

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. І. МЕЧНИКОВА

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

АКІШЕВА АЛІНА СЕРГІЇВНА

УДК 547.972.3:577.322.21:004.942:615.213:615.211

ДИСЕРТАЦІЯ

***IN SILICO* АНАЛІЗ МЕХАНІЗМІВ РЕАЛІЗАЦІЇ АНАЛЬГЕТИЧНОГО
ТА ПРОТИЗАПАЛЬНОГО ЕФЕКТІВ АЛКОКСИПОХІДНИХ 1,4-
БЕНЗОДІАЗЕПІНУ**

091 Біологія

09 Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії.
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело



_____ А. С. Акішева
(підпис)

Наукові керівники: Макаренко Ольга Анатоліївна, д.б.н., с.н.с., зав. каф.
фізіології, здоров'я і безпеки людини та природничої освіти
ОНУ імені І. І. Мечникова

Ларіонов Віталій Борисович, д.б.н. завідувач лабораторії молекулярної
фармакології та медицини відділу біомедицини
Фізико-хімічного інституту ім. О.В. Богатського НАН України

Одеса-2025

АНОТАЦІЯ

Акішева А.С. In silico аналіз механізмів реалізації анальгетичного та протизапального ефектів алкоксіпохідних 1,4-бензодіазепіну.

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 091 Біологія – Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, Одеса, 2025.

Дисертаційна робота присвячена визначенню механізмів анальгетичного та протизапального ефектів алкоксіпохідних 1,4-бензодіазепіну методами молекулярного докінгу та молекулярної динаміки *in silico*.

Для реалізації мети і виконання завдань роботи було проведено *in vitro* дослідження визначення протизапальної активності пропоксазепаму (новітнього перспективного інноваційного анальгетичного препарату ряду алкоксіпохідних 1,4-бензодіазепіну) та ряду дослідів *in silico*, спрямованих на ідентифікацію механізмів взаємодій пропоксазепаму та деяких похідних 1,4-бензодіазепіну з білковими мішенями, що задіяні в процесах запалення та болю. Дослідження відбувались у два етапи.

Перший етап роботи був спрямований на дослідження протизапальної активності пропоксазепаму та похідних 1,4-бензодіазепіну *in vitro* шляхом аналізу їхнього захисного впливу на стабільність бичачого сироваткового альбуміну за умов термічної денатурації. Додатково провели ідентифікацію особливостей взаємодії досліджуваних лігандів з людським сироватковим альбуміном із застосуванням програмного пакета iGEMDOCK v2.1, використовуючи структурні дані білків, отримані з бази біологічних макромолекул. За визначенням IC_{50} для досліджуваних сполук констатували, що похідні 1,4-бензодіазепіну проявляють протективний ефект проти термічної денатурації БСА, при цьому діазепам і пропоксазепам за IC_{50} перевершують референтний протизапальний препарат ібупрофен майже

вдвічі, хоча поступаються йому за максимальним ефектом. Сполуки з вільною гідроксигрупою в положенні 3 (оксазепам та 3-гідроксипропосазапам) демонструють меншу активність, що може бути пов'язано з їхньою здатністю зв'язуватися з БСА. Отримані результати дозволяють висловити припущення: похідні 1,4-бензодіазепіну здатні запобігати термічній денатурації БСА, що може бути пов'язано з їхньою взаємодією зі специфічними сайтами зв'язування. Тому далі було проведено докінг-аналіз пропосазапаму з людським сироватковим альбуміном (ЛСА), що дозволило глибше зрозуміти механізми його дії та доповнити результати *in vitro* дослідження протизапальних властивостей похідних 1,4-бензодіазепіну. За результатами докінг аналізу можна стверджувати, що енергія зв'язування з діазепановим сайтом ЛСА для пропосазапаму є найвищою серед досліджуваних сполук. Ці результати підтверджують участь сироваткового альбуміну в реалізації протизапальної дії пропосазапаму.

Другим етапом дослідження став аналіз взаємодії (*in silico* аналіз) пропосазапаму з рецепторами, які залучені в периферичній та центральній анальгетичній дії. Досліджуваними білками стали рецептор брадикініну, циклооксигеназа-1, циклооксигеназа -2, потенціалзалежні калієві канали (Kv), рецептор N-метил-D-аспартату (NMDA рецептор), альфа адренорецептор, фосфодіестераза 4 (PDE4), ванілоїдний рецептор підроддини потенціалзалежних транзиторних рецепторів типу 1 (TRPV1) та канабіноїдний рецептор (CB1). Для проведення *in silico* аналізу застосовувалося програмне забезпечення з відкритим доступом, а також пробні версії комерційних програм, зокрема iGEMDOCK v2.1, AutoDock, AutoDock Vina, Schrödinger Maestro Glide і PlayMolecule. Структурні дані білків були отримані з відкритої бази RCSB PDB, а їх підготовка здійснювалася за допомогою програмного забезпечення Molecular Graphics Laboratory (MGL). Тривимірні структури досліджуваних лігандів завантажувалися з відкритої бази даних PubChem. Оптимізація геометрії лігандів проводилася за допомогою програми Avogadro (v1.2.0).

Згідно отриманих результатів пропоксазепам продемонстрував низьку спорідненість до циклооксигеназ, що зумовлено слабкими взаємодіями у неспецифічних сайтах зв'язування. Водночас він проявив антагоністичний ефект щодо брадикінінового рецептора 1-го типу. Дослідження молекулярного докінгу показало, що пропоксазепам має найвищу енергію зв'язування з Kv7.2 серед аналізованих сполук, перевищуючи референтний ретигабін, а також добре взаємодіє з Kv3.1. Він демонструє помірну афінність до $\alpha 1A$ -адренорецепторів та високу спорідненість до PDE4, що вказує на його потенціал як інгібітора цього ферменту. Крім того, пропоксазепам має найвищу афінність до CB1-рецептора серед досліджених бензодіазепінів, що відкриває перспективи для його подальшого вивчення як ліганда CB1R.

Проведені дослідження *in silico* дають підстави припустити, що, поряд з іншими механізмами периферичної анальгетичної дії, пропоксазепам може взаємодіяти з рецепторами брадикініну, потенціалзалежними калієвими каналами Kv7.2, Kv3.1, NMDA рецептором та фосфодіестеразою 4. На підставі отриманих результатів досліджень поглиблені знання про молекулярні механізми реалізації протизапальної та анальгетичної дії алкоксипохідних 1,4-бензодіазепіну через їхній вплив на білкові молекули.

Ключові слова: алкоксипохідні-1,4-бензодіазепіну, пропоксазепам, аналіз молекулярного докінгу, докінг, біль, запалення, протизапальні засоби, анальгетична дія, протизапальна дія, протизапальна активність, нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП), сироватковий альбумін, рецептори болю, біологічна активність .

ABSTRACT

Akisheva A.S. *In silico* analysis of the mechanisms of implementation of analgesic and anti-inflammatory effects of 1,4-benzodiazepine alkoxy derivatives.

Qualification scientific work in the form of a manuscript.

Manuscript for the degree of Candidate of Biological Sciences (Doctor of Philosophy) in the specialty 091 Biology - Odesa I. I. Mechnikov National University, Odesa, 2025.

The work is devoted to determining the mechanisms of analgesic and anti-inflammatory effects of 1,4-benzodiazepine alkoxy derivatives by the methods of molecular docking and molecular dynamics *in silico*.

To achieve the goal and objectives of the study, an *in vitro* study of the anti-inflammatory activity of propoxazepam (promising innovative analgesic drug of the alkoxy derivatives of 1,4-benzodiazepine series) and a number of *in silico* experiments were conducted to identify the mechanisms of interactions of propoxazepam and some 1,4-benzodiazepine derivatives with protein targets involved in the processes of inflammation and pain. The studies were carried out in two stages.

The first stage of the work was aimed at studying the anti-inflammatory activity of propoxazepam and 1,4-benzodiazepine derivatives *in vitro* by analyzing their protective effect on the stability of bovine serum albumin under thermal denaturation conditions. Additionally, the interaction features of the studied ligands with human serum albumin were identified using the iGEMDOCK v2.1 software package, using protein structural data obtained from the biological macromolecules database. According to the determination of IC_{50} for the studied compounds, it was found that 1,4-benzodiazepine derivatives exhibit a protective effect against thermal denaturation of BSA, with diazepam and propoxazepam surpassing ibuprofen by almost two times in IC_{50} , although they are inferior to it in terms of maximum effect. Compounds with a free hydroxy group in position 3 (oxazepam and 3-hydroxypropoxazepam) demonstrate lower activity, which may

be associated with their ability to bind to BSA. The results obtained allow us to make assumptions: 1,4-benzodiazepine derivatives are able to prevent thermal denaturation of BSA, which may be associated with their interaction with specific binding sites. Therefore, a docking analysis of propoxazepam with human serum albumin (HSA) was further performed, which allowed us to better understand the mechanisms of its action and supplement the results of the *in vitro* study of the anti-inflammatory properties of 1,4-benzodiazepine derivatives. According to the results of the docking analysis, it can be stated that the binding energy to the diazepane site of LSA for propoxazepam is the highest among the studied compounds. These results confirm the participation of serum albumin in the implementation of the anti-inflammatory effect of propoxazepam.

The second stage of the study was the analysis of the interaction (in silico analysis) of propoxazepam with receptors involved in peripheral and central analgesic action. The studied proteins were bradykinin receptor, cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2, voltage-gated potassium channels (Kv), N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA receptor), alpha adrenoreceptor, phosphodiesterase 4 (PDE4), vanilloid receptor of the transient receptor potential subfamily 1 (TRPV1) and cannabinoid receptor (CB1). For the *in silico* analysis, open access software was used, as well as trial versions of commercial programs, in particular iGEMDOCK v2.1, AutoDock, AutoDock Vina, Schrödinger Maestro Glide and PlayMolecule. The structural data of the proteins were obtained from the open RCSB PDB database, and their preparation was carried out using the Molecular Graphics Laboratory (MGL) software. The three-dimensional structures of the studied ligands were downloaded from the open database PubChem. Ligand geometry optimization was performed using the Avogadro program (v1.2.0)

According to the results obtained, propoxazepam demonstrated low affinity for cyclooxygenases, which is due to weak interactions in nonspecific binding sites. At the same time, it showed antagonistic effect on the bradykinin receptor type 1. Molecular docking studies showed that propoxazepam has the highest binding energy to Kv7.2 among the analyzed compounds, exceeding the reference

retigabine, and also interacts well with Kv3.1. It demonstrates moderate affinity for α 1A-adrenoceptors and high affinity for PDE4, which indicates its potential as an inhibitor of this enzyme. In addition, propoxazepam has the highest affinity for the CB1 receptor among the studied benzodiazepines, which opens up prospects for its further study as a CB1R ligand.

