

ПРОИЗВОДНЫЕ ХРОМОН-3-АЛЬДЕГИДА – ИНГИБИТОРЫ СИРТУИНА 2 В КОРРЕКЦИИ МЫШЕЧНОЙ ДИСФУНКЦИИ. *IN SILICO* И *IN VIVO* ИССЛЕДОВАНИЕ

В.М. Руковицина

аспирант, кафедра органической химии,
Пятигорский медико-фармацевтический институт –
филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» МЗ РФ

Э.Т. Оганесян

д.фарм. н., профессор, зав. кафедрой органической химии,
Пятигорский медико-фармацевтический институт –
филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» МЗ РФ

Д.И. Поздняков

к.фарм.н., ст. преподаватель, кафедра фармакологии с курсом клинической фармакологии,
Пятигорский медико-фармацевтический институт –
филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» МЗ РФ
E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru

А.В. Воронков

д.м.н., доцент, зав. кафедрой фармакологии с курсом клинической фармакологии,
Пятигорский медико-фармацевтический институт –
филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» МЗ РФ

О.Ф. Веселова

к.м.н., доцент, зав. кафедрой фармакологии и фармацевтического консультирования с курсом ПО,
Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Е.А. Олохова

ассистент, кафедра фармакологии и фармацевтического консультирования с курсом ПО,
Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

А.С. Чиряпкин

студент, Пятигорский медико-фармацевтический институт –
филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» МЗ РФ

Проведено исследование, посвященное оценке способности производных хромон-3-альдегида ингибировать функцию сиртуина 2 в условиях мышечной дисфункции. Использован комплексный подход с применением *in silico* и *in vivo* методов исследования. Установлено, что, согласно PASS прогнозу, изучаемые объекты потенциально могут быть использованы для терапии мышечной дисфункции, в то же время данные молекулярного докинга показали способность исследуемых веществ ингибировать функцию сиртуина 2. Полученные результаты при *in silico* моделировании были подтверждены в исследовании *in vivo*: в условиях мышечной дисфункции применение изучаемых объектов способствовало снижению активности сиртуина 2. При этом по результатам как *in silico*, так и *in vivo* тестов соединением-лидером в ряду исследуемых веществ является ацилзамещенное производное хромон-3-альдегида.

Ключевые слова: молекулярный докинг, мышечная дисфункция, сиртуины, производные хромона.

Для цитирования: Руковицина В.М., Оганесян Э.Т., Поздняков Д.И., Воронков А.В., Веселова О.Ф., Олохова Е.А., Чиряпкин А.С. Производные хромон-3-альдегида - ингибиторы сиртуина 2 в коррекции мышечной дисфункции. *In silico* и *in vivo* исследование. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2019;22(2):43-48. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-02-07>

Мышечная дисфункция является общим неспецифическим синдромом, который связан со многими патологическими состояниями [1]. Установлена прямая связь между развитием мышечной усталости и функциональными расстройствами сердечно-сосудистой (дилатационная кардиомиопатия, застойная сердечная недостаточность, различные формы нарушения проводимости) [2],

нейроэндокринной, выделительной и респираторной систем [3]. Кроме того, значительное ограничение физической активности способствует развитию ментального дефицита, тревоги, депрессии, что, в свою очередь, ведет к социальной дезадаптации пациентов, испытывающих мышечное утомление [4]. На сегодняшний день лечение мышечной дисфункции представляет собой одну из

актуальных проблем современного здравоохранения, поскольку комплексный характер патогенеза данного заболевания диктует необходимость комбинированного применения лекарственных препаратов [5], что значительно усиливает лекарственную нагрузку на пациента. Таким образом, целесообразным представляется поиск новых фармакотерапевтических «мишеней», а также фармакологически активных субстанций, способных восстановить активность скелетной мускулатуры в условиях мышечной дисфункции. Одной из таких потенциальных «точек приложения действия» вновь разрабатываемых лекарственных средств может являться сиртуин 2 (SIRT2). Известно, что SIRT2 участвует в регуляции клеточной пролиферации посредством деацетилирования ряда эффекторных белков, а ингибирование данного ферментативного комплекса может способствовать интенсификации синтеза *de novo* белков мышечной ткани, что, в свою очередь, предполагает потенциальный миопротективный эффект у соединений – ингибиторов SIRT2 [6].

