відомості.....	8
2.2 Серотонінові рецептори.....	8
2.3 Канабіноїдні рецептори	9
2.4 Мускаринові рецептори та дофамінові транспортери.....	10
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	11
РОЗДІЛ 3. ВИКОРИСТАНІ МЕТОДИ	11
3.1 Використанні біологічні бази даних	11
3.2 Докінг.....	11
3.3 Молекулярна динаміка	13
РОЗДІЛ 4. РЕЗУЛЬТАТИ.....	15
4.1 Результати докінгу	15
4.2 Результати молекулярно-динамічних симуляцій.....	21
ВИСНОВКИ	29
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	31

ВСТУП

Розробка лікарських засобів в останнє століття перетворилася на потужну індустрію, яка об'єднує під собою дуже широкий спектр різноманітних наукових галузей, методів та рішень. Основою підходу все частіше стає міждисциплінарність, тобто використання принципів однієї сфери знань задля вирішення проблем іншої.^{[1][2]} Особлива роль у цьому належить комп'ютерним наукам – вплив здобутків інформатики останніх десятиліть на всі області людського існування важко переоцінити. Не стоїть осторонь і дизайн ліків^[3] – основні комп'ютерні підходи, які сприяють йому це 1) розрахункові методи, що ґрунтуються на фізичних підходах, які дозволяють моделювати хімічні та біологічні взаємодії із різним ступенем точності, тобто обчислювальна хімія та біологія і 2) використання напрацювань у галузі машинного навчання та штучного інтелекту із метою створення та аналізу бібліотек і баз даних лікарських засобів та їх біологічних мішеней із подальшим передбаченням фармакологічних властивостей ще не синтезованих молекул, тобто біо- та хемоінформатика.^{[4][5]}

Однак важливо розуміти, що пошук нових біологічно активних сполук зовсім не є еквівалентом пошуку нових молекул – навпаки, все ширшого розповсюдження набуває перекваліфікація давно відомих лікарських препаратів для лікування інших хвороб^[6] або навіть використання речовин, які ще донедавна вважалися виключно шкідливими.^[7] Цікавим випадком, що об'єднує в собі ці дві категорії є бензидамін.

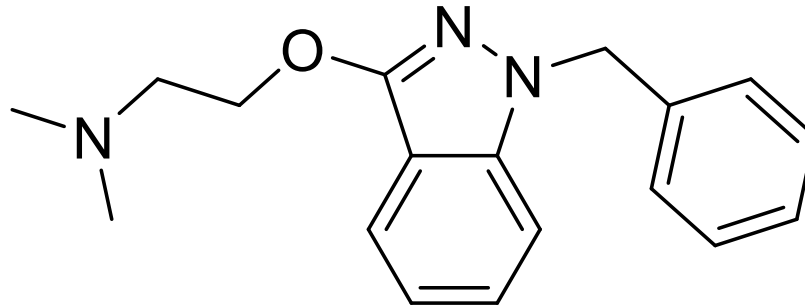


Рисунок 1. Структурна формула бензидаміну

Розроблений як місцевий протизапальний препарат та вперше синтезований у середині 60-х років^[8], він займав свою нішу на ринку певний час, до того як не був помічений його вплив на центральну нервову систему (ЦНС), що призвело до обмеження його розповсюдження у ряді країн і водночас викликало певний інтерес до розширення меж його фармакологічного застосування.

Враховуючи малу кількість інформації з приводу його механізму дії на ЦНС та опираючись на нові здобутки в області виділення рецепторів та підтвердження їх кристалічної структури^{[9][10]}, що відкрило можливість до їх аналізу за допомогою розрахункових методів, було б доцільно застосувати такий підхід для дослідження бензидаміну. **Задачею даної роботи** є встановлення найбільш перспективних мішеней цього препарату із метою створення перспектив його подальшого використання як нового лікарського засобу.

Актуальність полягає в постійній необхідності пошуку нових лікарських засобів, особливо таких, що здатні чинити вплив на ЦНС та лікувати ментальні розлади. Особливо релевантність застосування обчислювальних методів стає зрозумілою з огляду на події сучасної історії, такі як пандемія SARS-CoV-2 та збройна агресія Російської Федерації проти України, які ускладнюють проведення звичних лабораторних досліджень та спонукають шукати нові підходи до наукової практики^[11].

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

РОЗДІЛ 1. СИНТЕЗ ТА ІСТОРІЯ ДОСЛІДЖЕННЯ БЕНЗИДАМІНУ

1.1 Синтез

Бензидамін був вперше синтезований у 1964 році групою Silvestrini^[12], у пошуках нового місцевого протизапального засобу. У своїх пошуках вони орієнтувалися на схожість бензидаміну із рядом інших біологічно-активних сполук, що є похідними індазолу.

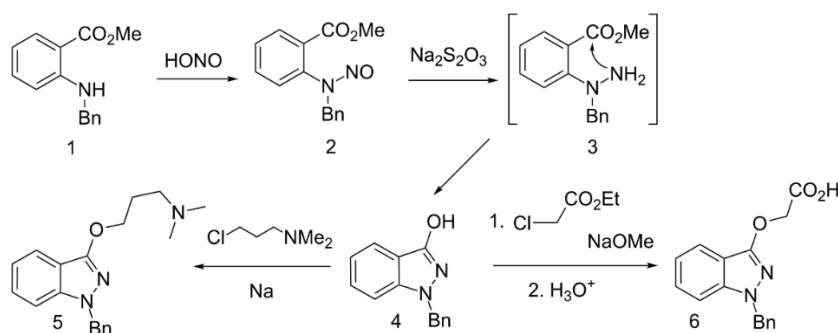


Схема 1. Історичний синтез бензидаміну

Альтернативний підхід був запропонований роком пізніше, тією ж групою^[13]:

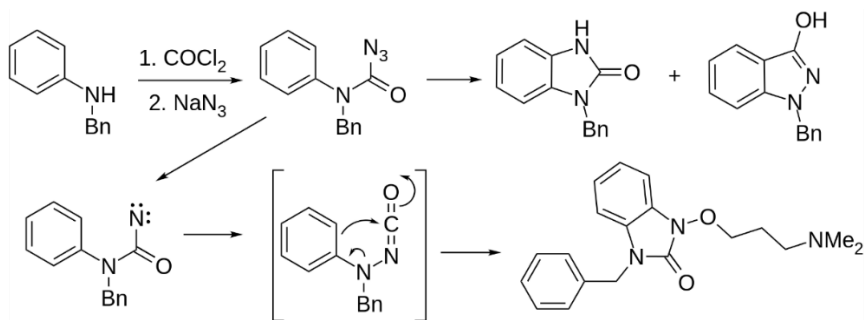


Схема 2. Альтернативний історичний синтез бензидаміну

1.2 Фармакологічні властивості

Відразу ж почалось дослідження його протизапальних властивостей^{[14][15][16]}. Було показано, що він затримується у запалених тканинах, зменшує запалення і послаблює біль при опіках, подразненнях, малих порізах та інших обмороженнях, при цьому може працювати як при ураженнях шкіри, так і слизових оболонок. Вважається, що він попереджає пошкодження кровоносних судин рухливими

лейкоцитами, хоча точно механізм його дії встановлений так і не був. На відміну від інших нестероїдних протизапальних засобів, він не інгібує циклооксигеназу, ліпооксигеназу, але скоріш за все пригнічує синтез простагландинів, що робить можливим його застосування для лікування гастроентеральних, ниркових запалень та подразнень сечостатевої системи. Окремо також було показано, що він має виражені антимікробіальні властивості^[17], що лише покращує його фармакологічний профіль у якості місцевого протизапального препарату.

Для нього був проведений також і ряд фармакологічних досліджень, хоча їх результати дещо суперечливі: так одні показували, що при внутрішньому вживанні близько 50% екскретуються без змін^[18], інші ж вказували що навпаки, більша частина – метаболізується, лише 5% виводяться.^[19]

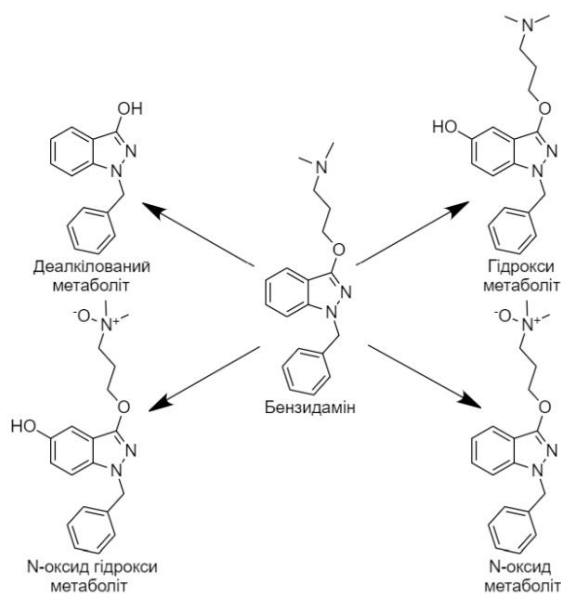


Схема 3. Основні метаболіти бензидаміну^[20]

Токсикологічні ефекти бензидаміну були показані як помірні – ЛД₅₀ залежало від шляху введення і коливалось від 33 мг\кг для внутрішньовенного до 1000 мг\кг для інтраперитонального.^[21] В Україні у якості місцевого протизапального засобу він випускається без рецепту та у різних фармакологічних формах: як спрей та полоскання для горла (Тантум Верде) та у вигляді саше для промивань (Тантум Роза). Із метою покращення його водорозчинності випускається у вигляді гідрохлориду.

РОЗДІЛ 2. ВПЛИВ БЕНЗИДАМІНУ НА ЦЕНТРАЛЬНУ НЕРВОВУ СИСТЕМУ

2.1 Загальні відомості

Фармакологічний ефект препарату на систематично майже не вивчався: існують певні анекдотичні повідомлення^{[22][23][24]} про виникнення психотичних епізодів, які можуть бути свідченням його спорідненості до нейрональних рецепторів. Типовими симптомами є стимуляція, тривожність та галюцинації. Відомостей про летальні випадки не поступало, як і про хронічні наслідки для здоров'я (окрім психологічного) при зловживанні, однак деякі країни, такі як Туреччина, обмежили безрецептурний продаж препарату.