In silico studies suggest that, along with other mechanisms of peripheral analgesic action, propoxazepam may interact with bradykinin receptors, voltage-gated potassium channels Kv7.2, Kv3.1, NMDA receptor, and phosphodiesterase 4. Based on the results of the studies, knowledge about the molecular mechanisms of the implementation of the anti-inflammatory and analgesic effects of 1,4-benzodiazepine alkoxy derivatives through their effects on protein molecules has been deepened.

Keywords: 1,4-benzodiazepine-alkoxy-derivatives, propoxazepam, molecular docking analysis, docking, pain, inflammation, anti-inflammatory agents, analgesic effect, anti-inflammatory effect, anti-inflammatory activity, NSAIDs, serum albumin, pain receptors, biological activity.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні результати дисертації

1. Ларіонов В. Б., Акішева А. С., Головенко М. Я., Макаренко О. А., Борисюк І.Ю. Пригнічення термоіндукованої денатурації бичачого сироваткового альбуміну пропоксизепамом і його фармакологічні наслідки. *Доповіді національної академії наук України*. 2022. №3. С. 77-86. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2022.03.077>
2. Ларіонов, В. Б., Акішева, А. С., Головенко, М. Я., Макаренко, О. А., & Борисюк, І. Ю. Простагландинний і брадикініновий механізми анальгетичної та протизапальної дії пропоксазепаму: дані молекулярного докінгу. *Medical and Clinical Chemistry*. 2022. № 1. С. 9–19. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2022.i1.13033>
3. Ларіонов В. Б., Акішева А. С., Головенко М. Я., Макаренко О. А., Валіводзь І. П., Цапенко Ж. М. Докінг-аналіз взаємодії пропоксазепаму з діазепамовим та ібупрофеновим місцями зв'язування людського сироваткового альбуміну. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2022. Т. 16, № 1. С. 46–56 <https://doi.org/10.33250/16.01.045>
4. Larionov V.B., Golovenko M. Ya., Akisheva A. S., Valivodz I. P., Borysiuk I. Yu., Molodan Yu. O., Makarenko O. A. Molecular Insights into Propoxazepam Interaction with TRPV1 Receptors: A Docking Analysis. *Вісник ОНУ. Біологія*. 2023. Т. 28, № 2 (53). С. 99-112. [https://doi.org/10.18524/2077-1746.2023.2\(53\).293324](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2023.2(53).293324)
5. Akisheva, A. S., Larionov, V. B., Golovenko, M. Y., Makarenko, O. A., Valivodz, I. P., Borysiuk, I. Y., & Molodan, Y. O. *In silico* exploration of antinociceptive activity of 1,4-benzodiazepines: Molecular docking on $\alpha 1$ A-adrenoceptor, and phospho-diesterase 4. *Regul. Mech. Biosyst.* 2024. 15(2). 327–336. <https://doi.org/10.15421/022447>
6. Акішева А. С., Сідлецький О. С., Молодан Ю. О., Макаренко О. А. Прогнозування механізмів взаємодії кверцетину, α -циперметрину та його

похідних з α -рецептором естрогену (дослідження in silico). *Вісник ОНУ. Біологія*. 2024. Т. 29, вип. 1(54). С. 81 – 105. [https://doi.org/10.18524/2077-1746.2024.1\(54\).309040](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2024.1(54).309040)

Наукові праці, що засвідчують апробацію матеріалів дисертації

1. Ларіонов В.Б., Валіводзь І.П., Акішева А.С. Пригнічення термоіндукованої денатурації бичачого сироваткового альбуміну пропоксазепамом та його фармакологічні наслідки. *Еколого-біологічна освіта в концепції «Єдине здоров'я»: матеріали Всеук. наук-практ. конф. з міжнар. уч., м. Тернопіль, 27 - 29 квітня. 2022 р. Тернопіль: ТНМУ, 2022. С. 51-52*
2. Ларіонов В. Б., Макаренко О. А., Валіводзь І. П., Борисюк І. Ю., Акішева А. С. Дія пропоксазепаму та його похідних на пригнічення денатурації бичачого сироваткового альбуміну. Тези Науково-практичної конференції XXI читання ім. В. В. Підвисоцького, м. Одеса, 23-24 червня 2022 р. Одеса: ОНМедУ, 2022. С. 50-53.
3. M. Y. Golovenko, V. B. Larionov, O. A. Makarenko, I.Yu. Borysiuk, I. P. Valivodz, A. S. Akisheva. Docking analysis of the interaction of propoxazepam with diazepam and ibuprofen binding sites of human serum albumin. *Сучасні проблеми фармакології, косметології та ароматології: матеріали X міжнародної науково-практичної конференції присвячена 165-річчю з дня народження Яківа Юлійовича Бардаха, м. Одеса 23 вересня. 2022 р. Одеса: МГУ, 2022. С. 44-48*
4. Валіводзь І. П., Акішева А. С., Ларіонов В. Б., Цапенко Ж. М., Головенко М. Я. Дослідження взаємодій похідних 1,4-бенздіазепіну з людським сироватковим альбуміном методом молекулярного докінгу. *Актуальні питання фармакології, клінічної фармакології та клінічної фармації: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Харків, 27-28 жовтня 2022 р. Харків: НФаУ, 2022. С. 13-15*
5. Акішева А.С., Ларіонов В.Б., Макаренко О.А., Молодан Ю.О., Борисюк І.Ю., Валіводзь І.П. Докінг-аналіз взаємодії пропоксазепаму з напругозалежним калієвим каналом людини Kv3.1. *Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації : матеріали V науково-практич. конф. студентів та молодих вчених з*

міжнародною участю, м. Харків, 18 травня 2023 р. Харків: НФаУ, 2023. С. 57-59.

6. Larionov V. B., Valivodz I. P., Akisheva A. S. In silico investigation of the interaction of ligands with the n-methyl-d-aspartate receptor. *Сучасні тенденції розвитку науки, освіти, технологій та суспільства*: Міжнародна науково-практична конференція, м. Полтава, 12 вересня 2023 р. Полтава : ЦФЕНД, 2023. С.58-60.

7. Борисюк І. Ю., Ларіонов В. Б., Валіводзь І. П., Молодан Ю.О., Акішева А. С. Докінг-аналіз взаємодії пропоксазепаму з напругозалежними калієвими (K⁺) каналами. *Сучасні проблеми фармакології, косметології та ароматології*: матеріали науково-практичної конференції, м. Одеса, 22 вересня. 2023 р. Одеса: Факультет стоматології і фармації, МГУ, 2023. С. 36-41.

8. Валіводзь І. П., Акішева А. С. Molecular insights into propoxazepam interaction with TRPV1 receptors: a docking analysis. *Вектори розвитку науки, освіти, технологій і суспільства в умовах глобалізації*: Міжнародна науково-практична конференція, м. Полтава, 19 жовтня 2023 р. Полтава: ЦФЕНД, 2023. С. 58-60.

9. Акішева А. С., Ларіонов В.Б., Макаренко О.А., Валіводзь І.П., Борисюк І.Ю., Молодан Ю.О. Молекулярні механізми взаємодії пропоксазепаму з рецепторами, що приймають участь у ноцицепції: докінг-аналіз. *Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція*: тези доповіді VI науково-практична internet-конференція з міжнародною участю, м. Харків, 16 листопада 2023 р. Харків: НФаУ, 2023. С. 75-77

10. Akisheva A. S., Larionov V. B. , Makarenko O. A., Molodan Yu. O., Borysiuk I. Yu. Docking analysis of 1,4-benzodiazepines with alpha-1 adrenergic receptor and phosphodiesterase 4. *Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку*: тези доповіді всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Одеса, 9-12 квітня 2024 р. Одеса:

ОНУ імені І. І. Мечникова, ФХІ імені О. В. Богатського НАН України.
ОНМедУ, ТДВ «ІНТЕРХІМ», 2024. С. 116-119.

11. Akisheva A. S., Larionov V. B., Makarenko O. A., Valivodz I. P., Borysiuk I. Yu., Molodan Yu. O. Exploring non-specific inhibition of phosphodiesterase 4 by 1,4- benzodiazepines using the approach of molecular dynamics simulation. *Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації* : матеріали VI науково-практичної конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю, м. Харків, 16 травня 2024 р. Харків: НФаУ, 2024. С. 13-15

12. Akisheva A. S., Larionov V. B., Makarenko O. A., Valivodz I. P., Borysiuk I. Yu., Molodan Yu. O. Investigation of the analgesic effect of 1,4- benzodiazepines through docking analysis with cannabinoid receptor 1. *XXIII-і читання В. В. Підвисоцького*: Бюлетень матеріалів наукової конференції, м. Одеса, 16-17 травня 2024 р. Одеса: ОНМедУ, Науке товариство патофізіологів України, Українська асоціація медичної науки, 2024. – С.7-9.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	16
РОЗДІЛ 1 МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ БОЛЮ ТА ПІДХОДИ ДО ЇХ ФАРМАКОТЕРАПІЇ	23
1.1 Процеси сприйняття та передачі больових сигналів, основні типи болю	23
1.2 Молекулярні мішені пов'язані з болем та запаленням.....	26
1.2.1 Людський сироватковий альбумін (ЛСА)	27
1.2.2. Циклооксигенази та брадікінінові рецептори.....	28
1.2.3 Потенціалзалежні калієві канали	29
1.2.4 Рецептор N-метил-D-аспартату (NMDA)	32
1.2.5 Канали транзиторного рецепторного потенціалу (TRP).....	34
1.2.6 $\alpha 1$ А-адренорецептори і фосфодіестераза 4	38
1.3 Анальгетичні та протизапальні засоби, їх механізми дії	40
1.4 Загальна характеристика пропоксазепаму	41
1.5 <i>In silico</i> аналіз у фармакологічних дослідженнях	45
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	48
2.1 Умови проведення експерименту	48
2.2. Методика біоаналізу денатурації білка <i>in vitro</i>	48
2.3 Методика проведення молекулярного докінгу взаємодії пропоксазепаму з біологічними мішенями	49
2.4 Методика проведення молекулярного докінгу взаємодії пропоксазепаму з потенціалзалежними калієвими каналами	51
2.5 Методика проведення досліджень взаємодії пропоксазепаму з NMDA рецептором, $\alpha 1$ -адренорецептором, фосфодіестеразою 4, TRPV1 та канадбіноїдним рецептором <i>in silico</i>	52
2.5.1 Методика QSAR-прогнозування активності пропоксазепаму до TRPV1 рецептору	54