Цель исследования – прогноз *in silico* фармакологической активности новых производных хромон-3-альдегида и проведение первичного скрининга SIRT2 – ингибирующей активности изучаемых объектов в условиях мышечной дисфункции.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

In silico анализ фармакологической активности виртуальных соединений, генерированных на основе логико-структурного подхода, осуществляли с применением программного комплекса PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances), позволяющего определить вероятность проявления различных фармакологических эффектов прогнозируемыми веществами. Полученные результаты оформлены в виде перечня биологической активности с расчётными значениями вероятности проявления (Pa) каждого конструированного вещества.

Для осуществления виртуального поиска наиболее перспективных биологически активных соединений и исследования их взаимодействия с белковой мишенью применяют современные методы компьютерного молекулярного моделирования, одним из которых является молекулярный докинг. В ходе молекулярного докинга представляется возможным установить наиболее энергетически выгодное расположение исследуемой молекулы в выбранной области моделирования. По по-

лученной энергии образования наиболее устойчивого молекулярного комплекса можно судить о сорте низкомолекулярного соединения к активному центру белковой мишени [7]. Для изучения взаимодействия исследуемых соединений с активным центром фермента SIRT2 использовали пространственную структуру комплекса белок-лиганд с идентификационным кодом 5Y5N.

В качестве лиганда в данном комплексе выступает молекула 2-[[3-(2-фенилэтокси)фенил]амино]бенза-мид, которая реализует ингибирующий эффект на фермент. Данный белок-лигандный комплекс представлен в базе данных RCSB ProteinDataBank (rcsb.org). RCSB ProteinDataBank (RCSB PDB) [8].

Пространственные структуры всех исследуемых веществ были построены в программе HyperChem 6.09. В этой же программе проводили оптимизацию геометрии методом молекулярной механики MM+ [9]. Далее осуществляли исследование взаимодействия производных хромон-3-альдегида с активным центром фермента SIRT2 методом молекулярного докинга. Молекулярный докинг проводили с помощью программы MolegroVirtual Docker 6.0.1, которая работает на одном из самых точных алгоритмов молекулярных вычислений – MolDockScore [10].

Блок фармакологических испытаний выполняли на 100 мышах-самцах линии Balb/c, разделенных на 10 равных групп ($n=10$). Первая группа мышей – животные положительного контроля (ПК). Степень ингибирующего действия изучаемых объектов на функцию SIRT2 оценивали в условиях мышечной дисфункции, воспроизведенной электромиостимуляционным методом [11]. Исследуемые соединения вводили *per os*, профилактически на протяжении семи дней в дозах: соединение 1 – 30 мг/кг, соединение 2 – 39 мг/кг, соединение 3 – 29 мг/кг, соединение 4 – 30 мг/кг, соединение 5 – 35 мг/кг, соединение 6 – 29 мг/кг, соединение 7 – 30 мг/кг, соединение 8 – 40,1 мг/кг, что составляло 1/100 от значения LD₅₀ для данных веществ [12]. Группа мышей негативного контроля (НК) не получала фармакологическую поддержку. Впоследствии осуществляли эвтаназию животных с забором биологического материала (m. biceps brachii) и определение активности SIRT2 методом твердофазного ИФА с использованием видоспецифичных наборов реактивов *Cloud clone*. Пробоподготовка и ход анализа соответствовали инструкции, прилагаемой к набору.

Статистическую обработку полученных результатов выполняли с применением программного пакета «STATISTICA 6.0», в качестве критерия статистической достоверности межгрупповых отличий использовали критерий Ньюмена–Кейсла при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Прогноз фармакологической активности производных хромон-3-альдегида показал наличие потенциальной возможности использования данных соединений для терапии мышечной дисфунк-

ции (табл. 1). На основании этого осуществлено дальнейшее компьютерное моделирование взаимодействия исследуемых объектов с SIRT2.