Широкий спектр симптомів та малий інтерес наукового товариства до бензидаміну суттєво обмежують наше розуміння його механізму дії. Однак деякі фізіологічні спостереження все ж дозволяють зробити ряд припущень.^[25]

2.2 Серотонінові рецептори

По-перше, можна помітити його структурну подібність до нейромедіатору серотоніну, який є ендogenousним агоністом 5HT_{2A}-рецепторів, а також до диметилтриптаміну (ДМТ), який також є агоністом цих рецепторів, а також потужним галюциногеном. Серотонін бере участь у передачі нервового сигналу а також у регулюванні цілої низки процесів пов'язаних з вищою нервовою діяльністю: настрою, агресивності, здатності до навчання. Серотонінові рецептори є мішенями, зокрема, для антидепресантів. Галюцинативні ефекти бензидаміну можуть бути пояснені саме спорідненістю до цього класу рецепторів, і, якщо це так – він може стати перспективним об'єктом вивчення із метою розробки ліків для регулювання настрою.^[26]

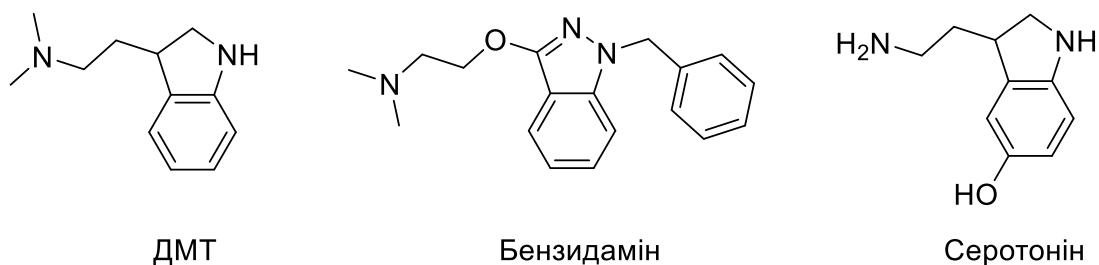


Рисунок 2. Бензидамін у порівнянні з агоністами 5HT_{2A}

2.3 Канабіноїдні рецептори

Іншою потенційною мішенню може бути канабіноїдна система, зокрема рецептори CB1 та CB2. Перший тип – найбільш розповсюджений саме в нервовій тканині головного мозку, де вони регулюють концентрацію цАМФ інгібуючи аденилат циклазу, але також наявні у печінці і стравоході, де можуть відповідати за метаболізм і відчуття голоду.^[27] Роль CB2 менш з'ясована, але вони здебільшого експерсуються на поверхні Т-клітин і регулюють зокрема їх активність, тобто беруть безпосередню участь в імунітеті і запальних процесах. Експерименти із синтетичними канабіноїдами показали, що пригнічення активності цих клітин допомагає зменшити запалення та послабити нейропатичний біль,^[28] а отже місцева протизапальна дія бензидаміну може бути пов'язана саме із цим. Ні ендоканабіноїди типу анандаміду, ні фітоканабіноїди, такі як хрестоматійний тетрагідроканабінол (ТГК) структурно не нагадують бензидамін. Однак відносно нещодавно^[29] із дослідницькими цілями було синтезовано цілу серію синтетичних канабіноїдів на основі індазолу, які мали на порядки більшу спорідненість до СВ-рецепторів, ніж ТГК і ось із ними бензидамін має помітну структурну подібність.

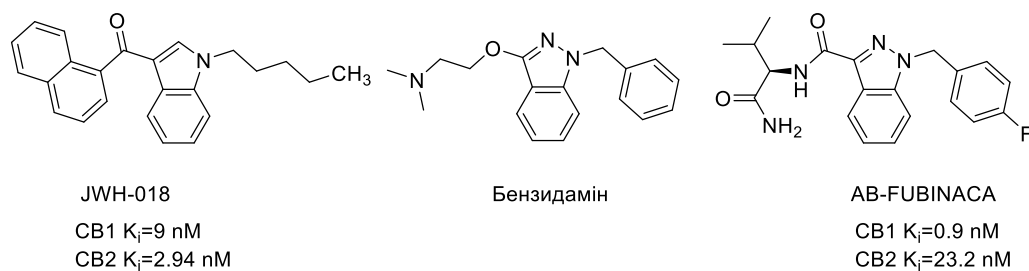


Рисунок 3. Бензидамін у порівнянні з агоністами СВ

Препарати з цього ряду є дуже потужними анальгетиками, однак заборонені для вільного продажу в зв'язку із високим потенціалом зловживання.

2.4 Мускаринові рецептори та дофамінові транспортери

Одним із симптомів, який асоціювали зі зловживанням бензидаміну був делірій, який в свою чергу часто порівнювали із ефектами від споживання мускарину – основного діючого алкалоїду мухомору. Функції мускаринових ацетилхолінових рецепторів доволі різноманітні: вони беруть участь у терморегуляції, пульсі та секреції^[30]. Хоча структурно і можна бачити, що ліганди відрізняються, однак схожа симптоматика дозволяє занести і цей рецептор в список потенційних мішеней.

Дофаміновий же транспортер є потенційною мішенню тому що іншим симптомом зловживання бензидаміну є стимуляція, що може бути спричинена інгібуванням цього рецептору, основна роль якого – зворотне захоплення дофаміну та його виведення з пресинаптичної щілини. Відповідно, інгібітори дофамінового транспортеру можуть бути потенційними антидепресантами або ліками для лікування синдрому дефіциту уваги та гіперактивності (СДУГ).^[31]

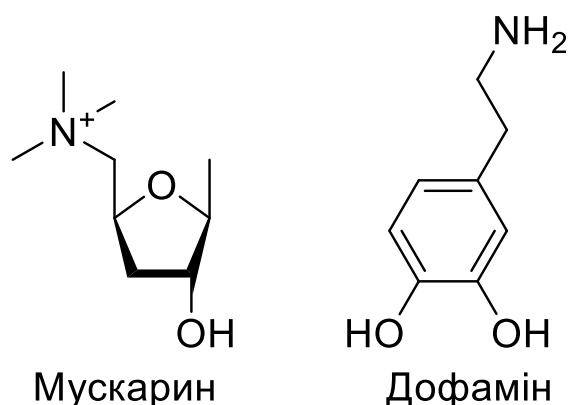


Рисунок 4. Мускарин і дофамін

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 3. ВИКОРИСТАНІ МЕТОДИ

3.1 Використані біологічні бази даних

Для отримання кристалічних структур білка була використана база даних Protein Data Bank (PDB), яка підтримується спільною університетів США RCSB. Використані структури спираються на дані кристалографічного аналізу комплексів рецепторів CB1, CB2, 5-HT_{2A}, CHRM₂ (мускариновий) та SLC6A3 (дофаміновий транспортер) із різноманітними лігандами, характерними для кожного рецептору. Дані зберігаються у форматі, .pdb який забезпечує збереження просторової структури. Також, альтернативно до кристалографічного аналізу можливе використання даних криоелектронної мікроскопії.

3.2 Докінг

Для отримання попередніх даних про структуру можливих комплексів, які бензидамін може утворювати із заданими рецепторами було використана безкоштовна пробна версія програмного забезпечення для докінгу LeadIT.

Докінг – розрахунковий метод, який дозволяє отримати приблизну інформацію про орієнтацію певної молекули (зазвичай – малої, однак існують варіанти і для докінгу білків між собою^[31]) у сайті зв'язування рецептору. Для того, щоб провести докінг нам потрібно не просто структура білка – нам потрібно щоб на ній був визначений активний сайт. Саме тому дуже часто кристалічні структури записують із лігандом в активному сайті – програмне забезпечення часто здатно відрізнити малу молекулу від протеїну і

інтерпретувати оточення ліганду як активний сайт. Тому в усіх структурах, взятих з PDB, були наявні ліганди.

Хімічний простір усіх можливих комплексів ліганд-білок може бути нескінченним – він би вимагав урахування усіх можливих конформацій не тільки ліганду, але й самого рецептору. Для полегшення докінгу зазвичай структура рецептору записується як жорстка (але іноді – у кількох основних конформаціях), структура ж ліганду може бути гнучкою (Flexible docking)^[32]. Кожна комбінація конформації ліганду із конформацією рецептору називається «позою».

Програми для докінгу відповідно генерують велику кількість можливих поз, кожна з яких оцінюється за допомогою певних скорингових функцій, які дають можливість оцінити сприятливість тієї чи іншої орієнтації. Більша частина скорингових функцій засновані на принципах молекулярної механіки^[33], тобто оцінюють енергію молекули, яка описується як набір осциляторів, у певному силовому полі, що утворене білком-рецептором. Енергія комплексу тоді оцінюється як сума різноманітних енергій: взаємодії з наявним розчинником (енергія сольватації), енергія конформаційних змін у ліганді, енергія взаємодій рецептору з лігандом, тощо. Негативна вільна енергія в такому випадку свідчить про сприятливу взаємодію:

$$\Delta G_{bind} = \Delta G_{solvent} + \Delta G_{conf} + \Delta G_{int} + \Delta G_{rot} + \Delta G_{t/t} + \Delta G_{vib}$$

Також можливий підхід до скорингових функцій, що називається емпіричним^[34]. В ньому оцінюється кількість різноманітних типів взаємодій що присутні у комплексі ліганд-протеїн або зміна площі, доступної для сольватування при переході від вільних протеїну та ліганду до їх комплексу^[35]. Такий підхід потребує набагато менше часу, ніж розрахунки вільної енергії тому гарно працює при необхідності докінгу великої кількості поз, однак забезпечує ще меншу точність.

Ще одним підходом є knowledge-based («заснований на знанні»)^[36]. Він полягає на інтенсивному використанні даних про структури відомих

комплексів та виходить із постулату про те, що певні типи взаємодій статистично більш ймовірно зустрічаються в «успішних» комплексах, а тому базують свою оцінку саме на кількості таких взаємодій.

