

УДК 004.942: 547.152.1`35: 616.633.96

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ N-ЗАМЕЩЕННОГО ПРОИЗВОДНОГО ИЗОХИНОЛОНА С КАТАЛИТИЧЕСКИМ ДОМЕНОМ ПРОТЕИНКИНАЗЫ С

© 2013 Глушко А. А.¹, Воронков А.В.¹, Кодониди И.П.¹, Бичеров А.В.², Черников М.В.¹

¹Пятигорский медико-фармацевтический институт-филиал ГБОУ ВПО Волг ГМУ Минздрава России, г. Пятигорск.

²Научно-исследовательский институт физической и органической химии Южного федерального университета г. Ростов-на-Дону.

Эндотелий, представляя собой паракринную железу, регулирует целый ряд жизненно важных функций организма. Нарушение его работы – эндотелиальная дисфункция - является ключевым звеном развития большинства сердечно-сосудистых заболеваний. Учитывая, что данная нозологическая группа патологий относится к наиболее социально-значимым заболеваниям, коррекция эндотелиальной дисфункции и поиск веществ, обладающих эндотелиопротекторной активностью, становится актуальной задачей не только фармакологии, но и смежных, взаимосвязанных с ней дисциплин, например медицинской химии. Значимым фактором в патогенезе развития эндотелиальной дисфункции является снижение активности фермента эндотелиальной NO-синтазы (eNOS). Одним из возможных механизмов снижения активности eNOS при патологии является её фосфорилирование протеинкиназой С (РКС). В связи с этим сайт связывания АТФ фермента РКС становится одним из перспективных объектов молекулярного докинга и может быть использован для поиска веществ, обладающих эндотелиопротекторной активностью. С использованием метода молекулярного докинга был осуществлен прогноз биологической активности для N-замещенного производного изохинолона. Полученные результаты дают возможность предположить наличие эндотелиопротекторной активности у данного соединения.

Ключевые слова: эндотелий, NO-синтаза, протеинкиназа С, молекулярный докинг, изохинолоны.

MOLECULAR DOCKING OF N-SUBSTITUTED DERIVATIVE OF ISOQUINOLONE WITH CATALYTIC DOMAIN OF PROTEIN KINASE C.

A.A. Gloushko, A.V. Voronkov, I.P. Kodonidi, A.B. Bicherov, M.B. Chernikov

**Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute-a branch of Volgograd State Medical
University, Pyatigorsk**

Endothelium, representing paracrine gland, regulates a whole range of vitally important functions of organism. The disorder of its work - endothelial dysfunction is a key link of development of cardio-vascular diseases. Considering that this group of pathology relates to the most social significant diseases, the correction of endothelial dysfunction and the search of substances with endothelial tread activity, become an actual task for not only the pharmacology but for adjacent interrelated disciplines such as medicinal chemistry. The significant factor in pathogenesis of endothelial dysfunction development is the reduction of activity of endothelial No-synthase enzyme. One of the possible mechanism of reduction of e NOS activity at the pathology is phosphorylation by protein kinase C(PKC). Due to this fact the site of connection of No synthase enzyme by protein kinase is one of perspective method of molecular docking and can be used for search of substances with endothelial-tread activity. The forecast of biological activity of N-substituted derivative of isoquinolone was done with using a molecular docking method. The obtained results give the opportunity to presume the presence of the endothelial-tread activity of this compound.

Key words: endothelium, NO-syntase, protein kinase C, molecular docking, isoquinolone.

Введение

Нарушение функции эндотелия является ключевым и основополагающим звеном в развитии многих сердечно-сосудистых осложнений, таких как ишемическая болезнь сердца, гипертоническая болезнь, атеросклероз и т.д. В связи с этим фармакологическая коррекция дисфункции эндотелия представляется, по своей сути, достаточно эффективной профилактикой такого рода осложнений, а поиск новых веществ с эндотелиопротекторным действием становится одной из перспективных задач медицинской химии [3,10].

Стоит отметить, что большинство методов эндотелиопротекторной терапии направлено на повышение активности NO-синтазы (eNOS), которая вырабатывает оксид азота (NO), являющийся ключевым метаболитом, участвующим во многих биохимических процессах (регуляции тонуса сосудов, процессов воспаления, реологических параметров крови и др.). Одним из возможных механизмов снижения активности eNOS при патологии является её фосфорилирование протеинкиназой С (РКС). Исходя из этого, сайт связывания АТФ фермента РКС, непосредственно участвующий в фосфорилировании, становится одним из перспективных объектов молекулярного докинга и может быть использован для поиска веществ, обладающих эндотелиопротекторной активностью [1,2,5].