По результатам молекулярного докинга в программе MolegroVirtual Docker 6.0.1 установлены наиболее энергетически выгодные расположения производных хромон-3-альдегида в активном центре фермента SIRT2. Результаты приведены в табл. 2. Полученные данные свидетельствуют о том, что наибольшим сродством к активному SIRT2 обладают соединения с лабораторными шифрами 2, 4, 5, 7 и 8. Соединением-лидером является вещество 8.

Таблица 1. Прогноз биологической активности производных хромон-3-альдегида (P_a , %)

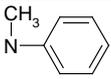
Соединение		Вид активности				
Лабораторный шифр	Заместитель, R	Противо-диабетическая	Анти-ишемическая	Противо-воспалительная	Лечение мышечной дисфункции	Противо-опухолевая
1	Cl, O	92,7	65,5	81,7	81,7	92,7
2	 , O	84,3	61,4	76,4	76,4	84,3
3	F, O	89,0	58,3	73,1	73,1	89,0
4	F, N-OH	54,5	–	66,7	66,7	69,4
5	Cl, N-OH	78,3	63,0	73,5	73,5	78,3
6	NO ₂ , CH ₃ , O	87,8	57,1	56,5	35,5	87,8
7	NO ₂ , CH ₃ , N-OH	58,9	58,5	50,2	58,5	77,6
8	OCOCH ₃ , O	88,7	63,1	74,6	74,6	88,7

Таблица 2. Энергия взаимодействия лигандов с активным центром фермента SIRT2

Лабораторный шифр	Энергия образования комплекса с SIRT2, ккал/моль
1	-107,198
2	-121,693
3	-108,19
4	-115,885
5	-114,19
6	-104,827
7	-115,97
8	-129,718

Ранее было установлено, что ингибиторы наиболее часто вступают во взаимодействие со следующими аминокислотами активного центра фермента SIRT2: Phe 119, Phe 131, Leu 134, leu 138, Tyr 139, Pro 140, Phe 143, ile 169, His 187, Phe 190, Val 233 и Phe 235. Также в механизме связывания лигандов участвует три молекулы воды. Причем из них две молекулы воды, предварительно связавшись с лигандом, образуют водородные связи с аминокислотами His 187 и Val 233. Эти аминокислоты активного центра фермента SIRT2 стабилизируют взаимодействие субстрата во время реакции деацетилирования. Таким образом, образование водородных связей с аминокислотами His 187 и Val 233 приводит к нарушению процесса стабилизации субстрата во время ферментативной

реакции деацетилирования, что обуславливает ингибирующий эффект на активность SIRT2 [13].

На рис. 1 приведено расположение соединения лидера (8) по силе взаимодействия с аминокислотным окружением активного центра SIRT2. На рис. 1 видно, что молекула занимает правильное расположение в сайте связывания лигандов SIRT2, так как вокруг неё находятся наиболее важные аминокислоты активного центра фермента. Далее, основываясь на результатах молекулярного докинга, был проведен фармакологический скрининг в ряду исследуемых соединений на предмет способности изучаемых объектов ингибировать функцию SIRT2 *in vivo*.