Цікавим поєднанням новітніх технологій із сфери штучного інтелекту та нейронних мереж та обчислювальної біології\хімії є функції, побудовані на основі машинного навчання^[37]. Такі підходи засновані на принципі того, що нейронна мережа сама визначає найбільш сприятливий варіант розрахунку скорингової функції на основі великої кількості даних та можуть брати до уваги певні «приховані» фактори, які об'єднують структури у певному наборі даних, але не враховуються ні однією з функцій що надано вище.

Враховуючи невелику кількість рецепторів і відносну нескладність структури самої молекули, було обрано програмне забезпечення, яке використовує саме перший підхід, тобто молекулярно-механічний.

3.3 Молекулярна динаміка

Комплекси, отримані за допомогою докінгу, дуже часто не приймають до уваги багатьох деталей, не обов'язково відповідають дійсності і не є гарантовано енергетично оптимізованими. Для отримання більш точних даних про енергію та структуру комплексів є сенс просимулювати комплекси рецептор-ліганд у середовищі, що більш-менш відповідає його стану у клітині – тобто із урахуванням розчинника. Так як кількість атомів у системі надзвичайно велика, застосування точних квантово-механічних розрахунків не є доцільним, в такому випадку краще застосовувати квазікласичне наближення. Як і у випадку докінгу, ми розглядаємо систему як поведінку сукупності осциляторів у певному силовому полі, але не фіксуємо конформації молекул комплексу та не обмежуємося розглядом лише малого фрагмента білку, що відповідає за зв'язування. Молекулярна динаміка симулює поведінку комплексу ліганд-протеїн у розчині протягом певного (дуже малого, десятків

або сотень наносекунд) часу, таким чином модель прагне за цей час набути мінімальної енергії. Структури, які ми отримуємо після симуляції зазвичай є більш енергетично-вигідними, ніж вихідні, а отже з більшою ймовірністю відповідають реальності.

Для розрахунку молекулярної динаміки використовувалося безкоштовне програмне забезпечення Gromacs 5.1.2 на потужностях обчислювального центру університету КНУ ім. Тараса Шевченка. Топологія лігнадів генерувалась за допомогою безкоштовного сервісу SwissParam.^[38] Використане силове поле – CHARMM36^[39]

Для генерації вихідних структур для симуляції першим ділом ми включали структури комплексів у періодичні бокси, які після цього заповнювались водою та іонами (досягнення більш наближених для реальних умов) за допомогою додатку genion. Після цього для виключення зіткнень молекул проводилася обмежена молекулярна динаміка протягом 10 пс, система урівноважувалася за умов сталої температури у 310 Кельвінів. Після цього проводилася необмежена молекулярно-динамічна симуляція протягом 100 наносекунд.

РОЗДІЛ 4. РЕЗУЛЬТАТИ

4.1 Результати докінгу

Як тільки ми визначилися із потенційними цілями для перевірки можна приступати до власне розрахунків зв'язування комплексів білок-ліганд. Першою стадією буде докінг – він дасть нам можливість оцінити відносну спорідненість бензидаміну до ліганду та обрати комплекси із найбільшим значенням docking score для подальшого аналізу методами молекулярної динаміки, і на додачу – допоможе легко згенерувати комплекси, в яких ліганд знаходиться у сайті зв'язування, що полегшить нам генерацію топологій для вищезгаданої молекулярної динаміки.

Для докінгу була використана пробна безкоштовна версія програмного забезпечення LeadIt. Усі кристалічні структури рецепторів людини^{[40][41][42][43]} були взяті із веб-сайту <https://www.rcsb.org>, а саме за наступними індексами: [5TGZ](#) (CB1, канабіноїдний підтип 1), [5ZTY](#) (CB2, канабіноїдний підтип 2), [7LWD](#) (5HT-2A, серотоніновий, підтип 2A), [5ZK8](#) (CHRM2, мускариновий, підтип M2), [4M48](#) (SLC6A3 або DAT, дофаміновий транспортер)

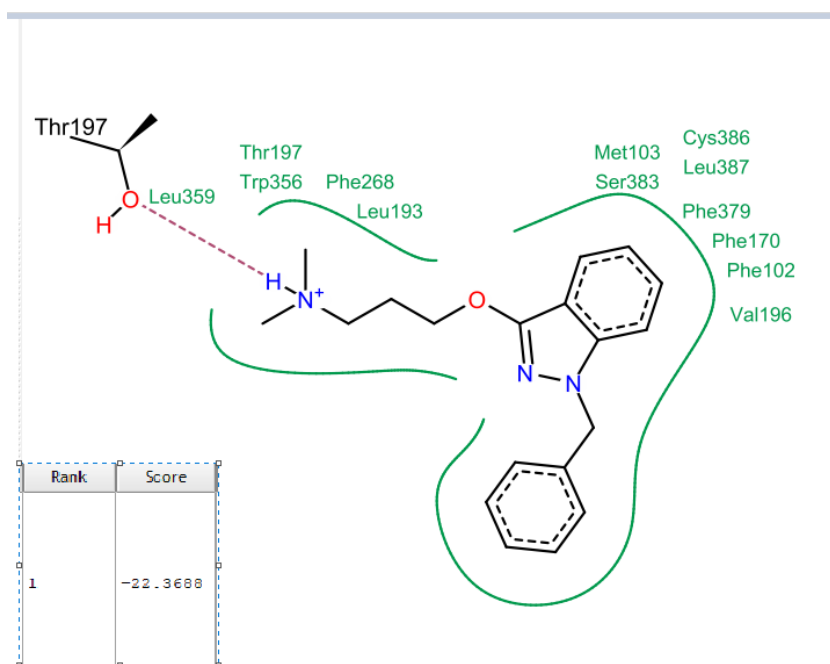


Рисунок 5. Діаграма взаємодій бензидаміну у сайті зв'язування CB1

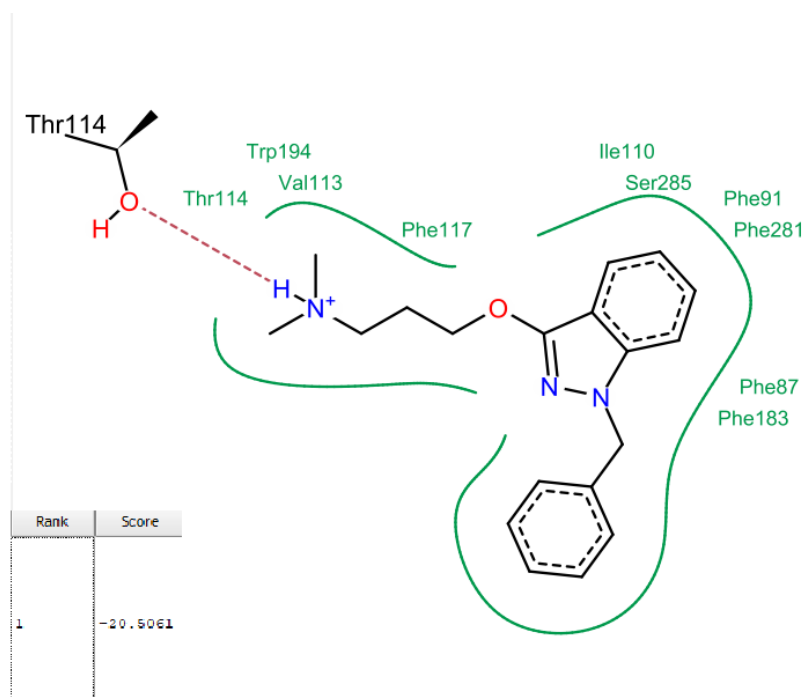


Рисунок 6. Діаграма взаємодій бензидаміну у сайті зв'язування CB2

Докування із канабіноїдними рецепторами (Рис. 5 та 6) показало гарні результати для обох молекул, із дещо більшим значення docking score для CB1. Для порівняння, нижче наведені результати докінгу цих же рецепторів із JWH-018 (Рис. 7 та 8). Можна бачити, за даний алгоритм узгоджується із експериментальними даними – значення docking score для JWH-018 із CB2 менше ніж із CB1, а це значить що він краще зв'язується (тобто має меншу константу зв'язування, K_i , що для JWH-018 і було продемонстровано експериментально). Також можна бачити що тип взаємодії для бензидаміну схожий – в обох випадках протонований амін утворює водневий зв'язок із треоніном, що також узгоджується із тим, що сайти зв'язування для канабіноїдних рецепторів схожі між собою. У випадку ж із JWH-018 відсутність легко протонуємого аміну на краю молекули не дає утворити такий тип взаємодії і основний вклад припадає на ароматичні і неполярні контакти.