На этапе поиска химических структур веществ с эндотелиопротекторным действием важной задачей является определение трехмерной структуры белковой молекулы – мишени, роль которой в данном исследовании выполняет фермент протеинкиназа С. Пространственная структура данного фермента хорошо изучена. Каталитический участок протеинкиназы С содержит участок, ответственный за связывание молекулы АТФ (домен С3) [4] - одного из субстратов фермента. Конкурентное ингибирование связывания АТФ с данным участком может быть использовано для снижения активности РКС, а данные о трехмерной структуре домена С3 представляют интерес в качестве информации, необходимой для осуществления молекулярного докинга в процессе поиска потенциальных эндотелиопротекторных средств.

Материалы и методы

С использованием метода молекулярного докинга был произведен прогноз биологической активности для N-замещенного производного изохинолона, структура которого приведена на рисунке 1.

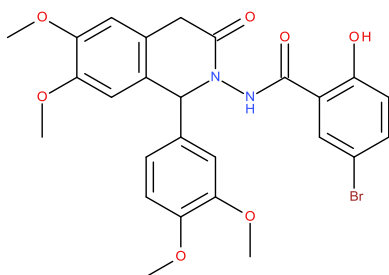


Рисунок 1 – Структура исследуемого производного изохинолона

В качестве мишени для молекулярного докинга была выбрана модель молекулы протеинкиназы-С-η [8] человеческого типа, полученная методом рентгеноструктурного анализа (рис. 2).

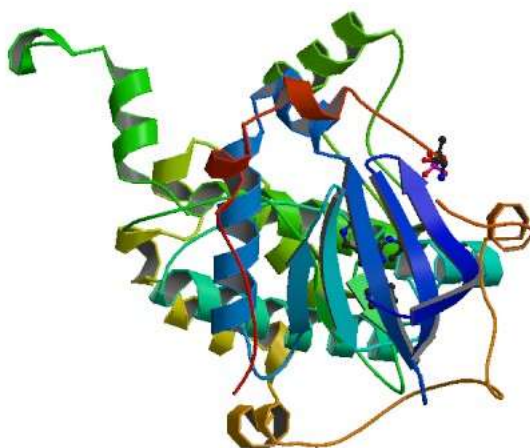


Рисунок 2 – Трехмерная структура протеинкиназы C-η

Молекулярный докинг осуществлялся в области сайта связывания АТФ в субъединице С3. К молекуле рецептора в соответствии с валентностями были добавлены атомы водорода только для полярных атомов. Частичные заряды на атомах были вычислены методом Гастейгера.

Трехмерная модель молекулы лиганда была построена с помощью программы HyperChem 8.0. Оптимизация геометрии и вычисление частичных зарядов атомов осуществлялись с использованием полуэмпирического силового поля RM1 [7].

С использованием набора программ Autodock [6] (*The Scripps Research Institute, США*), MGLTools (*The Scripps Research Institute, США*), AutodockMaster (Пятигорский медико-фармацевтический институт, Россия), AD4Intermol (Пятигорский медико-фармацевтический институт, Россия) был осуществлен гибкий молекулярный докинг веществ обучающей и тестовой выборок, в которые вошли производные нафтиридина [9]. Для вычислений использовался кластер из 19 вычислительных машин, содержащих в сумме 40 вычислительных ядер. Для управления процессом распределенных вычислений использована программа AutodockMaster. Для каждого вещества было получено по 100 конформаций лиганд-рецепторного комплекса и вычислены скоринговые функции с использованием программы AD4Intermol.

Для вычисления прогнозируемой величины IC_{50} использовалась скоринговая функция (F) в виде произведения модулей энергии взаимодействия лиганда с аминокислотами активного центра (E). При этом для расчета скоринговой функции применялись сочетания аминокислот, отвечающие наибольшему коэффициенту аппроксимации из всех возможных сочетаний аминокислот сайта связывания [9].

Скоринговая функция для протеинкиназы C-η:

$$F = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (|E_{i,Lys\ 384}| \cdot |E_{i,Asp\ 483}| \cdot |E_{i,Leu\ 486}| \cdot |E_{i,Val\ 436}|) \quad (1)$$

$$IC_{50} = 0,0256F^{-0,725} \quad (2)$$

Результаты и их обсуждение

В результате проведения молекулярного докинга было получено 100 конформаций лиганд-рецепторного комплекса. Расположение молекулы исследуемого производного изохинолона в активном центре РКС показано на рисунке 3.