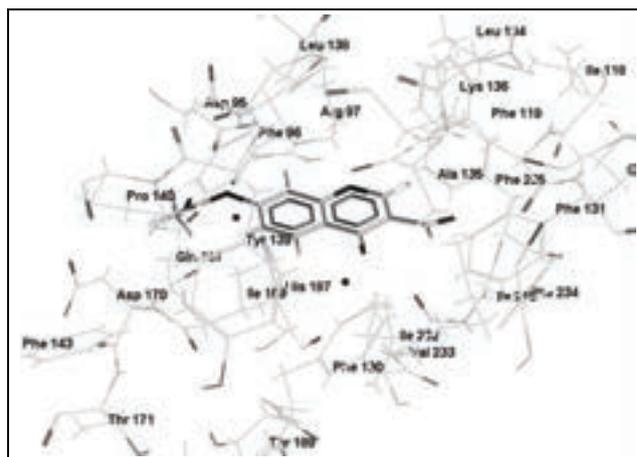


Рис. 1. Расположение соединения лидера в активном центре SIRT2

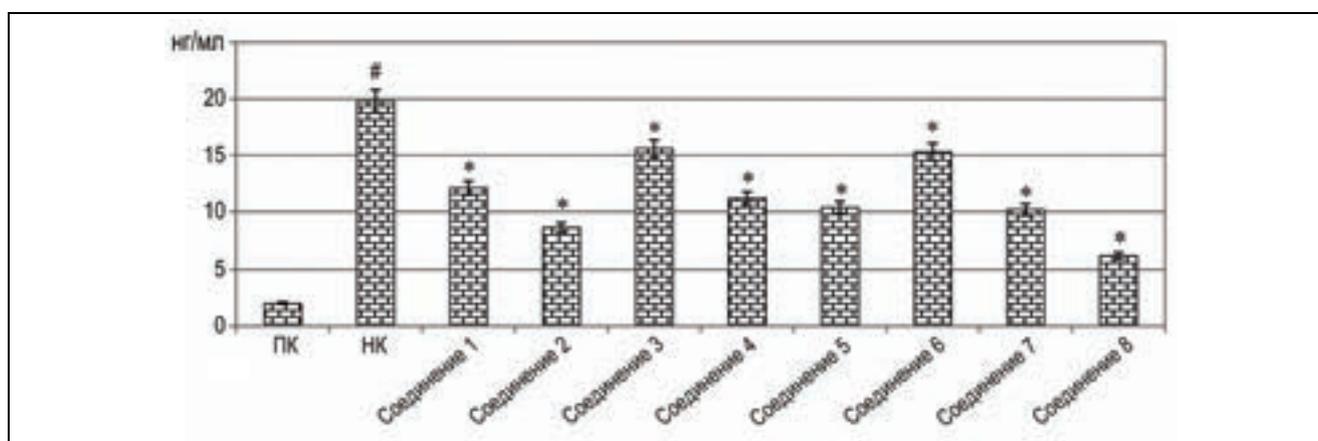


Рис. 2. Влияние новых производных хромон-3-альдегида на изменение активности SIRT2 в условиях мышечной дисфункции: # - статистически значимо относительно ПК группы животных ($p < 0,05$); * - статистически значимо относительно НК группы животных ($p < 0,05$)

Оценивая изменение активности SIRT2 (рис. 2) в условиях мышечной дисфункции, мы установили повышение активности данного фермента у животных НК группы относительно ПК группы мышей в 9,8 раза ($p < 0,05$), что может свидетельствовать о значимой роли SIRT2 в патогенезе мышечной дисфункции и согласуется с литературными данными [14].

Применение исследуемых объектов способствовало снижению активности SIRT2. Так, при применении соединений 1–8 активность данного ферментативного комплекса уменьшилась по отношению к НК группе мышей на 63,6% ($p < 0,05$); 130,2% ($p < 0,05$); 26,9% ($p < 0,05$); 76,8% ($p < 0,05$); 90,4% ($p < 0,05$); 29,4% ($p < 0,05$); 94,1% ($p < 0,05$) и 218,8% ($p < 0,05$) соответственно.

При этом наиболее выраженные SIRT2-ингибирующие свойства проявляло соединение 8, на фоне применения которого активность SIRT2 была

ниже таковой у групп мышей, получавших исследуемые объекты 1–7: на 94,8% ($p < 0,05$); 38,5% ($p < 0,05$); 151,2% ($p < 0,05$); 80,3% ($p < 0,05$); 67,5% ($p < 0,05$); 146,4% ($p < 0,05$); 64,3% ($p < 0,05$) соответственно.

Таким образом, результаты скринингового фармакологического исследования подтверждают ранее выполненный *in silico* прогноз активности производных хромон-3-альдегида и результаты молекулярного докинга.

На основании проведенного исследования можно предположить перспективность дальнейшего изучения производных хромон-3-альдегида в качестве миопротекторных средств для коррекции мышечной дисфункции, имеющих в качестве возможной фармакотерапевтической мишени SIRT2. При этом соединением, обладающим наибольшим фармакологическим эффектом, является ацилзамещенное производное хромон-3-альдегида.