2.5.2 Методика дослідження молекулярної динаміки комплексу пропоксазепаму з фосфодіестеразою 4.....	55
РОЗДІЛ 3 МЕХАНІЗМИ ПРОТИЗАПАЛЬНОЇ ДІЇ ТА ОСОБЛИВОСТІ ЗВ'ЯЗУВАННЯ ПРОПОКСАЗЕПАМУ ТА РЯДУ ПОХІДНИХ 1,4-БЕНЗОДІАЗЕПІНУ З СИРОВАТКОВИМ АЛЬБУМІНОМ.....	56
3.1 Інгібування термічної денатурації бичачого сироваткового альбуміну пропоксазепамом та його фармакологічні ефекти	56
3.2 Особливості взаємодії пропоксазепаму з діазепамовим та ібупрофеновим сайтами зв'язування людського сироваткового альбуміну	60
РОЗДІЛ 4 МЕХАНІЗМИ АНАЛЬГЕТИЧНОЇ ДІЇ ПОХІДНИХ 1,4-БЕНЗОДІАЗЕПІНУ	69
4.1 Простагландинний і брадикініновий механізми анальгетичної та протизапальної дії пропоксазепаму	69
4.2 Механізми взаємодії пропоксазепаму з потенціалозалежними калієвими каналами	80
4.3 Механізми взаємодії пропоксазепаму з NMDA-рецептором.....	84
4.4 Механізми антиноцицептивної активності похідних 1,4-бензодіазепіну, що пов'язані із впливом на $\alpha 1$ -адренорецептором шляхом зв'язування з фосфодіестеразою 4	87
4.5 Молекулярні механізми взаємодії пропоксазепаму з рецепторами TRPV1.....	101
4.6 Молекулярні механізми взаємодії пропоксазепаму з канабіноїдними рецепторами.....	108
РОЗДІЛ 5 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	112
ВИСНОВКИ.....	128
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	130
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	148
ДОДАТОК А СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ.....	149
ДОДАТОК Б	153

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ЛСА-людський сироватковий альбумін

НПЗП-нестероїдні протизапальні препарати

ПНС - периферична нервова система

ХБС-хронічний больовий синдром

ЦНС – центральна нервова система

ЦОГ- циклооксигенази

Kv – потенціалзалежні калієві канали

RTG -ретигабін

KCNQ2 - Potassium voltage-gated channel subfamily Q member 2 (Калієвий канал підродини Q, тип 2)

MM-GBSA – Molecular Mechanics, Generalized Born model and Solvent Accessibility (Молекулярна механіка, узагальнена модель Борна та доступність розчинників)

NMDAR - рецептори N-метил-D-аспартату

TRPV1 - ванілоїдний рецептор підродини потенціалзалежних транзиторних рецепторів типу 1

ВСТУП

Актуальність дослідження.

За останніми даними встановлено, що 27,5 % населення світу страждає від хронічного болю [9]. Щодня більше 30 мільйонів людей по всьому світу використовують різні знеболювальні препарати [139]. Біль є вирішальним зв'язком між первинними захворюваннями та вторинними результатами. Це може викликати динамічну та згубну взаємодію між біологічними, соціальними та психологічними факторами, що призводить до інвалідності та негативного прогнозу для пацієнтів [115].

Однак, усунення болю все ще залишається проблемою, оскільки більшість мішеней для сучасних анальгетиків знаходяться в ЦНС і, таким чином, таким чином, зазнають впливу різних побічних ефектів. Крім того, звикання, толерантність і обмежена ефективність ще більше перешкоджають успішному лікуванню хронічного болю [46].

Біль не є самостійним захворюванням, а виконує функцію сигналу про потенційну небезпеку. З цієї причини анальгетики зазвичай застосовуються для зменшення больових відчуттів, а не як засоби для лікування первинної патології. Однак у випадках тривалого болю, що супроводжує хронічні захворювання, може розвиватися хронічний больовий синдром (ХБС). Цей стан характеризується структурними та функціональними змінами у нервовій системі, а також виникненням значних психологічних ускладнень [121].

Запальна реакція і розвиток болю є взаємозалежними процесами. Неконтрольована запальна реакція запускає процес генерації хронічного болю, який пов'язаний з явищами центральної сенсibilізації та нейропластичності. Стає очевидним, що основним напрямком комплексної анальгетичної терапії має бути цілеспрямоване застосування фармакологічних засобів, що володіють протизапальною дією [16].

У клінічній практиці застосовується широкий спектр анальгетиків, проте їхній прийом часто супроводжується значними побічними ефектами. Опіоїди

та нестероїдні протизапальні засоби (НПЗП), розроблені багато століть тому, залишаються основними засобами лікування запального болю, навіть якщо вони мають обмежену ефективність для певних типів болю та пов'язані зі значними побічними ефектами.

Тому актуальним залишається пошук нових знеболювальних засобів, які матимуть розширений фармакологічний профіль, поєднуючи високу ефективність із безпекою. Перспективним напрямом є розробка агоністів бензодіазепінового сайту ГАМК-А-рецепторів та антагоністів кінінових рецепторів, оскільки ці мішені беруть участь у багатьох фізіологічних процесах, зокрема в регуляції запалення, артеріального тиску, больових відчуттів і судом різного походження [79].

Експериментальні фармакологічні дослідження на тваринах зіштовхуються з низкою викликів, зокрема етичними аспектами та недостатнім обґрунтуванням їх застосування, особливо за наявності альтернативних методів, які можуть бути ефективними й доцільними. Тому у цьому дослідженні протизапальні та анальгетичні властивості сполук оцінювались *in vitro* та *in silico* аналізами. Розуміння молекулярних механізмів, пов'язаних із захворюваннями, є центральною метою сучасних медичних досліджень. Вивчення просторової структури комплексів клітинних білків та мембранних рецепторів із лігандами є ключовим етапом у розкритті механізмів їхнього функціонування. Ефективний підхід до розробки та пошуку нових лікарських засобів також вимагає структурних даних про взаємодію прототипів ліків із білком-мішенню [79].

Тому, дане дослідження зосереджене на вивченні антиноцицептивних механізмів дії анальгетичного засобу пропоксазепаму шляхом *in vitro* та *in silico* аналізу.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконано в межах наукових тем кафедри фізіології, здоров'я і безпеки людини та природничої освіти Одеського національного університету імені І. І. Мечникова «Дослідження лікувально-профілактичних

властивостей раковин молюсків Чорного моря»; № держ. реєстрації 0119U000499, «Дослідження механізмів розвитку патологічних станів у людини та тварин під впливом ксенобіотиків», № держ. реєстрації 0124U004566 та ДУ «Інститут стоматології та щелепно-лицевої хірургії НАМН України» «Експериментальне дослідження змін тканин ротової порожнини у щурів під впливом ксенобіотиків та гіпоксії» № держ. реєстрації 0120U105477; «Експериментальне обґрунтування розробки профілактичних засобів для запобігання метаболічних порушень, які викликані ксенобіотиками воєнного походження», № держ. реєстрації 0123U102321. Здобувач є співвиконавцем окремих фрагментів тем.

Мета та завдання дослідження. *in silico* аналіз та ідентифікація механізмів реалізації анальгетичного та протизапального ефектів алкоксипохідних 1,4-бензодіазепіну шляхом молекулярного докінгу та молекулярної динаміки.

Для досягнення поставленої мети були сформульовані наступні завдання:

1. Оцінити протизапальну активність *in vitro* пропоксазепаму та ряду похідних 1,4-бенздіазепіну за ефектом протективного впливу на стабільність сироваткового альбуміну в умовах термічної денатурації.
2. Дослідити взаємодію пропоксазепаму та деяких похідних 1,4-бенздіазепіну з людським сироватковим альбуміном методом молекулярного докінгу та провести аналіз складових цих взаємодій.
3. Визначити можливість взаємодії пропоксазепаму з циклооксигеназою-1 (ЦОГ-1) і циклооксигеназою-2 (ЦОГ-2) та рецептором брадикініну методом молекулярного докінгу та провести аналіз складових цих взаємодій.
4. Виявити механізми молекулярної взаємодії пропоксазепаму з білковими мішенями, залученими до реалізації його анальгетичної дії, зокрема напругозалежними калієвими каналами та NMDA-рецептором.
5. На підставі отриманих результатів *in silico* аналізу обґрунтувати взаємодію пропоксазепаму з альфа-1 адренорецептором та фосфодіестеразою 4.

6. Визначити афінність та механізми зв'язування пропоксазепаму та ряду похідних 1,4-бенздіазепіну з TRPV1 та канабіноїдними рецепторами.

Об'єкт дослідження – молекулярні механізми реалізації антиноцицептивної та протизапальної дії алкоксіпохідних 1,4-бензодіазепіну.

Предмет дослідження – молекулярні складові взаємодій алкоксіпохідних 1,4-бензодіазепіну з білковими мішенями, встановлені за допомогою *in silico* аналіз; оцінка докінгу; енергія взаємодії.

Методи дослідження – *in vitro* метод біоаналізу денатурації білка (визначення оптичної щільності); фізико-хімічний аналіз (прогнозування фізико-хімічних показників сполук); *in silico* методи моделювання взаємодії між досліджуваними лігандами та білками (методи молекулярного докінгу та молекулярної динаміки); статистичний аналіз результатів.

Наукова новизна отриманих результатів.

На підставі отриманих результатів досліджень дисертаційної роботи поглиблені знання про молекулярні механізми реалізації протизапальної та анальгетичної дії алкоксіпохідних 1,4-бензодіазепіну через їхній вплив на білкові молекули.