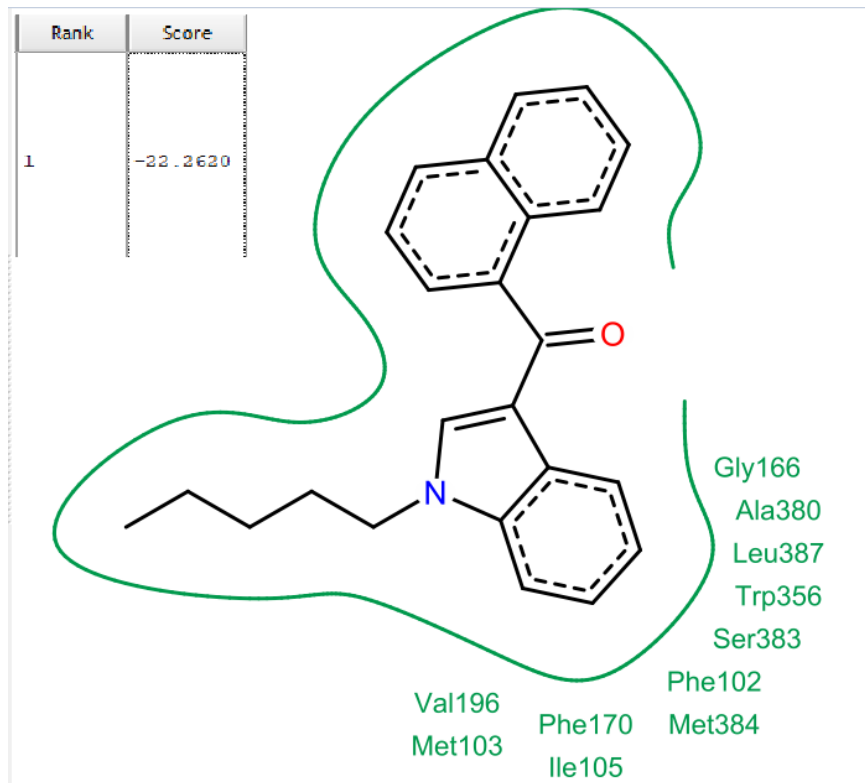


Рисунок 7. Діаграма взаємодій JWH-018 у сайті зв'язування СВ1

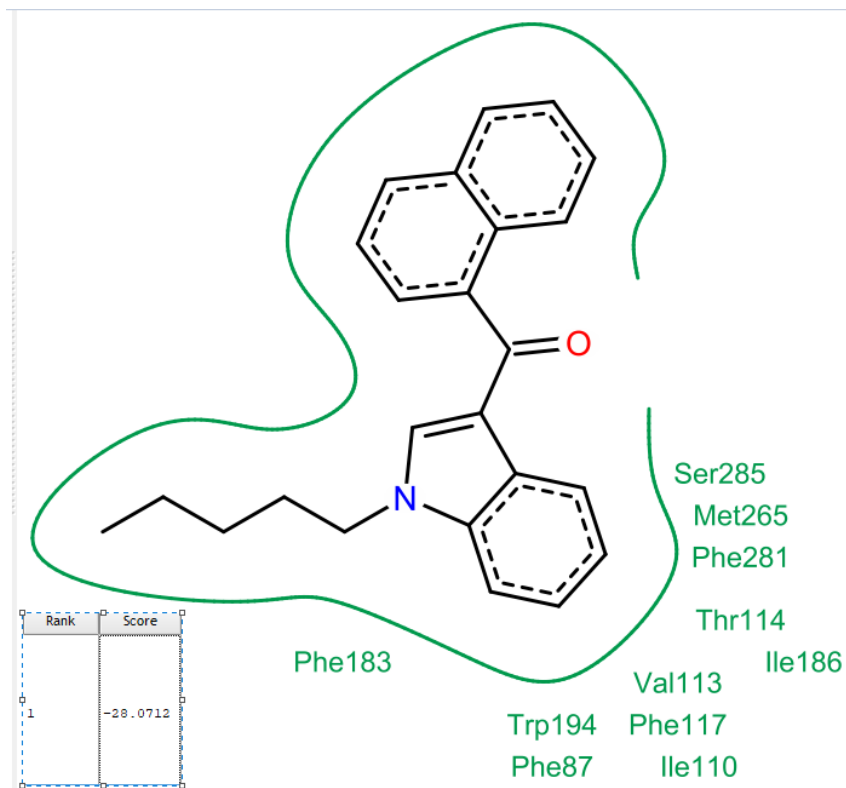


Рисунок 8. Діаграма взаємодій JWH-018 у сайті зв'язування СВ2

Наступним став докінг із 5HT-2A рецептором, він показав дещо менші значення для обох сайтів зв'язування (Рис. 9 та 10). Однак цікаво, що вони виявились схожими між собою – це могло б означати, за умови що спорідненість бензидаміну виявиться загалом достатньою, що він міг би модулювати взаємодію рецептора із собою ж, збільшуючи чи зменшуючи константу взаємодії в залежності від концентарції.

Докінг із мускариновим рецептором (Рис. 11) та дофаміновим транспортером (Рис. 12) дав дещо гірші результати, ніж для канабіноїдних, але кращі, ніж для 5HT2A. Між собою вони виявились більш-менш співмірними.