ВЫВОДЫ

1. PASS прогноз фармакологической активности показал возможность применения новых производных хромон-3-альдегида для коррекции мышечной дисфункции.
2. Молекулярное моделирование взаимодействия производных хромон-3-альдегида позволило установить SIRT2-ингибирующую активность исследуемых соединений. При этом энергия связывания соединения-лидера с SIRT2 составляла 129,718 ккал/моль.
3. По результатам первичного фармакологического скрининга установлена способность изучаемых объектов ингибировать активность SIRT 2 *in vivo*. При этом соединением-лидером является ацилзамещенное производное хромон-3-альдегида, применение которого способствовало уменьшению активности SIRT2 на 218,8% ($p < 0,05$) относительно животных без фармакологической поддержки.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. *Maté-Muñoz J.L., Lougedo J.H., Barba M., et al.* Muscular fatigue in response to different modalities of CrossFit sessions // *PLoS One*. 2017;12(7):e0181855. doi:10.1371/journal.pone.0181855.
2. *Groh W.J.* Arrhythmias in the muscular dystrophies // *Heart Rhythm*. 2012; 9:1890–1895. doi:10.1016/j.hrthm.2012.06.038.
3. *Bann C.M., Abresch R.T., Biesecker B., et al.* Measuring quality of life in muscular dystrophy // *Neurology*. 2015;84(10):1034–1042.
4. *Sabharwal R.* The link between stress disorders and autonomic dysfunction in muscular dystrophy // *Frontiers in physiology*. 2014; 5:25.
5. *Shin J., Tajrishi M.M., Ogura Y., Kumar A.* Wasting mechanisms in muscular dystrophy // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2013;45(10):2266–2279.
6. *Arteaga M., Shang N., Ding X., et al.* Inhibition of SIRT2 suppresses hepatic fibrosis // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2016;310(11):G1155–G1168.
7. *Глушко А.А., Воронков А.В., Кодониди И.П., Бичеров А.В., Черников М.В.* Молекулярный докинг N-замещенного производного изохинолона каталитическим доменом С // *Фармация и фармакология*. 2014; 1(2):3–7. DOI: [http://dx.doi.org/10.19163/2307-9266-2014-2-1\(2\)-3-7](http://dx.doi.org/10.19163/2307-9266-2014-2-1(2)-3-7) (Glushko A.A., Voronkov A.V., Kodonidi I.P., Bicherov A.V., Chernikov M.V. Molekulyarnyj doking N-zameshchennogo proizvodnogo izohinolonas kataliticheskim domenom C // *Farmaciya i farmakologiya*. 2014; 1(2):3–7. DOI: [http://dx.doi.org/10.19163/2307-9266-2014-2-1\(2\)-3-7](http://dx.doi.org/10.19163/2307-9266-2014-2-1(2)-3-7)).
8. *Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E.* The Protein Data Bank // *Nucleic Acids Res*. 2000; 28(1):235–242.
9. *Teppen B.J.* HyperChem, release 2: molecular modeling for the personal computer // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 1992; 32:757–759.
10. *Thomsen R., Christensen M.H.* MolDock: A new technique for high-accuracy molecular docking // *Journal of Medicinal Chemistry*. 2006; 49:3315–3321. doi:10.1021/jm051197e.
11. *Gregory N.S., Gibson-Corley K., Frey-Law L., et al.* Fatigue-enhanced hyperalgesia in response to muscle insult: induction and development occur in a sex-dependent manner // *Pain*. 2013;154(12):2668–2676. doi:10.1016/j.pain.2013.07.047.
12. *Воронков А.В., Поздняков Д.И., Рукловицина В.М., Оганесян Э.Т.* Антиоксидантная активность новых производных хромон-3-альдегида в условиях мышечной дисфункции // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2018; 21 (6):38–42 (Voronkov A.V., Pozdnyakov D.I., Rukovicina V.M., Oganesyana E.H.T. Antioksidantnaya aktivnost' novykh proizvodnyh hromon-3-al'degida v usloviyah myshechnoj disfunkcii // *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii*. 2018; 21 (6):38–42).
13. *Mellini P., Itoh Y., Tsumoto H., Li Y., Suzuki M., Tokuda M., Kakizawa T., Miura Y., Takeuchi J., Lahtela-Kakkonen M., Suzuki T.* Potent mechanism-based sirtuin-2-selective inhibition by an in situ-generated occupant of the substrate-binding site, “selectivity pocket” and NAD⁺-binding site // *Chem. Sci*. 2017; 8:6400–6408. doi: 10.1039/C7SC02738A.
14. *Zhang L., Hou X., Ma R., Moley K., Schedl T., Wang Q.* Sirt2 functions in spindle organization and chromosome alignment in mouse oocyte meiosis // *FASEB J*. 2014;28(3):1435–1445.