Наукова новизна отриманих результатів полягає в ідентифікації нових молекулярних мішеней для алкоксіпохідних 1,4-бензодіазепіну, що розширює уявлення про їхню протизапальну та анальгетичну дію.

Вперше встановлено специфічні сайти зв'язування пропоксазепаму з ключовими білковими мішенями, зокрема ЛСА, брадикініновими рецепторами, Kv7.2, NMDA-рецептором та фосфодіестеразою 4, що обґрунтовує його потенційну роль у модуляції больової чутливості та запального процесу.

Отримані дані дозволяють не лише глибше зрозуміти механізми дії цих сполук, а й сприяють розробці нових підходів до створення ефективних анальгетичних та протизапальних засобів із покращеним фармакологічним профілем.

Практичне значення отриманих результатів.

Результати дослідження можуть бути використані в експериментальній та клінічній фармакології для подальшого вивчення механізмів дії похідних 1,4-бензодіазепіну і їхнього потенційного застосування в лікуванні больових синдромів та запальних процесів, а також у створенні нових біологічно-активних сполук з анальгетичними властивостями.

Особистий внесок дисертанта.

Автором проведено пошук та аналіз джерел літератури за обраною темою. Разом з науковим керівником були визначені мета та завдання дослідження, обрані методи дослідження, сформовані висновки. Здобувачем самостійно проведено молекулярний докінг алкоксіпохідних 1,4-бензодіазепіну з рядом білків, частково виконано *in vitro* дослідження протиденатураційного ефекту пропоксазепаму та дослідження його механізмів взаємодії з людським сироватковим альбуміном, ЦОГ-1, ЦОГ-2 та брадикініновим рецептором, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, написання статей, дисертаційну роботу. У статті [4] автором проведено *in vitro* експериментальну частину дослідження; у статті [2] докторантом проведено аналіз та обробку результатів докінг-аналізу; у статті [5] здобувачем виконана підготовка та оптимізація молекул до докінг аналізу, обробка результатів та оформлення тексту статті; у статті [67] автором проведено докінг аналіз фосфодіестерази 4 з досліджуваними лігандами, проведено аналіз складових цих взаємодій; у статті [81] здобувачем виконаний аналіз досліджуваних структур лігандів та референтний сполук TRPV1 рецептору, для виявлення фармакофорних особливостей, проведено аналіз результатів докінгу та оформлена експериментальна частина статті; у статті [6] автором обґрунтовано вибір методу дослідження.

За допомоги у проведенні *in vitro* досліджень пригнічення термоіндукованої денатурації бичачого сироваткового альбуміну пропоксазепамом та *in silico* моделювання взаємодії алкоксіпохідних 1,4-бензодіазепіну з досліджуваними білками, консультацію та допомоги у написанні статей висловлюємо велику подяку д.б.н., завідувачу відділу

біомедицини Фізико-хімічного інституту ім. О.В. Богатського Головенко Миколі Яковичу.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи були оприлюднені на: Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю. «Еколого-біологічна освіта в концепції «Єдине здоров'я» (Тернопіль, 2022); науково-практичної конференції XXI читання ім. В. В. Підвисоцького (Одеса, 2022); X міжнародній науково-практичній конференції присвяченій 165-річчю з дня народження Яківа Юлійовича Бардаха «Сучасні проблеми фармакології, косметології та аромології» (Одеса, 2022); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні питання фармакології, клінічної фармакології та клінічної фармації» (Харків, 2022); V науково-практичній конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації» (Харків, 2023); міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні тенденції розвитку науки, освіти, технологій та суспільства» (Полтава, 2023); науково-практичній конференції «Сучасні проблеми фармакології, косметології та аромології» (Одеса, 2023); міжнародній науково-практичній конференції «Вектори розвитку науки, освіти, технологій і суспільства в умовах глобалізації» (Полтава, 2023); VI науково-практичній internet-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція» (Харків, 2023); всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку» (Одеса, 2024); VI науково-практичній конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації» (Харків, 2024); науковій конференції «XXIII–і читання В. В. Підвисоцького» (Одеса, 2024).

Публікації.

За результатами дисертації опубліковано 18 наукових праць: 5 статей у наукових фахових виданнях України, 1 стаття у виданні, що входить до міжнародної наукометричної бази Scopus та Web of Science, 12 тез доповідей у матеріалах конференцій.

Структура та обсяг дисертації.

Дисертація викладена на 159 сторінках комп'ютерного тексту і складається з анотацій, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів власних досліджень, аналізу та обговорення результатів, висновків, списку використаних джерел та додатків. Дисертація ілюстрована 22 рисунками і 23 таблицями. Перелік використаних джерел містить 148 найменувань (6 кирилицею і 142 латиницею).

РОЗДІЛ 1

МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ БОЛЮ ТА ПІДХОДИ ДО ЇХ ФАРМАКОТЕРАПІЇ

(огляд літератури)

Біль описується як неприємне відчуття, що поєднує сенсорні та емоційні аспекти, і виникає або асоціюється з реальним чи можливим ушкодженням тканин [108].

Гострий біль виступає як захисний механізм проти шкідливих подразників, інфекцій, порушень гомеостазу та вторинних інсультів [140, 115]. У той час як хронічний біль є переважно неприємним і часто стає основною причиною звернень до медичних закладів. Цей стан створює значний соціально-економічний тягар по всьому світу [99, 115], з рівнем поширеності від 10% до 40%, при цьому рівень повного одужання залишається низьким — лише 5% [127, 115]. Зменшення болю є критично важливим та необхідним аспектом клінічного лікування [115] для успішного вирішення якого потрібно детальне розуміння типів болю, їх сприйняття та механізмів виникнення.

1.1 Процеси сприйняття та передачі больових сигналів, основні типи болю

Сприйняття болю є складним фізіологічним процесом, який залучає як центральну нервову систему (ЦНС), так і периферичну нервову систему (ПНС). Для трансдукції, передачі, модуляції та сприйняття больових сигналів активно взаємодіють численні нервові структури, клітини та молекули [102].

Ноцицептори – периферичні рецептори болю, які розташовані в різних частинах тіла, таких як шкіра, м'язи, сухожилля та внутрішні органи. Вони сприймають шкідливі подразники, зокрема термічні, механічні та хімічні, і мають вищі пороги активації порівняно з іншими сенсорами, що дозволяє уникнути болю при звичайних тактильних відчуттях. Ноцицептори

генерують сигнали, які передаються через різноманітні іонні канали, зокрема напругозалежні натрієві, кальцієві та калієві канали. Це забезпечує швидку та точну передачу больових сигналів до ЦНС [74]. Електричні сигнали, що генеруються ноцицепторами, передаються до спинного мозку через аферентні нервові волокна, які є аксонами сенсорних нейронів. Існує три основні типи аферентних волокон: А β , А δ і С, які відрізняються анатомічними характеристиками та функціями. Волокна А δ і С відповідають за передачу болю. Таким чином, нервові волокна різних типів відіграють ключову роль у відчутті болю, кожне з них передає специфічні сигнали до спинного мозку [74]. Потім електричні сигнали передаються до різних частин мозку через висхідні шляхи, зокрема спіноталамічний тракт, що відповідає за біль від тулуба та кінцівок, та тригеміноталамічний тракт – для болю від голови та обличчя. Головний мозок координує сигнали болю через кілька нейронних центрів, таких як таламус та соматосенсорна кора. Ці області активно беруть участь у формуванні відчуття болю, а також у його модуляції, зокрема через нейротрансмітери та нейромодулятори, що впливають на больові сигнали [115].

Біль можна класифікувати за трьома основними типами: ноцицептивний (виникає внаслідок пошкодження тканин), нейропатичний (внаслідок пошкодження нерва) і ноципластичний (виникає через сенсibiliзовану нервову систему) [50].

Ноцицептивний біль є найбільш розповсюдженим типом болю. Це природна короткотривала відповідь організму на реальні або потенційно шкідливі фактори, яка стимулює захисну поведінку. Одним із найпоширеніших підтипів ноцицептивного болю є запальний біль [115, 132]. Зазвичай терапія, спрямована на усунення запалення, ефективно зменшує запальний біль завдяки зниженню нервової стимуляції після зникнення запального процесу. Водночас хронічне запалення може стати причиною патологічного болю, оскільки запальні медіатори впливають на больові рецептори, знижуючи їхні пороги збудливості та підвищуючи чутливість до

стимулів. Це, у свою чергу, сприяє розвитку периферичної та центральної сенсibiliзації [34, 47]. У таких сенсibiliзованих станах больове сприйняття може бути порушеним, проявляючись, наприклад, алодинією (коли нешкідливі подразники відчуються як болючі) або гіпералгезією (підвищенням інтенсивності та тривалості болю у відповідь на шкідливі подразники) [47]. У місці запалення вивільняються прозапальні речовини, такі як цитокіни, протеази, нейропептиди та фактори росту. Вони викликають сенсibiliзацію (підвищення чутливості) периферичних больових нейронів, що призводить до посиленого больового сприйняття [84]. Соматичний ноцицептивний біль зазвичай локалізується в дермі та описується як різкий, пекучий або ріжучий. У протилежність цьому, вісцеральний ноцицептивний біль характеризується розмитістю та розсіяністю. До прикладів ноцицептивного болю належать біль, що виникає через порізи, опіки або хімічне пошкодження [115].

Нейропатичний біль виникає через пошкодження або хвороби соматосенсорної системи, що охоплює як периферичні нервові волокна (А β , А δ та С), так і центральні нейрони. Цей тип болю стосується близько 7-10 % людей. Нейропатичний біль пов'язаний з дисбалансом між збуджувальними та гальмівними сигналами в соматосенсорній системі, змінами в іонних каналах та варіаціями в механізмах модулювання больових сигналів у центральній нервовій системі [73]. До поширених захворювань, що супроводжуються нейропатичним болем, відносяться постгерпетична невралгія, невралгія трійчастого нерва, больова радикулопатія, діабетична нейропатія, інфекція вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ-інфекція), проказа, біль після ампутації, пошкодження периферичних нервів, а також центральний постінсультний біль. Нейропатичний біль механічно відрізняється від інших хронічних больових станів, таких як запальний біль (наприклад, ревматоїдний артрит), який спричинений запаленням і зміненими хімічними процесами в місці запалення. Ці два види болю діагностуються та лікуються по-різному [73, 95]. Пацієнти з нейропатичним

болем відчують симптоми, такі як печіння та відчуття електричного подразнення, а також біль від неbolьових подразників. Ці симптоми є постійними, часто хронічними та менш реагують на знеболюючі препарати. Крім того, нейропатичний біль пов'язаний із порушеннями сну, тривогою та депресією, що призводить до більш значного впливу на якість життя порівняно з хронічним неневропатичним болем [38].