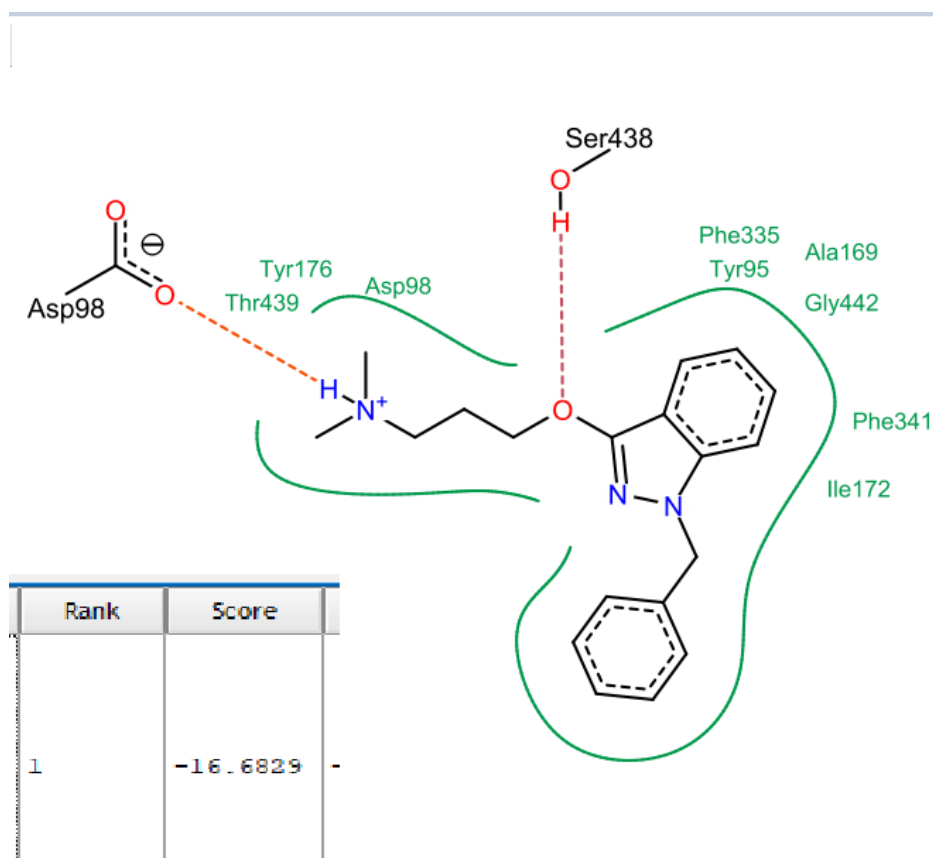


Рисунок 9. Діаграма взаємодій бензидаміну у сайті зв'язування 5HT2A

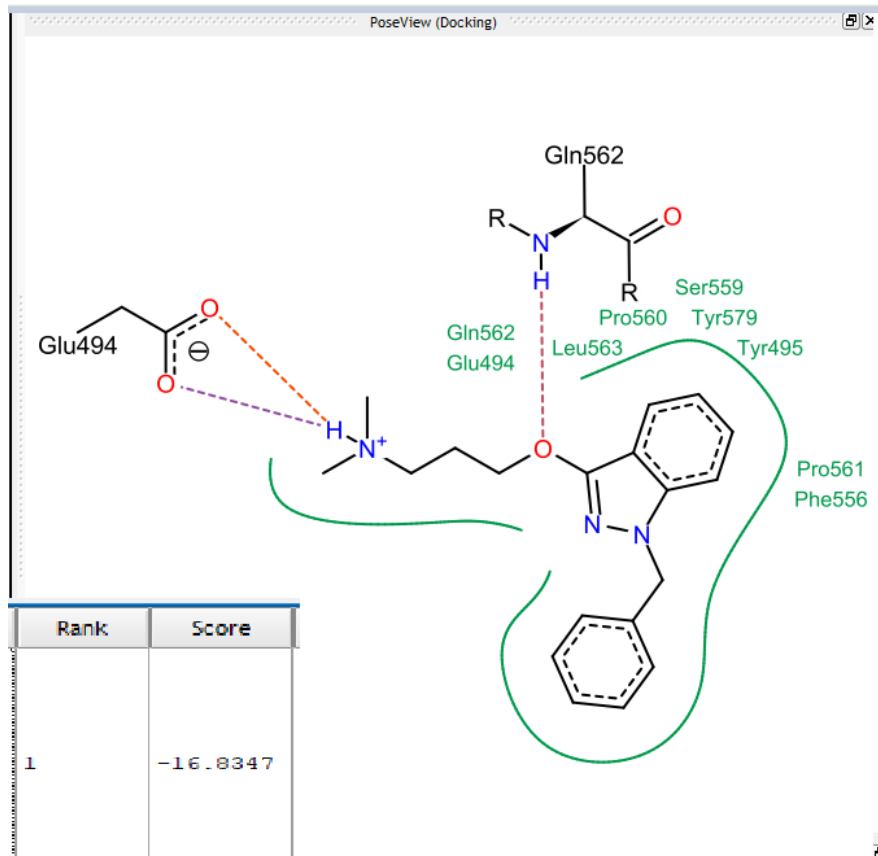


Рисунок 10. Діаграма взаємодій бензидаміну в алостеричному сайті 5HT2A

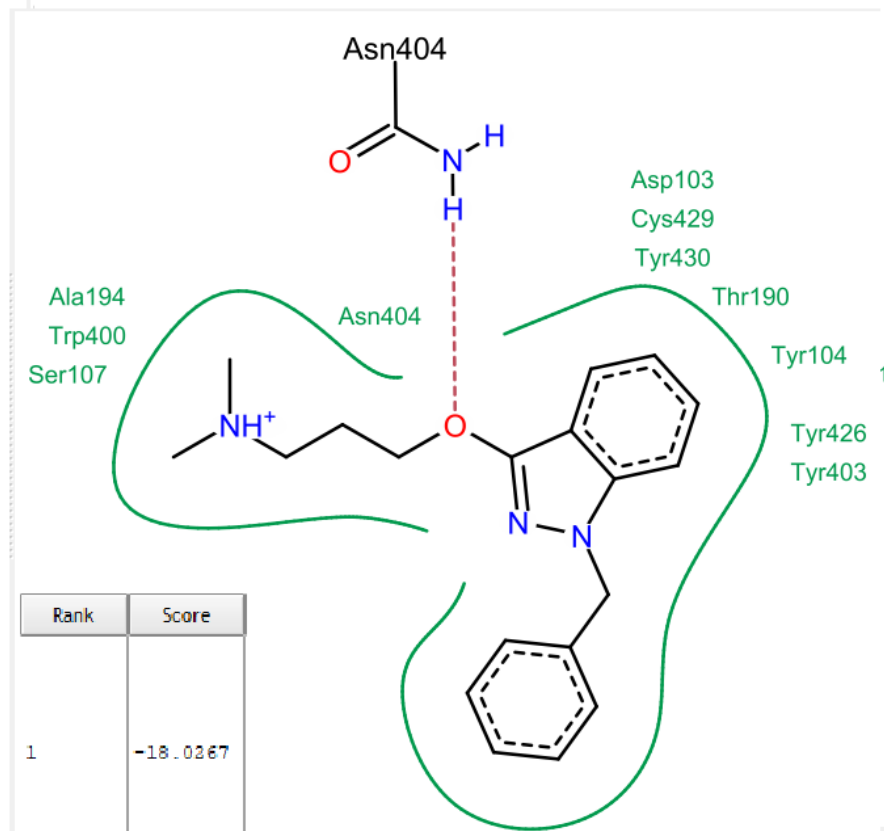


Рисунок 11. Діаграма взаємодій бензидаміну у сайті зв'язування CHRM2

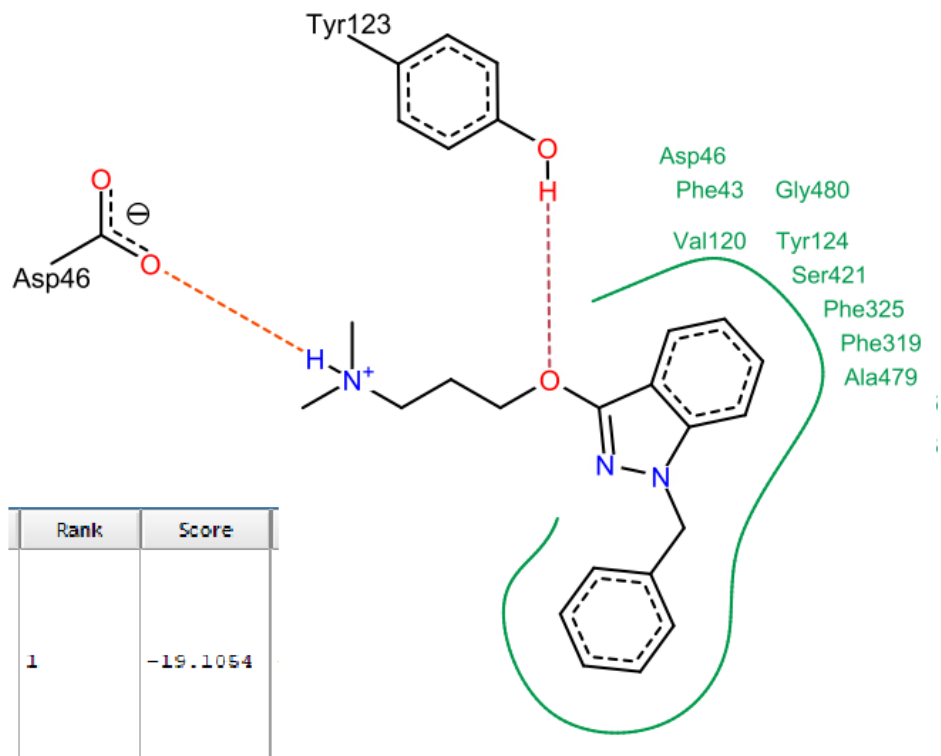


Рисунок 12. Діаграма взаємодій бензидаміну у сайті зв'язування DAT

Важливо однак розуміти, що докінг дає лише відносні і неточні результати, висновки на основі яких можуть виявитись невірними. Для підтвердження наших очікувань є сенс звернутися до засобів молекулярної динаміки.

Рецептор	CB1	CB2	5HT2A (сайт зв'язування)	5HT2A (алостеричний сайт)	CHRM2	DAT
Docking score	-22.37	-20.05	-16.68	-16.83	-18.03	-19.11

Таблиця 1. Значення розрахованих docking score найсприятливіших поз бензидаміну у сайтах зв'язування рецепторів

4.2 Результати молекулярно-динамічних симуляцій

Комплекси, отримані за допомогою докінгу, були використані як початкові структури у симуляціях молекулярної динаміки. Такі симуляції генерують багато різних даних, однак нас особливо цікавлять лише деякі із них.

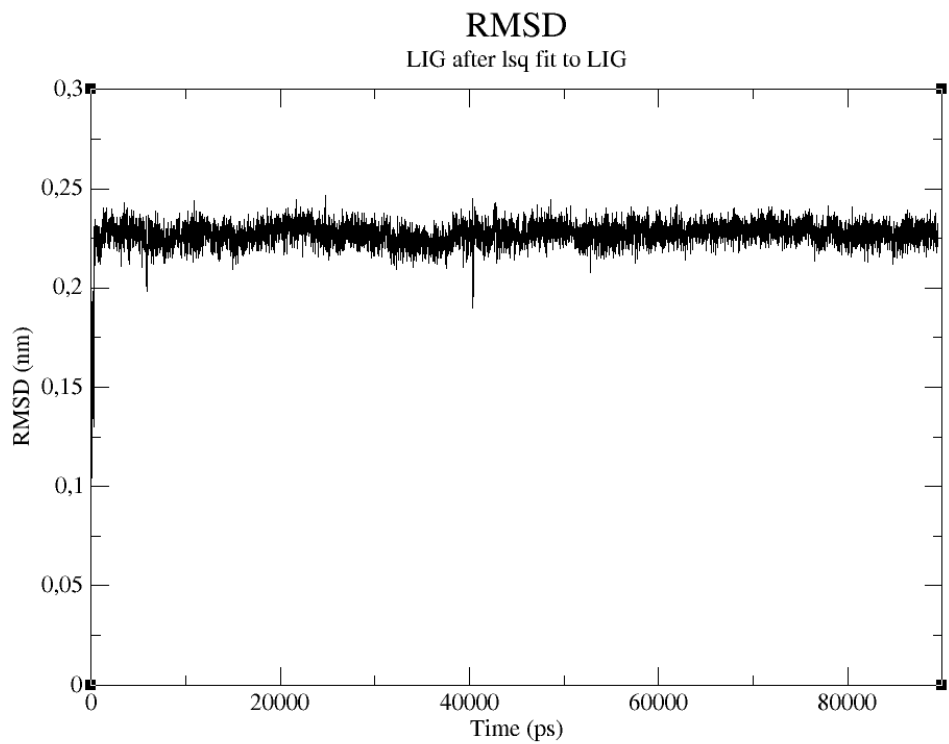
Для того щоб оцінити стабільність утвореного комплексу доречно по-перше проаналізувати RMSD (root-mean-square deviation, середньоквадратичне відхилення) для молекул протягом часу симуляції. Ця величина показує, наскільки сильно атоми у кожний момент часу відхиляються від своїх початкових позицій, тобто як сильно рухається наш ліганд у сайті зв'язування. Графіки зміни RMSD із часом по-перше дають нам уявлення наскільки коректною з точки зору молекулярної динаміки була структура початкового комплексу – по власне абсолютній величині відхилення, наскільки молекула стабілізувалася у сайті зв'язування – по тому, чи вийшла вона на деяке плато, наскільки вона рухлива – по амплітуді осциляцій атомів після стабілізації.

Для випадку СВ1 (графік 1) можна бачити, що відразу після початку симуляції відбувся зсув на $\sim 2.5 \text{ \AA}$, що може свідчити про те, що рецептор відразу зайняв більш вигідну позицію, після чого стабільно зафіксувався і майже не рухався, що є ознакою ознакою сильної взаємодії.

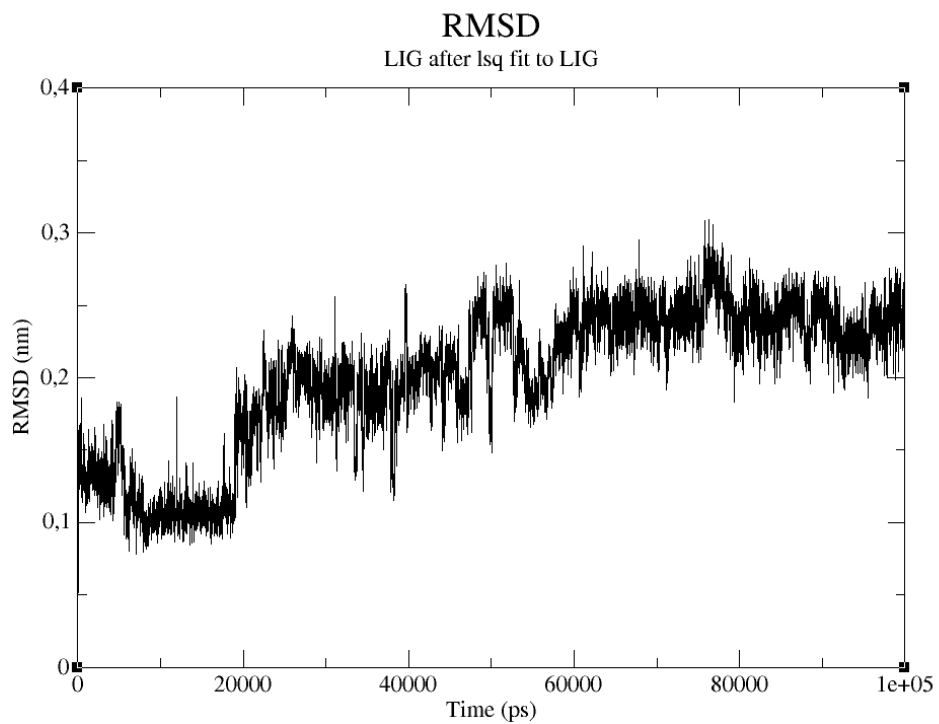
У СВ2 (графік 2) ситуація схожа, однак ліганд потребує дещо більше часу для стабілізації, і в самому сайті він більш рухливий, що може бути спричинено меншою спорідненістю до рецептору.