Поступила 31 октября 2018 г.

CHROMONE-3-ALDEHYDE DERIVATIVES - SIRTUIN - 2 INHIBITORS IN THE CORRECTION OF MUSCULAR DYSFUNCTION. *IN SILICO* & *IN VIVO* STUDY

© Authors, 2019

V.M. Rukovitsyna

Post-graduate Student, Department of Organic Chemistry, Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute – branch of the FSEI HE «Volgograd State Medical University»

E.T. Oganesyana

Professor, Dr.Sc. (Pharm.), Head of the Department of Organic Chemistry, Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute – branch of the FSEI HE «Volgograd State Medical University»

D.I. Pozdnyakov

Ph.D. (Med.), Senior Lecturer, Department of Pharmacology, Course of Clinical Pharmacology, Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute – branch of the FSEI HE «Volgograd State Medical University»
E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru

A.V. Voronkov

Dr.Sc. (Med.), Associate Professor, Head of the Department of Pharmacology with the Course of Clinical Pharmacology, Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute – branch of the FSEI HE «Volgograd State Medical University»

O.F. Veselova

Ph.D. (Med.), Associate Professor, Head of the Department of Pharmacology and Pharmaceutical Consulting, Professor V.F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University of Ministry of Health of the Russian Federation

E.A. Olokhova

Assistant, Department of Pharmacology and Pharmaceutical Consulting, Professor V.F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University of Ministry of Health of the Russian Federation

A.S. Cherapkin

Student, Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute – branch of the FSEI HE «Volgograd State Medical University»

Aim of the study. Evaluate the ability of derived chromone-3-aldehyde to inhibit the function of sirtuin 2 in conditions of muscle dysfunction.

Materials and methods. In this work uses an integrated approach by *in silico* and *in vivo* tests. *In silico* prognosis of pharmacological activity (possibility of correction of muscle dysfunction) of new derivatives of chromone-3-aldehyde was carried out using the PASS program. The probabilistic evaluation of the interaction of the studied substances with sirtuin 2 was performed by molecular docking. *In vivo* study was performed on male Wistar rats, who were modeled muscle dysfunction by electromyostimulation method. The test-objects were administrated *per os*, prophylactically for 7 days. After that, biological material (muscle tissue) was taken, in which the level of sirtuin 2 was determined by the ELISA method.

Result. As a result, *in silico* studies found that in a number of studied objects the most pronounced sirtuin 2 inhibitory properties has acyl-substituted derivative of chromone-3-aldehyde, the energy of interaction of the substance with the target molecule was -129,718 kcal/mol. The molecular modeling data were confirmed by the results of *in vivo* study in which the course application of the acyl-substituted chromone-3-aldehyde derivative reduced the activity of sirtuin 2 by 218.8% ($p < 0.05$) in comparison with untreated animals.

Conclusion. The results of both *in silico* and *in vivo* tests suggest that the leading compound in a number of studied substances is acyl-substituted derivative of chromone-3-aldehyde, showing the most pronounced sirtuin 2 inhibitory properties.

Key words: *molecular docking, muscle dysfunction, sirtuins, chromone derivatives.*

For citation: Rukovitsyna V.M., Oganesyanyan E.T., Pozdnyakov D.I., Voronkov A.V., Veselova O.F., Olokhova E.A., Cherapkin A.S. Chromone-3-aldehyde derivatives - sirtuin - 2 inhibitors in the correction of muscular dysfunction. *In silico* & *in vivo* study. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2019;22(2):43–48. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-02-07>

Читайте в следующих номерах

Н.А. Поляков, В.А. Дубинская

**МИГРАЦИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В СИСТЕМЕ
«БИОЛОГИЧЕСКИЙ ОБРАЗЕЦ – КОНСЕРВИРУЮЩИЙ РАСТВОР»**