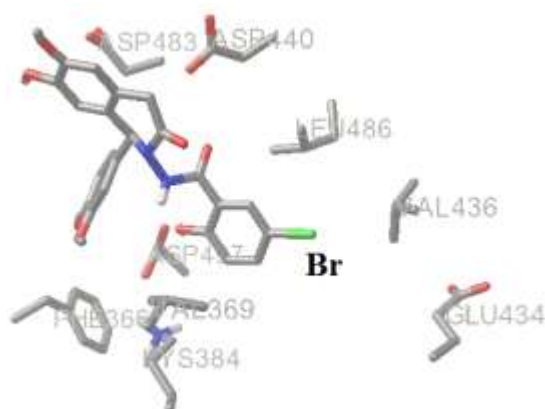
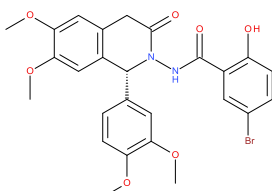
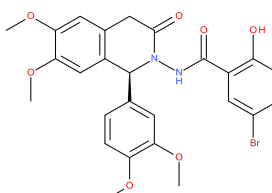


Рисунок 3 – Расположение исследуемого производного изохинолона в сайте связывания АТФ РКС

Результаты проведенного докинга показывают важность атома брома в ароматическом фрагменте молекулы лиганда для взаимодействия с гидрофобными аминокислотами Leu-486 и Val-436. Энергии связывания с данными аминокислотами были использованы для вычисления прогнозируемых величин IC_{50} (формулы 1 и 2).

Результаты прогнозирования величины IC_{50} приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Результаты прогнозирования величины IC_{50} для двух стереоизомеров соединения лидера

Формула	Прогноз IC_{50} , нМ
	120,9
	67,2

Результаты анализа связывания двух стереоизомеров исследуемого вещества с активным центром РКС позволяют предположить наличие эндотелиопротекторной активности у данного соединения.

Выводы

Результаты проведенного молекулярного докинга N-замещенного производного изохинолона свидетельствуют о наличии высокого сродства к сайту связывания АТФ РКС для данного вещества (прогнозируемое значение $IC_{50} < 100$ нМ).

Для подтверждения полученных результатов требуется проведение комплекса фармакологических исследований для новых N-замещенных производных изохинолона.

Литература

1. Fleming I., Busse R. Signal transduction of eNOS activation // Cardiovasc. Res. 1999. V. 43. P. 532 - 541.

2. Freeley M., Kelleher D., Long A. Regulation of protein kinase C function by phosphorylation on conserved and non-conserved sites // *Cell Signal*. 2011. V. 23. P. 753 - 762.
3. Pathogenetic role of eNOS uncoupling in cardiopulmonary disorders. Gielis J.F. et al. // *Free Radical Biol. Med*. 2011. V. 50. P. 765 - 776.
4. Kheifets V., Mochly-Rosen D. Insight into intra- and inter-molecular interactions of PKC: Design of specific modulators of kinase function // *Pharm. Res*. 2007. V. 55. P. 467 - 476.
5. Kolluru G.K., Siamwala J.H., Chatterjee S. eNOS phosphorylation in health and disease // *Biochimie*. 2010. V. 92. P. 1186 - 1198.
6. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and Empirical Binding Free Energy Function. Morris G. M. et al. // *J. Computational Chemistry*. 1998. N. 19. P. 1639 - 1662.
7. RM1: a Reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I. Rocha G.B. et al. // *Journal of Computational Chemistry*. 2006. V. 27. P. 1101 - 1111.
8. 2,6-Naphthyridines as potent and selective inhibitors of the novel protein kinase C isozymes. Van Eis M.J. et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2011. V. 21. P. 7367 - 7372.
9. Воронков А.В., Глушко А.А. Новая математическая модель для прогнозирования эндотелиопротекторной активности веществ на основе молекулярного докинга // *Вопр. биол., мед.и фарм. хим*. 2013. Т. 3. С. 42 - 47.
10. Эндотелиопротекторы – новый класс фармакологических препаратов. Тюренков И.Н. и соавт. Под ред. Дедова И.И. // *Вестн. Рос.акад. мед. наук*. 2013. Т. 7. С. 50 - 58.

Глушко Александр Алексеевич – кандидат фармацевтических наук, преподаватель кафедры физической и коллоидной химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: компьютерная химия, разработка программного обеспечения для молекулярного моделирования, молекулярный докинг, молекулярная динамика, QSAR. E-mail: saha-omega@yandex.ru

Воронков Андрей Владиславович – доктор медицинских наук, заведующий кафедрой фармакологии и патологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: изучение фармакологических свойств веществ с эндотелиопротекторной активностью. E-mail: prohor.77@mail.ru.

Кодониди Иван Панайотович – доктор фармацевтических наук, доцент кафедры органической химии Пятигорский медико-фармацевтический институт-филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: молекулярное конструирование производных 1,3-диазинона-4. E-mail: kodonidiip@mail.ru.

Бичеров Александр Викторович, кандидат химических наук, старший научный сотрудник, Научно-исследовательский институт физической и органической химии Южного федерального университета г. Ростов-на-Дону. Область научных интересов: синтез азотосодержащих гетероциклических систем. E-mail: avbichеров@yandex.ru.

Черников Максим Валентинович, доктор медицинских наук, доцент, Пятигорский медико-фармацевтический институт-филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: изучение рецепторного взаимодействия и связи структура-активность. E-mail: pharmax@list.ru.