Ноксіпластичний біль – це механістичний термін, який описує біль, що виникає або підтримується зміненням ноцицептивним процесом, незважаючи на відсутність пошкодження тканин [96]. Термін «ноксіпластичний біль» був вперше запропонований у 2016 році для хронічного болю, що не супроводжується активацією ноцицепторів чи нейропатією, але має клінічні ознаки, що вказують на зміну функції ноцицепції. Основні симптоми ноксіпластичного болю включають біль у кількох ділянках тіла, втому, порушення сну, когнітивні розлади, депресію та тривогу. Його поширеність у загальній популяції становить від 5 % до 15 %, із перевагою серед жінок [39, 115].

1.2 Молекулярні мішені пов'язані з болем та запаленням

Біль і запалення є складними біологічними процесами, що залучають широкий спектр молекулярних мішеней, включаючи іонні канали, рецептори нейромедіаторів, прозапальні цитокіни та ферменти, що регулюють синтез медіаторів запалення. Дисбаланс цих молекулярних механізмів сприяє розвитку та хронізації болю, зокрема при запальних та дегенеративних захворюваннях. Вивчення специфічних мішеней, залучених у ноцицептивну та запальну відповідь, є ключовим для розробки нових терапевтичних стратегій, спрямованих на ефективне знеболення та протизапальну дію з мінімізацією побічних ефектів. Шкідливі подразники активують різні молекулярні механізми, такі як рецептори N-метил-D-аспартату (NMDAR) та проникні для кальцію канали пуринергічного рецептора (P2X), що відповідають за збудження нейронів [30, 85]. Окрім того, нейромедіатори,

такі як глутамат та гліцин, сприяють активації нейронів, а нейромодулятори регулюють їх чутливість. Запальні процеси також можуть змінювати пороги болю, сприяючи хронізації болю.

1.2.1 Людський сироватковий альбумін (ЛСА)

Людський сироватковий альбумін (ЛСА) є найбільш поширеним білком у плазмі крові, концентрація якого становить 36–50 г/л. Його синтез здійснюється в печінці, а період напіввиведення триває близько 19 днів. Молекулярна маса ЛСА дорівнює 67,5 кДа, білок складається з 585 амінокислотних залишків та містить 17 дисульфідних зв'язків [78]. Сучасні дослідження акцентують увагу на тому, що ця молекула бере участь не лише у процесах, які пов'язані з її фізико-хімічними характеристиками (такими як абсорбція, іонізація, підтримання буферної ємності та онкотичного тиску), але й у механізмах, що забезпечують біологічну відповідь організму та підтримання гомеостазу. Структурні зміни сироваткового альбуміну спостерігаються при різних патологічних станах, які супроводжуються запальними процесами, що впливають переважно на функціонування судин і нирок [44], а також при порушеннях метаболізму, зокрема при діабеті [101, 120]. Протягом тривалого часу його основною функцією вважалося транспортування ендогенних і екзогенних речовин. Згодом було виявлено інші важливі властивості, серед яких антиоксидантна дія [124], здатність накопичувати оксид азоту (NO) [64], регулювати рівень глутатіону, активувати ядерний фактор каппа в клітинах [10], а також виконувати функції скавенджера, знешкоджуючи вільні радикали та активні форми кисню, які провокують запалення [72]. Ці функції зумовлені його здатністю зв'язувати низькомолекулярні сполуки [100].

У нормальних фізіологічних умовах сироватковий альбумін переважно перебуває у відновленій формі (меркаптоальбумін), а його тіолові групи беруть участь у передачі сигналів до регуляторних клітин (наприклад, нейтрофілів) [62].

Тривалість циркуляції альбуміну в крові може сягати 25 днів, проте вплив шкідливих факторів скорочує цей період. Зв'язування низькомолекулярних речовин на поверхні альбуміну сприяє стабілізації його структури, завдяки чому він довше зберігає нативну конформацію та не піддається денатурації. Відомо, що певні ендogenousні сполуки (наприклад, солі жовчних кислот, аліфатичні кислоти) та екзогенні речовини (зокрема, нестероїдні протизапальні засоби) здатні запобігати денатурації сироваткового альбуміну [70]. Ця властивість лягла в основу скринінгових методів для попередньої оцінки протизапальної активності біологічно активних речовин [70].

ЛСА має кілька основних сайтів для зв'язування, серед яких специфічні ділянки: індоловий, саліцилатний, білірубіновий та ібупрофеновий. Формування цих ділянок забезпечується різними типами взаємодій, включаючи водневі зв'язки, Ван-дер-Ваальсові сили та гідрофобні взаємодії, що зумовлено наявністю певних амінокислотних залишків [25]. Вивчення структури цих залишків є важливим для розуміння механізмів взаємодії альбуміну з лігандами та прогнозування конкуренції за місця зв'язування, що має велике значення для розробки нових лікарських препаратів.

1.2.2. Циклооксигенази та брадікінінові рецептори

Простагландини є похідними арахідонової кислоти, які утворюються завдяки дії циклооксигеназ (ЦОГ) – ензимів з різними формами активності та чутливістю до нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП). Ці ензими можуть спричиняти запалення та значно впливати на процес формування больових відчуттів, збільшуючи збудливість периферичних сенсорних систем [72]. Для блокування їх діяльності з терапевтичною метою використовують НПЗП, які, однак, мають певні побічні ефекти, такі як ушкодження шлункової слизової оболонки, діарея, зниження згортання крові та кровотечі, нефротоксичність тощо. Це робить пошук більш безпечних знеболювальних засобів важливою невирішеною проблемою.

Також варто зазначити роль брадикініна, який відіграє важливу роль у розвитку та передачі больових сигналів. Він є одним з основних хімічних подразників, що викликають біль, і є найбільш фізіологічно значущим у процесах ушкодження тканин. Брадикінін діє через два типи рецепторів, які зв'язані з G-білками: V2-рецептор, що постійно експресується в тканинах, і V1-рецептор, що активується при запаленнях або травмах [58].

1.2.3 Потенціалзалежні калієві канали

Електричне збудження периферичних соматосенсорних нервів є початковим етапом формування більшості больових сигналів у нервовій системі ссавців. Цей процес регулюється складною мережею іонних каналів, які взаємодіють між собою для забезпечення рівня збудження, пропорційного інтенсивності зовнішньої стимуляції. Однак при ряді патологічних станів спостерігається порушення цієї координації, що веде до дерегуляції периферичної збудливості та може стати основою для розвитку різних хронічних больових синдромів, таких як мігрень, невралгія, невропатичний і запальний біль. Однією з основних груп іонних каналів, відповідальних за регулювання нейронної збудливості, є калієві канали [46]. Калієві канали представляють собою різноманітну групу білків, що налічують понад 75 типів, які можна класифікувати на чотири основні категорії: потенціалзалежні (Kv), кальцієвомодульовані (KCa), внутрішньоклітинні випрямлячі (Kir) та двопорові (K2P) калієві канали. Потенціалзалежні калієві канали є найбільш чисельною підгрупою, що налічує 12 ідентифікованих типів (Kv1–12) з подальшими підкатегоріями в межах кожного типу Kv [66]. Потенціалзалежні іонні канали відносяться до типу трансмембранних білків, конформація яких визначається мембранними потенціалами. Вони відіграють вирішальну роль у перетворенні рецепторних потенціалів у ряд потенціалів дії.

Потенціалзалежні калієві канали є мембранними білками, що контролюють потік іонів калію через клітинну мембрану. Вони виконують

ключову роль у регуляції потенціалу спокою та потенціалу дії нейронів, а також у функціонуванні інших електрично збудливих клітин, таких як м'язові та ендокринні. Ці канали активуються змінами мембранного потенціалу, тобто вони реагують на коливання електричного заряду на клітинній мембрані. Коли мембранний потенціал стає більш позитивним, потенціалзалежні K^+ канали відкриваються, що дозволяє іонам калію покидати клітину, сприяючи її реполяризації та відновленню потенціалу спокою. Дисфункція потенціалзалежних K^+ каналів асоціюється з різноманітними неврологічними розладами, такими як епілепсія, атаксія, а також серцеві аритмії. Як результат, напругозалежні K^+ канали стали важливою мішенню для розробки лікарських засобів, спрямованих на модуляцію їх функціонування з метою лікування цих захворювань. K_v мають ключове значення у регуляції збудливості нейронів, зокрема в контексті передачі больових сигналів. Тому вивчення їх функціонування та механізмів регуляції є надзвичайно важливим для розробки ефективних підходів до лікування больових синдромів, зокрема невропатичного та запального болю. Препарати, що спрямовані на K^+ канали, мають потенціал знижувати збудливість нейронів, зменшувати запалення та больову чутливість, проте для підтвердження їх ефективності та безпеки необхідні додаткові дослідження [105]. Наразі розроблено кілька препаратів, спрямованих на K_v канали, для лікування болю. Одним із таких є триамінопіридини (ретигабін та флупіртин), які активують конкретні K^+ канали та, як показали дослідження на тваринних моделях, зменшують біль у випадку нейропатичного болю [61, 128, 134, 146].

Потенціалзалежний калієвий канал KCNQ2 ($K_v7.2$) регулює М-струм у нейронах і є ключовою лікарською мішенню для терапії епілепсії, болю та низки інших захворювань, що пов'язані з гіперзбудливістю нейронів. Мутації в гені KCNQ2 зазвичай призводять до зниження М-струму, що викликає надмірну збудливість нейронів і провокує судоми. Такі мутації також є

причиною епілептичної енцефалопатії, що робить KCNQ2 важливим терапевтичним об'єктом для розробки ліків проти епілепсії.