Мускариновий рецептор (графік 3) також миттєво стабілізувався, однак амплітуди коливань є дещо більшим, що свідчить про більшу рухливість у сайті зв'язування.

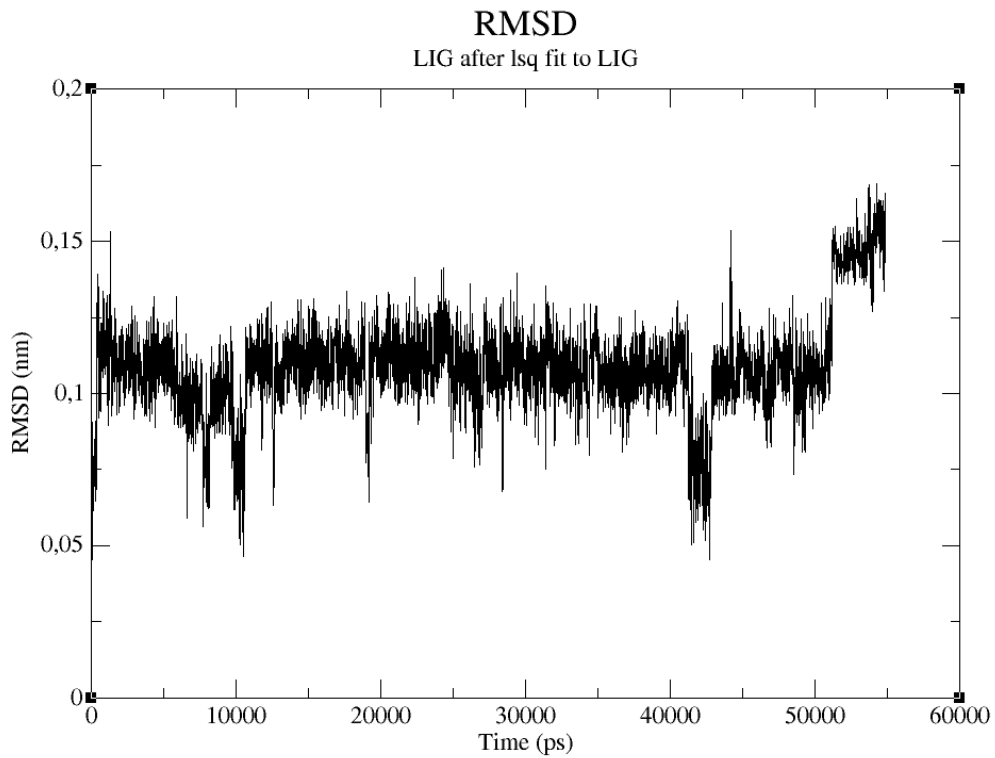
Загалом схожа ситуація спостерігається і для 5HT-2A (графіки 4 і 5) і для дофамінового транспортеру (графік 6).



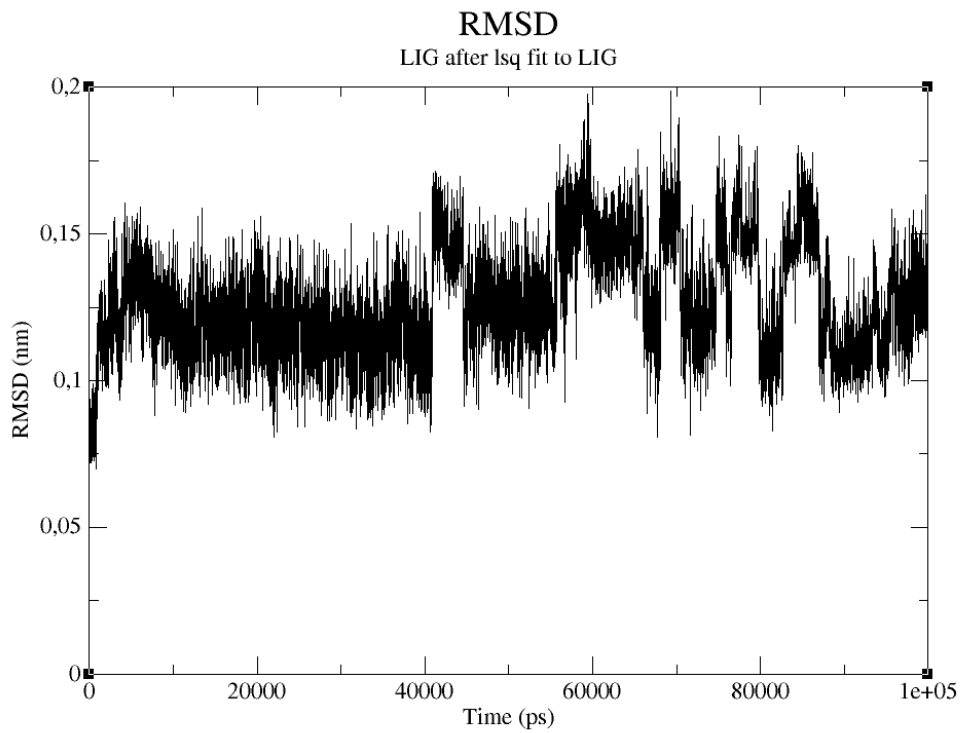
Графік 1. Середньоквадратичне відхилення атомів ліганду у CB1 рецепторі



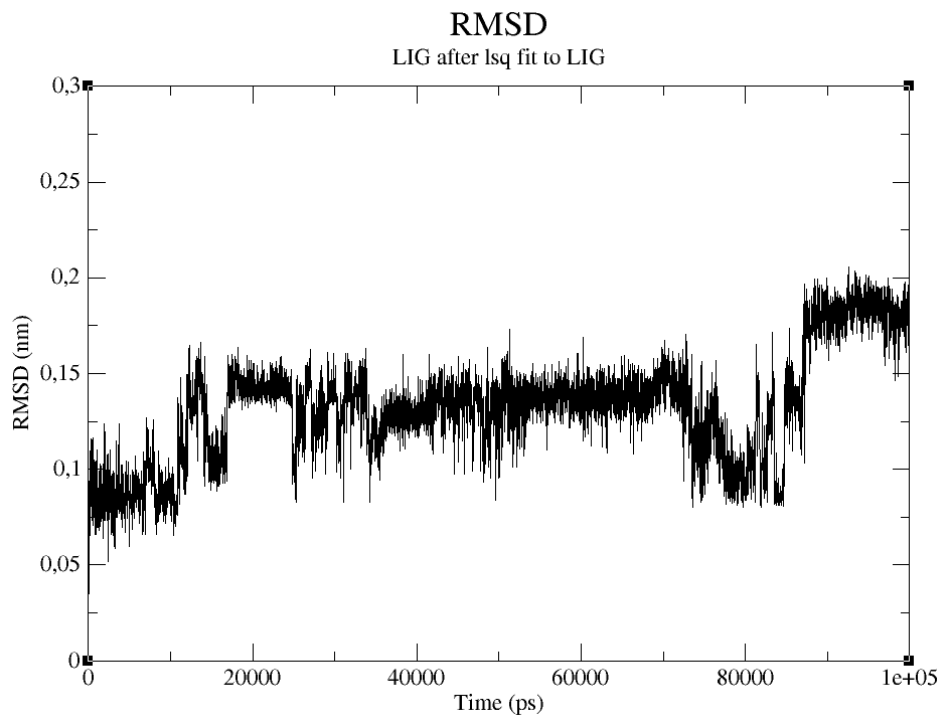
Графік 2. Середньоквадратичне відхилення атомів ліганду у CB2 рецепторі



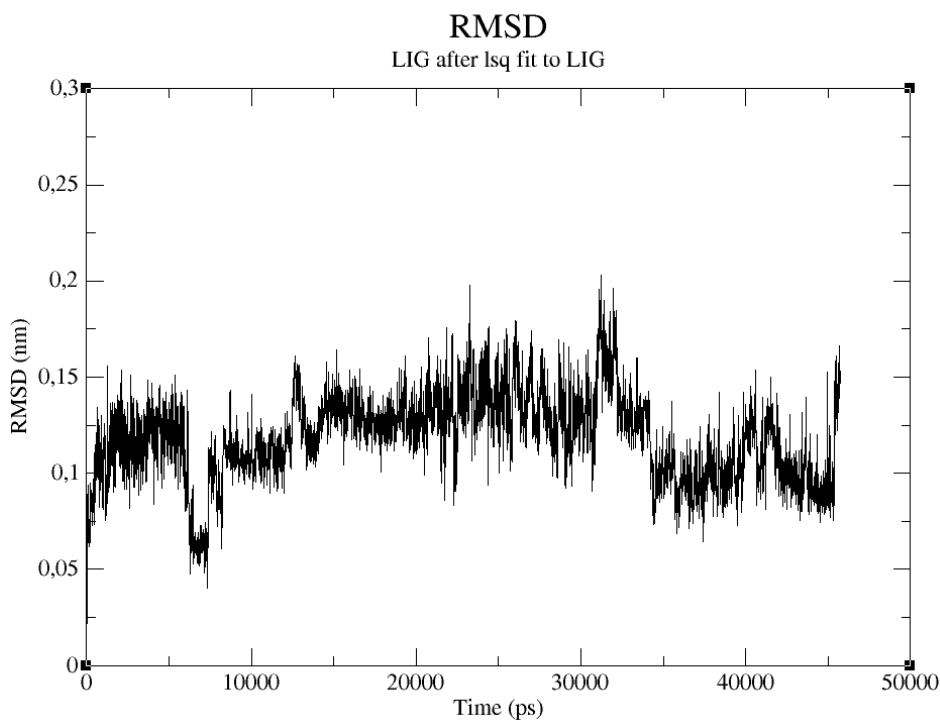
Графік 3. Середньоквадратичне відхилення атомів ліганду у мускариновому рецепторі



Графік 4. Середньоквадратичне відхилення атомів ліганду у сайті зв'язування 5HT-2A рецептору



Графік 5. Середньоквадратичне відхилення атомів ліганду у алостеричному сайті 5HT-2A рецептору



Графік 6. Середньоквадратичне відхилення атомів ліганду у дофаміновому транспортері

Але більш важливі параметри, що дають нам змогу оцінити енергетичну вигідність утворених комплексів – це енергії взаємодії лігнда та рецептора. Усі енергетичні дані зберігаються у файл .erd. Для наших потреб достатньо знати

суму енергій електростатичної взаємодії та взаємодії Ленарда-Джонса між молекулою ліганда та рецептором. Також корисно розрахувати із цих значень вільну енергію взаємодії – вона рахується із суммарної енергії взаємодій за допомогою формули $-kT * \ln(e^{\frac{E}{kT}})$

Ці енергії репрезентують лише енергії взаємодії – вони відрізняються від енергій реакції у більшу сторону (за модулем, за абсолютним значенням вони менші), бо не враховують затрати енергії, через які повинні пройти ліганд і рецептор (наприклад, енергії відштовхування та енергії конформаційних змін обох молекул), задля того, щоб комплекс утворився, однак все одно дають можливість кількісно оцінити взаємодії і, найголовніше – порівняти їх між собою. Цікаво те, що енергії для канабіноїдних рецепторів вийшли меншими за модулями, не дивлячись на кращі docking score (табл. 2)

Рецептор	CB1	CB2	5HT2A (сайт зв'язування)	5HT2A (алостер.сайт)	CHRM2	DAT
Кулонівська енергія, кДж/моль	-32.41±2.2	-38.42±5.3	-74.92 ± 2.7	-122.05 ± 8.9	-53.67 ±10	-298.05±7
Енергія Ленарда-Джонса, кДж/моль	-127.96±3.7	-102.4±4.3	-136.24 ± 3.7	-141.44±0.82	-131.4 ± 4.2	-75.86±5.8
Сума, кДж/Моль	-160.37±5.5	-140.8±5.2	-211.16 ± 5.2	-263.49 ± 8.2	-185.07±13	-373.91±10
Вільна енергія, кДж/моль	-124.95	-106.7	-172.87	-208.8	-135.273	-210.792

Таблиця 2. Енергії взаємодій рецептор-ліганд

Останнім фактором, який є сенс проаналізувати є кількість утворених водневих зв'язків. Для усіх рецепторів, окрім DAT вона була повністю узгоджена із даними докінгу і коливалась від 1 до 3. Для DAT вона вийшло неочікуванно високою і становила 3-5. Велика кількість водневих зв'язків для нього може бути причиною такою низької енергії і свідчити про сприятливу взаємодію.

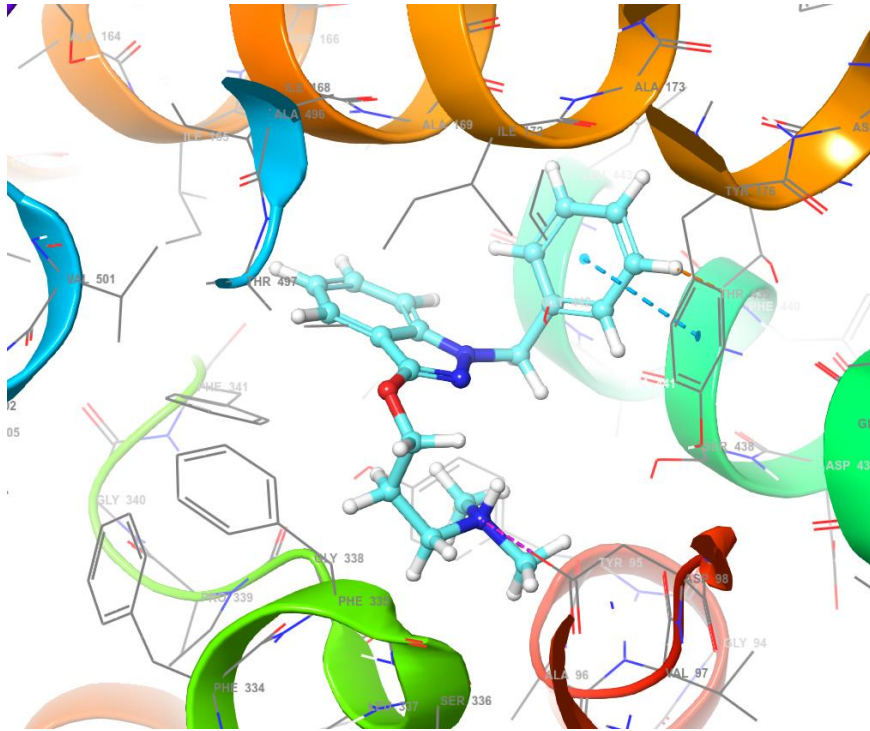


Рисунок 17. Тривимірне зображення бензидаміну в алостеричному сайті 5HT2A рецептору

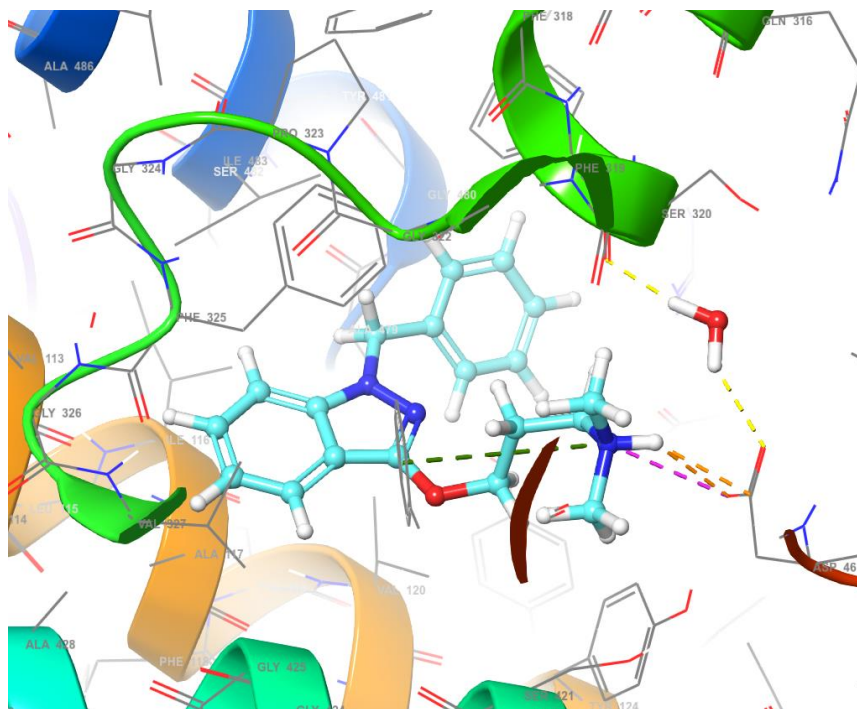


Рисунок 18. Тривимірне зображення бензидаміну у сайті зв'язування DAT

ВИСНОВКИ

В ході роботи були проаналізовані можливі взаємодії лікарського засобу бензидаміну із рядом його потенційних біомолекулярних мішеней – рецепторів ЦНС.

Згідно із результатами докінгу найбільш вірогідними мішенями виявилися дофаміновий транспортер та алостеричний сайт 5HT-2A, меншу спорідненість показали основний сайт зв'язування 5HT-2A та CHRМ2. Всупереч початковим очікуванням, канабіноїдні рецептори продемонстрували найменшу (за модулем) енергію взаємодії. Молекулярна динаміка дала змогу підтвердити правильність структур, отриманих за допомогою докінгу та оцінити енергії взаємодії рецепторів із лігандом.

Сприятливі результати розрахунків для дофамінового транспортеру дозволяють прогнозувати його активність по відношенню до цього рецептору і пояснити наявність симптомів стимуляції, описаних у повідомленнях щодо його зловживання. Не дивлячись на його структурну несхожість із типовими лігандами DAT, їх структурне різномаяття^[44] допускає можливість дослідження його у якості інгібітору даного рецептору, що в свою чергу може відкрити шлях до його потенційного застосування, наприклад, у якості препарату для послаблення симптомів синдрому дефіциту уваги та гіперактивності (СДУГ)^[45]

Дещо менша спорідненість до сератонінового рецептору може бути пояснена більшим розміром молекули, у порівнянні із серотоніном, не дивлячись на схожий центральний елемент. Афінність до 5HT-2A дозволить пояснити його ефекти подібністю до психоделіків або передбачити можливу антидепресантну активність.

Гірші результати розрахунків взаємодії із канабіноїдними рецепторами все ж не можуть бути достатньою підставою відмовитись від подальших його дослідження у якості їх ліганду, приймаючи до уваги структурну подібність

бензидаміну із синтетичними агоністами СВ рецепторів – а саме наявність індазольного кільця по центру та двох замісників по обидва боки від нього – ароматичного кільця та аліфатичного ланцюгу що завершується полярною групою. Складна структура СВ-рецепторів, кристалографічні дані про які були отримані відносно нещодавно, можуть сприяти погіршенню точності розрахунків і вводити нові змінні, які в живому організмі можуть привести до значень, відмінних від розрахованих. Знаходження нових агоністів канабіноїдних рецепторів може відкрити шляхи для лікування різноманітних хвороб: починаючи від захворювань легень^[46] та нейропатичних болей^[47] закінчуючи депресивними розладами^[48].