Модуляція функції $K_v7.2$ має потенціал як терапевтична стратегія для лікування різних розладів, включаючи біль, хворобу Паркінсона, ішемію, шизофренію та порушення функції гладкої мускулатури, що супроводжуються гіперзбудливістю нейронів [66, 146]. Зокрема, експресія KCNQ2 у сенсорних та центральних нейронах має важливе значення в ноцицептивних шляхах. Інгібування М-струму в нейронах спинномозкових гангліїв сприяє розвитку болю при ракових захворюваннях кісток, остеоартриті та невропатичному болю [122, 146], в той час як активація KCNQ2 може зменшити інтенсивність нейропатичного болю та фіброміалгії в тваринних моделях [66, 146].

Канал $K_v7.2$ може регулюватися ендогенними молекулами, такими як кальмодулін (CaM) та фосфатидилінозитол 4,5-бісфосфат (PI(4,5)P2) [134, 146]. Крім того, існує низка синтетичних сполук, які можуть активувати KCNQ2 через безпосереднє зв'язування з каналом. Ретигабін (RTG), або езогабін, є першим препаратом, схваленим для лікування епілепсії, який сприяє активації калієвих каналів сімейства $KV7$ [128]. RTG використовувався як додатковий засіб для лікування рефрактерних парціальних нападів у дорослих з червня 2011 року [119]. Інший препарат, флупіртин, який є неопіїдним анальгетиком та структурним аналогом RTG, також має властивість активувати KCNQ2. Флупіртин використовувався в Європі протягом десятиліть для лікування гострого та хронічного болю [66, 146]. Проте, як RTG, так і флупіртин мають низьку селективність до мішені, що призводить до численних побічних ефектів. Зокрема, клінічні випробування RTG виявили пігментацію сітківки ока та зміни кольору шкіри після тривалого застосування [125]. У зв'язку з цими проблемами безпеки, RTG було вилучено з ринку, хоча ця сполука залишається важливим інструментом для дослідження механізмів дії, пов'язаних з активністю KCNQ2, що все ще не до кінця зрозумілі. Визначення структури $K_v7.2$ у

комплексі з його модуляторами допомогло б розробити селективні активатори KCNQ, що дозволить подолати побічні ефекти, які спостерігаються у сучасних анальгетиків і протиепілептичних препаратів [146].

1.2.4 Рецептор N-метил-D-аспартату (NMDA)

Рецептори N-метил-D-аспартату (NMDAR), що складаються з різних субодиниць GluN, особливо чутливі до механічної стимуляції. Приплив кальцію через NMDAR є критичним індуктором активації електричного сигналу. Іонно-специфічна проникність контролюється Mg^{2+} , а деполяризація нейронів сприяє активації NMDAR [30]. Цей рецептор є тетрамером, тобто складається з чотирьох субодиниць, зокрема двох GluN1 і двох GluN2 або GluN3 або однієї GluN2 і однієї GluN3. Рецептор включає позаклітинний ліганд-зв'язуючий домен і трансмембранний іонний канал. Зв'язування ліганду викликає закриття ліганд-зв'язуючого домену, що, у свою чергу, призводить до відкриття іонного каналу. Канал NMDAR неспецифічний до позитивно заряджених іонів, але, завдяки його властивостям і концентрації іонів, через нього найчастіше проходить кальцій [110]. Субодиниці GluN1 забезпечують функціонування рецептора, тоді як GluN2 і GluN3 впливають на його функціональні характеристики. GluN2 необхідні для активації рецептора глутаматом, а їхні різновиди визначають такі властивості, як швидкість активації й дезактивації та ймовірність відкриття каналу. Наприклад, рецептори з GluN2A мають швидку активацію та дезактивацію, тоді як GluN2B демонструє триваліший час активації. GluN2C характеризується низькою провідністю та слабкою чутливістю до блокування магнієм (Mg^{2+}), тоді як GluN2D переважно експресується на ранніх етапах розвитку й має надзвичайно повільний час розпаду [110].

Субодиниці GluN3 виконують модуляторну функцію. Вони знижують проникність рецептора для кальцію (Ca^{2+}) і зменшують його чутливість до магнієвого блокування. GluN3A експресується переважно на ранніх стадіях

розвитку, тоді як GluN3B стає більш вираженим на пізніших етапах [110]. Нейропатичний біль постійно активує рецептори NMDAR через безперервну ендогенну стимуляцію глутамату, що сприяє подальшій хронізації болю [57].

NMDA-рецептори вважаються перспективною терапевтичною мішенню для лікування нейродегенеративних захворювань, що зумовило значний інтерес до розробки їхніх антагоністів упродовж останніх років [40]. Каналоблокатори NMDAR мають значення для медицини завдяки їх потенціалу в лікуванні депресії, епілепсії та хвороби Альцгеймера. Проте детальні механізми, які регулюють зв'язування лігандів і функціонування каналів, досі недостатньо досліджені через складнощі у визначенні високоточних структур сайтів зв'язування в трансмембранних доменах [144].

NMDAR розглядаються як можливі регулятори нейропластичності, пов'язаної з больовими процесами в ПНС, а також як ключові учасники синаптичної передачі збудження та пластичності у ЦНС [131]. З наукової літератури відомо про наступні ліганди NMDA-рецептору.

Кетамін є неконкурентним блокатором каналів NMDAR. Це рацемічна суміш ізомерів S- і R-кетаміну, при цьому S-кетамін має вищу антидепресивну активність [97]. Кетамін належить до класу циклогексанонів, у яких один атом водню в положенні 2 замінений на 2-хлорфенільну групу, а інший — на метиламіногрупу. Він діє як внутрішньовенний анестетик, антагоніст NMDA-рецепторів, анальгетик, нейротоксин, а також має властивості забруднювача довкілля та ксенобіотика. Його структура включає циклогексанони, вторинні аміни та монохлорбензоли [75, 130].

Кінуренова кислота є проміжним метаболітом кінуренінового шляху та єдиним природним антагоністом NMDA-рецепторів у мозку [87]. Ця речовина діє переважно на NMDA-рецептори як ендогенний антагоніст. Вона утворюється внаслідок реакції перетворення кінуреніну, що каталізується ферментами кінуренінамінотрансферазами. Окрім відомої ролі у патологіях ЦНС, кінуренова кислота також демонструє натрійуретичні властивості [22].

N-метил-D-аспарагінова кислота є похідною речовиною аспарагінової кислоти з N-метильним замісником і D-конфігурацією. Вона діє як нейромедіатор. Ця сполука є D-ізомером аспарагінової кислоти, який виступає специфічним агоністом NMDA-підтипу глутаматних рецепторів. Її структура включає D-альфа-амінокислоти, амінодикарбонові кислоти та вторинні аміни [98].

1.2.5 Канали транзиторного рецепторного потенціалу (TRP)

В кінці 20-го століття Девід Джуліус та його команда виявили іонний канал TRPV1, який активується під впливом тепла і викликає больові сигнали. Це відкриття стало основою для виявлення інших температурних рецепторів. За цей значний внесок у науку Девід Джуліус отримав Нобелівську премію у 2021 році [136, 115]. Канали транзиторного рецепторного потенціалу (TRP), найбільш репрезентативні ліганд-керовані іонні канали, широко поширені як у ЦНС, так і в ПНС. Члени сімейства TRP діють як молекулярні датчики болю та свербезу, реагуючи на фізичні та хімічні подразники. TRPV1 є одним із найпопулярніших мішеней для терапії болю. TRPV1 присутній як у центральній нервовій системі, так і в периферичних кровоносних судинах. Потреба у розробці нових інгібіторів TRPV1, спрямованих на специфічне лікування болю, виходить за рамки лише больового синдрому і охоплює також інші захворювання, асоційовані з цим іонним каналом, включаючи психічні розлади [104].

Синдром запального кишечника, остеоартрит, ревматоїдний артрит, постгерпетична невралгія і цистит – усі патофізіологічні стани, до яких залучений TRPV1. Це підкреслює важливість вивчення цього рецептора для лікування широкого спектра розладів.

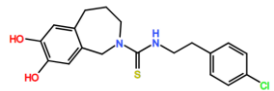
Зменшення сприйняття болю та відчуття свербезу при патологічних станах можна досягти за допомогою впливу на TRPV1, який, як було показано, є перспективною терапевтичною мішенню. Існує два способи

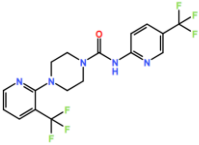
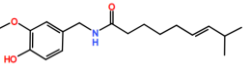
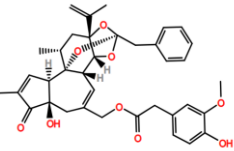
фармакологічного впливу на TRPV1: його можна десенсибілізувати ванілоїдами агоністами або блокувати антагоністами.

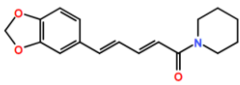
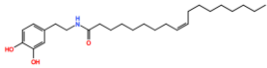
Агоністи TRPV1 виявляють терапевтичний ефект через механізм десенсибілізації больових нервових волокон, що відіграє ключову роль у забезпеченні знеболювального ефекту. Десенсибілізація, індукована агоністами TRPV1 (такими як капсаїцин і резинфератоксин), є високоефективною стратегією для зменшення ноцицептивних поведінкових проявів у тваринних моделях хронічного болю [27, 77, 141]. Ванілільна група є ключовим компонентом більшості відомих потужних агоністів TRPV1, проте існують приклади, які свідчать про можливість її заміни на структурно подібні хімічні групи без втрати активності. Нещодавно було виявлено, що агоніст TRPV1 MDR-652 має 3-фтор-4-(гідроксиметил)фенільну групу замість ванілільної групи (таблиця 1). Антагоністи TRPV1 демонструють виражені анальгетичні та протизапальні властивості, що робить їх перспективними засобами для лікування нейропатичного болю [27]. Тепло, протони водню та хімічні ліганди є трьома способами активації TRPV1, які антагоністи TRPV1 вибірково блокують [141].