Передбачена ефективність бензидаміну у зв'язуванні з вищепереліченими рецепторами має бути підтверджена більш детальними *in vitro* та *in vivo* дослідженнями, перед тим, як він зможе бути сертифікованим як лікарський засіб, однак той факт, що він вже був сертифікованим як місцевий протизапальний препарат можуть суттєво прискорити ці тести, а дані отримані у результаті цієї роботи дозволять суттєво звужити коло потенційних цілей та облегшити лабораторні дослідження, що особливо актуально в умовах надзвичайного стану пов'язаного із пандемією та напруженою безпековою ситуацією у світі.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Li, X., & Tang, X. (2021, September 21). Characterizing interdisciplinarity in drug research: A translational science perspective. *Journal of Informetrics*.
2. Araújo CRM, Anjos VLS, Guimarães DG, et al. The interdisciplinarity in drug discovery. *J Anal Pharm Res.* 2018;7(2):222-224. DOI: 10.15406/japlr.2018.07.00229
3. Frye, L., Bhat, S., Akinsanya, K., & Abel, R. (2021, August 30). From computer-aided drug discovery to computer-driven drug discovery. *Drug Discovery Today: Technologies*
4. Brogi, S., Ramalho, T. C., Kuca, K., Medina-Franco, J. L., & Valko, M. (1AD, January 1). Editorial: In silico methods for drug design and Discovery. *Frontiers*
5. Romano, J. D., & Tatonetti, N. P. (1AD, January 1). Informatics and computational methods in natural product drug discovery: A review and Perspectives. *Frontiers*.
6. Pushpakom, S., Iorio, F., Eyers, P. et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov* 18, 41–58 (2019).
7. Tupper KW, Wood E, Yensen R, Johnson MW. Psychedelic medicine: a re-emerging therapeutic paradigm. *CMAJ.* 2015;187(14):1054-1059. doi:10.1503/cmaj.141124
8. Palazzo, G., Corsi, G., Baiocchi, L., & Silvestrini, B. (1966). Synthesis and Pharmacological Properties of 1-Substituted 3-Dimethylaminoalkoxy-1Hindazoles. *Journal of Medicinal Chemistry*, 9(1), 38–41.
9. S;, L. Y. B. S. C. (n.d.). Recent advances in structure-based drug design targeting class A G protein-coupled receptors utilizing crystal structures and computational simulations. *Journal of medicinal chemistry*.

10. Plenge, P., Yang, D., Salomon, K. et al. The antidepressant drug vilazodone is an allosteric inhibitor of the serotonin transporter. *Nat Commun* 12, 5063 (2021).
11. Alashhab, Z. R., Anbar, M., Singh, M. M., Leau, Y.-B., Al-Sai, Z. A., & Alhayja'a, S. A. (2020, November 13). *Impact of coronavirus pandemic crisis on technologies and cloud computing applications*. *Journal of Electronic Science and Technology*
12. Baiocchi L, Corsi G, Palazzo G (1965). "Ricerche nel campo degli indazoli.— Nota 1. Sulla ciclizzazione termica di azidi di acidi N-aril-N-benzil-carbamidici". *Annali di Chimica*. 55: 116–25.
13. Catanese B, Grasso A, Silverstrini B. Studies on the absorption and elimination of benzydamine in the mouse, rat, dog, and man. *Arzneimittelforschung*. 1966 Oct;16(10):1354-7.
14. Simard-Savoie S, Forest D. Tropical anaesthetic activity of benzydamine. *Curr Ther Res Clin Exp* 1978; 23: 734-745.
15. Lisciani R, Barcellona PS, Silvestrini B. Researches on the topical activity of benzydamine. *Eur J Pharmacol* 1968; 3: 157-162.
16. Miller-Peddinghaus R. New pharmacological and biochemical results as to the mechanism of action of the nonsteroidal anti-inflammatory drug benzydamine, a synopsis. *Arzneim. - Forsch.* 1987; 37 (1): 635-645.
17. Fanaki NH, el-Nakeeb MA. Antimicrobial activity of benzydamine, a non-steroid anti-inflammatory agent. *J Chemother.* 1992 Dec;4(6):347-52.
18. Köppel C, Tenczer. Metabolism of benzydamine. *Arzneimittelforschung*. 1985;35:634-5.
19. Baldock GA, Brodie RR, Chasseaud LF, Taylor T, Walmsley LM, Catanese B. Pharmacokinetics of benzydamine after intravenous, oral, and topical doses to human subjects. *Biopharm Drug Dispos.* 1991;12:481-92.
20. Quane, P.A., Graham, G.G. & Ziegler, J.B. Pharmacology of benzydamine. *Inflammopharmacol* 6, 95–107 (1998).

- 21.. Silvestrini, B., Barcellona, P. S., Garau, A., & Catanese, B. (1967). Toxicology of benzydamine. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 10(1), 148–159.
22. Guru M, Safak Y, Kuru E, Orsel S. Psychotic disorder related to benzydamine hydrochloride abuse: a case report. *Bulletin of Clinical Psychopharmacology*. 2012;22(1):p. 51.
23. Doğan M, Yılmaz C, Çaksen H, Güven AS. A case of benzydamine HCL intoxication. *Eastern Journal of Medicine*. 2006;11(1-2):26–28.
24. Szymon Rostkowski. "Benzydamine Day, Benzydamine Night.: An Experience with Benzydamine (exp53407)". Erowid.org. Sep 3, 2017. erowid.org/exp/53407
25. Avvisati, R., Meringolo, M., Stendardo, E., Malavasi, E., Marinelli, S., & Badiani, A. (2017). Intravenous self-administration of benzydamine, a nonsteroidal anti-inflammatory drug with a central cannabinoidergic mechanism
26. Berger, Miles et al. "The expanded biology of serotonin." *Annual review of medicine* vol. 60 (2009): 355-66. doi:10.1146/annurev.med.60.042307.110802
27. Uberto Pagotto, Giovanni Marsicano, Daniela Cota, Beat Lutz, Renato Pasquali, The Emerging Role of the Endocannabinoid System in Endocrine Regulation and Energy Balance, *Endocrine Reviews*, Volume 27, Issue 1, 1 February 2006, Pages 73–100,
28. Yuan Cheng & Stephen A Hitchcock (2007) Targeting cannabinoid agonists for inflammatory and neuropathic pain, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 16:7, 951-965, DOI: 10.1517/13543784.16.7.951
29. Aung MM, Griffin G, Huffman JW, et al. Influence of the N-1 alkyl chain length of cannabimimetic indoles upon CB(1) and CB(2) receptor binding. *Drug Alcohol Depend.* 2000;60(2):133-140. doi:10.1016/s0376-8716(99)00152-0

30. Abrams P, Andersson KE, Buccafusco JJ, et al. Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. *Br J Pharmacol.* 2006;148(5):565-578. doi:10.1038/sj.bjp.0706780
31. Gatchell D. W., Vajda S., Camacho C. J., Comeau S. R. ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking. // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – no. 32. – pp. 96-99
32. Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, Halgren TA, Klicic JJ, Mainz DT, Repasky MP, Knoll EH, Shelley M, Perry JK, Shaw DE, Francis P, Shenkin PS (Mar 2004). "Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy". *Journal of Medicinal Chemistry.* 47 (7): 1739–49.
33. Murcko MA (Dec 1995). "Computational Methods to Predict Binding Free Energy in Ligand-Receptor Complexes". *Journal of Medicinal Chemistry.* 38 (26): 4953–67. doi:10.1021/jm00026a001. PMID 8544170.
34. "Prediction of binding constants of protein ligands: a fast method for the prioritization of hits obtained from de novo design or 3D database search programs". *Journal of Computer-Aided Molecular Design.* 12 (4): 309–23.
35. Lee, B; Richards, FM. (1971). "The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility". *J Mol Biol.* 55 (3): 379–400. doi:10.1016/0022-2836(71)90324-X. PMID 5551392.
36. Muegge I (October 2006). "PMF scoring revisited". *Journal of Medicinal Chemistry.* 49 (20): 5895–902. doi:10.1021/jm050038s. PMID 17004705.
37. Ballester PJ, Mitchell JB (May 2010). "A machine learning approach to predicting protein-ligand binding affinity with applications to molecular docking". *Bioinformatics.* 26 (9): 1169–75.
38. V. Zoete, M. A. Cuendet, A. Grosdidier, O. Michielin, SwissParam, a Fast Force Field Generation Tool For Small Organic Molecules, *J. Comput. Chem,* 2011, 32(11), 2359-68. PMID: 21541964, DOI: 10.1002/jcc.21816.

39. Jing Huang, Sarah Rauscher, Grzegorz Nawrocki, Ting Ran, Michael Feig, Bert L. de Groot, Helmut Grubmüller, Alexander D. MacKerell Jr.: *Nature Methods* (2016), 14, 71-73
40. Li X, Hua T, Vemuri K, et al. Crystal Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB2. *Cell*. 2019;176(3):459-467.e13. doi:10.1016/j.cell.2018.12.01
41. Hua T, Vemuri K, Pu M, et al. Crystal Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB1. *Cell*. 2016;167(3):750-762.e14. doi:10.1016/j.cell.2016.10.004
42. Penmatsa A, Wang KH, Gouaux E. X-ray structure of dopamine transporter elucidates antidepressant mechanism. *Nature*. 2013;503(7474):85-90. doi:10.1038/nature12533
43. Suno, R., Lee, S., Maeda, S. et al. Structural insights into the subtype-selective antagonist binding to the M2 muscarinic receptor. *Nat Chem Biol* 14, 1150–1158 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0152-y>
44. Singh Satendra (2010). "ChemInform Abstract: Chemistry, Design, and Structure-Activity Relationship of Cocaine Antagonists" (PDF). *ChemInform*. 31 (20): no. doi:10.1002/chin.200020238.. Page 928 (4th of article) 1st paragraph. Lines 8—11.
45. Schmeichel BE, Zemlan FP, Berridge CW. A selective dopamine reuptake inhibitor improves prefrontal cortex-dependent cognitive function: potential relevance to attention deficit hyperactivity disorder. *Neuropharmacology*. 2013;64(1):321-328. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.07.005
46. Weinberger, B., Hirsch, D., Yin, K., & Spur, B. W. (2015, March 20). Lipid mediators and lung function. *Comparative Biology of the Normal Lung* (Second Edition).
47. Lee G, Grovey B, Furnish T, Wallace M. Medical Cannabis for Neuropathic Pain. *Curr Pain Headache Rep*. 2018;22(1):8. Published 2018 Feb 1. doi:10.1007/s11916-018-0658-8

48. Li X, Diviant JP, Stith SS, et al. The Effectiveness of Cannabis Flower for Immediate Relief from Symptoms of Depression. *Yale J Biol Med.* 2020;93(2):251-264. Published 2020 Jun 29.