Таблиця 1.1

Загальна інформація про агоністи та антагоністи рецептора TRPV1

Ліганди TRPV1	Опис
1	2
Капсазепін  Схема хімічної структури створена Draw Structure NIH	Капсазепін містить 2,3,4,5-тетрагідро-1H-2-бензазепін-7,8-діол замість ванілільної групи. Його застосування забезпечує блокування активації TRPV1, а також катіонного каналу транзитного потенціалу підродини А, члена 1 (TRPA1) [37]. (Антагоніст)

1	2
JNJ – 17203212  [90]	Це антагоніст рецептора TRPV1. Препарат виявляє потужну антиноцицептивну та протикашльову дію. Він розроблений Johnson & Johnson для лікування болю та кашлю [90]. (Антагоніст)
Капсаїцин  [91]	Капсаїцин, рослинний іритант, який природним чином міститься в перці чилі, синтезується для фармацевтичних цілей. Ця сполука діє як агоніст TRPV1 — комплексу іонних каналів і рецепторів, експресованих на ноцицептивних нервових закінченнях у шкірі [91]. Під час початкової експозиції капсаїцин активує ліганд-залежні TRPV1-канали на первинних аферентних ноцицептивних нейронах, що спричиняє деполяризацію, запуск потенціалу дії та передачу больових сигналів до спинного мозку. У відповідь на це виникає тривалий рефрактерний період, відомий як десенсибілізація. У разі надмірної дози капсаїцину може розвинутися триваліша локальна десенсибілізація, яка називається дефункціоналізацією [77]. (Агоніст)
Резиніфератоксин (RTX)  [92]	Молочай смолистий (<i>Euphorbia resiniferous</i>), кактусоподібна рослина, є джерелом резиніфератоксину (RTX або RTX-107), який є протизапальним ванілоїдом. Десенсибілізація рецептора TRPV1 за допомогою резиніфератоксину спричиняє знеболювальний ефект [92]. (Агоніст)

1	2
Піперин  [93]	Насіння чорного перцю (<i>Piper nigrum</i>) містить гострий алкалоїд, відомий як піперин. Піперин активує TRPV1, безпосередньо взаємодіючи з пороутворюючим сегментом S6 цього іонного каналу, у спосіб, відмінний від капсаїцину [1]. Властивості піперину включають імуномодулюючу, противиразкову, антиоксидантну, антиканцерогенну, протиастматичну та протизапальну [93]. (Агоніст)
N-олеоїлдофамін  [94]	N-олеоїлдофамін є ліпідною сполукою, що утворюється в мозку ссавців. Дослідження показали, що він функціонує як агоніст рецептора капсаїцину (TRPV1). Активація цього рецептора спричиняє вивільнення глутамату та постсинаптичне запалення в паравентрикулярному ядрі. Крім того, N-олеоїлдофамін може індукувати приплив кальцію у трансфікованих клітинах TRPV1, таких як ембріональні клітини нирок людини HEK293, як зазначено у наукових публікаціях [94]. (Агоніст)

Деякі подразники, наприклад, капсаїцин активують TRPV1 іонні канали ванілоїдного типу 1 призводячи до вивільнення нейропептидів, які ще більше підвищують чутливість нейронів, сприяючи запальному болю. N-арахідоноїлфосфатидилетаноламін (20:4-NAPE) є попередником анандаміду (AEA), який активує TRPV1 і канабіноїдні рецептори CB1 [84]. У незапальних умовах анандамід через CB1-рецептори гальмує передачу сигналів у спинному мозку, що може мати протибольовий ефект. При запаленні цей механізм змінюється: головну роль у гальмуванні передачі сигналів починає відігравати TRPV1-рецептор [56].

1.2.6 $\alpha 1$ А-адренорецептори і фосфодіестераза 4

$\alpha 1$ -адренергічні рецептори відносяться до G-білкоспряжених рецепторів, які регулюють нейротрансмісію, взаємодіючи з нейротрансмітером норепінефрином та нейрогормоном епінефрином. Підтипи $\alpha 1$ -адренергічних рецепторів, відомі як ($\alpha 1A$, $\alpha 1B$, $\alpha 1D$), виконують різні функції в процесах нейротрансмісії та когнітивних функціях [107]. Адренергічні рецептори відіграють значну роль у модулюванні болю за допомогою різних механізмів, що включають як центральну, так і периферичну нервову систему.

За нормальних умов симпатичний медіатор норадреналін гальмує синтез і вивільнення прозапальних цитокінів. Однак у разі пошкодження периферичних нервів і тканин відбувається стимуляція експресії підтипу $\alpha 1A$ -адренорецепторів на імунних клітинах, а можливо, й на інших клітинах ушкодженої тканини під впливом прозапальних цитокінів. У відповідь норадреналін взаємодіє з активованими $\alpha 1$ -адренорецепторами, що спричиняє підвищення секреції інтерлейкіну-6 – прозапального цитокіну. Крім того, медіатори запалення та фактор росту нервів, що виділяються з кератиноцитів та інших клітин, можуть посилювати експресію $\alpha 1$ -адренорецепторів на периферичних нервових волокнах. Унаслідок цього ноцицептивні аферентні волокна набувають підвищеної чутливості до адренергічних агентів, що сприяє розвитку запалення. Такі механізми можуть бути причетними до виникнення симпатично підтримуваного болю при постгерпетичній невралгії, шкірних невриномах, фантомному болю після ампутації та комплексному регіональному больовому синдромі [86].

Таким чином, $\alpha 1$ -адренергічні рецептори відіграють важливу роль у модуляції болю, особливо в контексті невропатичного болю. Їх регуляція після пошкодження нерва та подальша взаємодія з норадреналіном може посилити чутливість до болю, що робить їх потенційною мішенню для терапевтичного втручання.

Вільямс та колеги виявили, що здатність діазепаму інгібувати фосфодіестеразу (ФДЕ) (особливо ФДЕ4), відому мішень деяких

бензодіазепінів, опосередковує стимуляцію репортера елемента відповіді цАМФ (CRE) шляхом активації α_1 -адренергічних рецепторів [43]. Сімейство генів PDE4 представляє найбільшу кількість цАМФ-специфічних фосфодіестераз (PDE), які відіграють важливу роль у регулюванні динаміки передачі сигналів цАМФ у різних тканинах і типах клітин [45, 23]. Альтернативний сплайсинг чотирьох генів, PDE4A, PDE4B, PDE4C і PDE4D (на хромосомах 19p13.2, 1p31, 19p13.11 і 5q12), призводить до синтезу принаймні 20-25 варіантів білка. PDE4A відносно високо експресується в мозку людини, а розподіл тканин є специфічним для варіантів. Серце і тонка кишка також експресують PDE4A. Імунні клітини високо експресують PDE4, особливо ізоформи PDE4B і PDE4D [31]. Ймовірно, що інгібування PDE4 може зменшити нейропатичний біль шляхом пом'якшення експресії Cx43 у спинному розі хребта, враховуючи важливість Cx43 у регулюванні передачі сигналів цАМФ [31, 89]. Крім того, PDE4B і PDE4D відіграють певну роль у регуляції функції нейтрофілів, що робить їх важливими мішенями для фармацевтичних досліджень, спрямованих на розробку нових інгібіторів для протизапальних препаратів [71, 41]. Терапевтичний ефект інгібіторів PDE4 обумовлений їхньою здатністю пригнічувати дію багатьох природних медіаторів запалення, таких як TNF- α , IL-10 та IL-12. Вони також перешкоджають експресії та збільшенню молекул клітинної адгезії, які беруть участь в імунних відповідях [41].

Отже, больова чутливість є складною нейрофізіологічною функцією, що забезпечує виявлення, передачу та інтеграцію ноцицептивних сигналів на різних рівнях нервової системи. Первинне сприйняття ноцицептивних стимулів відбувається через спеціалізовані рецептори – ноцицептори, розташовані в периферичних тканинах. Аферентні волокна (A δ та C-типу) передають сигнали до спинного мозку, де вони модулюються в задніх рогах перед подальшою передачею до вищих структур, включаючи таламус і кору головного мозку. Різниця між ноцицептивним та невропатичним болем визначає вибір терапевтичних стратегій. Ноцицептивний біль, зумовлений

активацією ноцицепторів у відповідь на пошкодження тканин, відрізняється від невропатичного болю, спричиненого патологічною активністю соматосенсорної системи. Розуміння цих відмінностей є критично важливим для розробки нових анальгетиків.

Одним із перспективних напрямів у фармакології є створення сполук з полімодальним механізмом дії, які здатні одночасно впливати на кілька мішеней, залучених у генерацію та модуляцію больового сигналу. Такі препарати можуть комбінувати вплив на іонні канали, рецептори глутаматергічної, опіоїдної, канабіноїдної або адренергічної систем, що дозволяє покращити ефективність анальгезії та зменшити ризик розвитку побічних ефектів. Комплексний підхід до регуляції больової чутливості відкриває нові можливості для створення високоспецифічних та безпечних анальгетиків.

1.3 Анальгетичні та протизапальні засоби, їх механізми дії

Історія боротьби людини з болем тісно пов'язана з еволюцією медичних засобів і підходів до його лікування. Опіоїдні алкалоїди з опійного маку використовувалися для знеболення ще тисячі років тому, а в 1806 році Фрідріх Сертюрнер вперше отримав чисті опіоїди, що стало важливим етапом у боротьбі з болем. У 1897 році Фелікс Хоффман синтезував ацетилсаліцилову кислоту (аспірин), що поклало початок використанню нестероїдних протизапальних засобів (НПЗЗ) для лікування болю. Відкриття механізмів їх дії було відзначено Нобелівською премією в 1982 році. Подальші дослідження, зокрема теорія управління воротами Мелзака та Уолла (1965), змінили підхід до розуміння болю, описуючи роль спинного мозку в модулюванні больових сигналів. У 1976 році було ідентифіковано опіоїдні рецептори у спинному мозку, що відкрило нові можливості для терапії. В кінці 20-го століття Давид Джуліус і його команда виявили іонний канал TRPV1, який реагує на тепло, що призвело до нових відкриттів у сфері температурної чутливості [133].

Фармакологічні засоби, такі як опіоїди, і НПЗП, інгібітори циклооксигенази-2 (ЦОГ-2), часто призначаються як стандартні схеми лікування пацієнтів із хронічним болем [32].

Наразі відомо, що запальні клітини (наприклад, мастоцити, нейтрофіли та мікроглія) та їх медіатори (ТНФ- α , інтерлейкіни, простагландини) впливають на нервову систему, сенсibiliзуючи ноцицептори та знижуючи больовий поріг. Це збільшує чутливість до шкідливих стимулів і навіть до безболісних, таких як лоскотання. Хронічне запалення змінює нервову пластичність, сприяючи розвитку хронічного болю [123]. Зокрема, гостра активація нейтрофілів допомагає зменшити біль, але передчасне використання НПЗП для пригнічення запалення може подовжити больові відчуття, в той час як тривале проникнення нейтрофілів підсилює болісні реакції [115].

1.4 Загальна характеристика пропоксазепаму

Бензодіазепіни (БДЗ) – це група синтетичних гетероциклічних сполук, що займає важливе місце в психофармакології завдяки своєму широкому спектру фармакологічної активності. Ці препарати мають седативні, анксиолітичні та протисудомні ефекти, спричинені посиленням гамма-аміномасляної кислоти (ГАМК)-ергічної нейротрансмісії. Вони діють через зв'язування з специфічними ділянками на рецепторі ГАМК, що модуляторно впливає на його функціонування та активність [55, 76]. Від моменту впровадження бензодіазепінів у клінічну практику дослідники зацікавилися їхнім потенційним використанням для знеболення. Як і багато інших препаратів, спочатку розроблених для інших показань, бензодіазепіни мають недостатньо вивчену анальгетичну активність.

Одним із важливих факторів нейропластичних змін, що супроводжують запальні та нейропатичні процеси, є ослаблення гальмівного впливу гліцинергічної та ГАМК-ергічної систем на нейрони дорсального рогу спинного мозку [148]. Бензодіазепіни, зокрема діазепам, здатні оборотно

посилювати синаптичне гальмування, активуючи ГАМК-А-рецептори, що було підтверджено в експериментальних дослідженнях на тваринах [148, 55]

У Фізико-хімічного інституту ім. О. В. Богатського НАН України було синтезовано та проведено скринінг серії 3-заміщених 1,2-дигідро-3Н-1,4-бензодіазепін-2-онів (похідних 3-арилідену, 3-алкокси, 3-ацилокси та 3-ариламіну). На основі різноманітних моделей анальгетичної та протизапальної активності були виявлені певні залежності структура-активність, що дозволило закласти наукову базу для розробки нового ефективного та безпечного знеболювального препарату. Найбільш перспективною стала сполука 7-бром-3-пропокси-5-(2-хлорфеніл)-1,3-дигідробензо[е][1,4]діазепін-2-он, яка отримала назву «сполука 007», а її хімічна структура визначена як пропоксазепам [1].

«Пропоксазепам» відрізняється унікальним фармакодинамічним профілем, оскільки він одночасно пригнічує як гострий, так і хронічний біль, а також має протизапальні та протисудомні властивості [121]. Основною мішенню для його знеболювальної дії є $\alpha 2$ та $\alpha 3$ субодиниці ГАМК-рецепторів [1].

Попередніми дослідженнями встановлено протизапальну та знеболювальну дію пропоксазепаму та описано його порівняння з діазепамом у різних експериментальних моделях болю. Отримані дані свідчать про те, що пропоксазепам виявляє дозозалежну протизапальну та знеболюючу дію шляхом модуляції рецепторів ГАМК-А та взаємодії з рецепторами брадикініну. У тесті на індукований карагенаном набряк лапи пропоксазепам у дозі 10 мг/кг показав найвищу інгібіторну активність, що підтверджує дозозалежний ефект. Показано, що протизапальні властивості діазепаму пов'язані з його здатністю пригнічувати прозапальні цитокіни (TNF- α , IL-1, IL-6). Вважається, що пропоксазепам, структурно подібний до діазепаму, діє через ті самі механізми [55].

У формаліновому тесті пропоксазепам ефективно знижував больову чутливість як у нейрогенній (ранній), так і в запальній (пізній) фазах,

порівнянно з диклофенаком натрію. На моделі болю, викликаному формаліном, впливає рецептор TRPA1, який бере участь у запальному болю. Окрім того, дослідження показало, що пропоксазепам зменшує спричинену брадикініном гіпералгезію шляхом взаємодії з рецепторами брадикініну В. Подальші докази підтверджують цю взаємодію, оскільки пропоксазепам інгібував спричинені брадикініном скорочення гладкої мускулатури тканини шлунка щурів, подібно до відомого антагоніста рецептора В2. Пропоксазепам демонстрував значну знеболюючу дію на різних моделях болю, включно з тестом помаху хвостом, індукованою стрептозотоцином діабетичною нейропатією та пошкодженням сідничного нерва. Порівняно з кеторолаком і габапентином пропоксазепам продемонстрував сильніший анальгетичний ефект, особливо при хронічних больових станах. Флумазеніл, антагоніст рецептора ГАМК-А, частково скасовував знеболювальну дію пропоксазепаму в низьких дозах, що свідчить про участь рецептора ГАМК-А [55]. Дослідження надає переконливі докази того, що пропоксазепам має знеболюючу та протизапальну дію завдяки взаємодії з рецепторами ГАМК-А та брадикініну В. Його ефективність у зменшенні болю та запалення в різних моделях свідчить про його потенціал як терапевтичного засобу як для гострих, так і для хронічних больових станів.

Доклінічні дослідження фармакокінетики пропоксазепаму демонструють, що ця сполука швидко всмоктується зі шлунково-кишкового тракту, досягаючи рівня всмоктування приблизно 85 %. Тонка кишка визначається як неспецифічне «вікно всмоктування». Сполука демонструє рівномірний розподіл у внутрішніх органах і тканинах із дозозалежним лінійним процесом перенесення. Метаболічна трансформація пропоксазепаму відбувається як за класичними шляхами (гідроксилювання та метилювання), так і за елімінацією алкоксирадикала з утворенням 3-гідроксипохідної. У мишей в процесі метаболізму пропоксазепаму виробляється кілька ключових метаболітів, включаючи гідроксильовані, окислені та метоксиловані похідні. Виведення пропоксазепаму є відносно

подовженим із загальною константою виведення $0,019 \pm 0,05 \text{ год}^{-1}$. Метаболіти переважно виводяться із сечею (приблизно 67,5 % введеної дози), тоді як до однієї третини виводиться з калом внаслідок неповного всмоктування та кишково-печінкової циркуляції [114].

У дослідженні гострої токсичності не спостерігалось смертності чи значних змін маси тіла чи відносної маси органів у мишей і щурів, які отримували лікування. Пропоксазепам не викликав генних мутацій у аналізі на мікропланшеті (набір Muta-ChromoPlate) з використанням штамів *Salmonella typhimurium* TA 98 і TA 100. Система метаболічної активації також не виявила жодного ефекту, що вказує на те, що пропоксазепам не є ні прямим, ні непрямим мутагеном у цих штаммах *Ames* [137].

Пропоксазепам пройшов першу фазу клінічних досліджень. Після одноразового перорального введення у дозі 5 мг пропоксазепам продемонстрував високу переносимість. Його фармакокінетичні характеристики включають швидке всмоктування, повільну елімінацію та низький рівень виведення незміненого препарату із сечею. Основним шляхом екскреції є виведення окисненого метаболіту (3-гідроксипропоксазепаму) та його глюкуроніду, які разом складають до 10,5% від введеної дози, що свідчить про інтенсивний метаболізм препарату [9, 137].

Як і габапентиноїди (похідні інгібіторного нейротрансмітера гамма-аміномасляної кислоти, ГАМК), які застосовуються в медичній практиці для лікування нейропатичного болю [90], пропоксазепам також проявляє протисудомну активність [121, 29, 108], що вважається потенційним показником його анальгетичної дії і, таким чином, пояснює наявність анальгетичного ефекту в фармакологічній активності цієї сполуки.

Нещодавні дослідження проведені в Фізико-хімічному інституті ім. О. В. Богатського НАН України були зосереджені на вивченні антиалодинічного ефекту пропоксазепаму при монойодацетат-індукованому остеоартриті (MIA) у щурів. У моделі MIA пропоксазепам у дозах 10 і 20 мг/кг значно зменшував больову поведінку, хоча його ефективність поступалася морфіну.

Попри це, пропоксазепам розглядається як перспективний анальгетик, оскільки може забезпечити знеболення з меншою ймовірністю розвитку побічних ефектів, характерних для опіоїдів [14].

Отже, отримані результати відкривають можливості для подальшого дослідження механізмів дії цієї сполуки з метою розширення її терапевтичного застосування.

Полімодальний спектр знеболювальної дії пропоксазепаму не тільки надає йому унікальних властивостей як анальгетичного засобу, але й дозволяє запропонувати декілька головних точок його впливу. Детальні дослідження механізму його дії мають ґрунтуватись на теоретичних даних про вплив на певні фармакологічні мішені, можливість модуляції їх функцій та оцінку впливу на молекулярному рівні. Ці дані є важливими для планування та дизайну таких досліджень та можуть бути отримані за допомогою різних методів комп'ютерного моделювання.

1.5 *In silico* аналіз у фармакологічних дослідженнях

Сьогодні методи комп'ютерного молекулярного моделювання є важливим елементом як фундаментальних досліджень, спрямованих на вивчення молекулярних механізмів роботи білків, так і прикладних проєктів. Один із таких методів – молекулярний докінг – має на меті визначення найбільш імовірної орієнтації та конформації ліганду в активному центрі білка-мішені. Цей підхід дозволяє прогнозувати просторову структуру комплексу «рецептор-ліганд» і оцінювати вільну енергію його утворення, використовуючи дані про тривимірну структуру рецептора. Завдяки цьому визначаються ключові амінокислотні залишки активного центру білка, що дозволяє досліджувати структурно-динамічні особливості формування комплексу «білок-ліганд» на атомарному рівні, а також сприяє раціональному дизайну лігандів і/або рецепторів із заданими селективністю та кінетичними характеристиками [111].

Для методів молекулярного докінгу доступно кілька комерційних і безкоштовних обчислювальних інструментів і алгоритмів [103]. AutoDock Vina, Glide і AutoDock Gold були визнані найкращими програмами для аналізу докінку [103, 88, 60].

Щоб отримати динамічне уявлення про біологічні мішені та ліганд зв'язування, необхідно використовувати додаткові інструменти. Молекулярна динаміка це метод *in silico*, що може використовувати структурні дані, отримані експериментально, для оцінки можливих конформацій молекулярних систем. Загальна стабільність комплексу контролюється шляхом вимірювання середньоквадратичних відхилень (RMSD) від еталонної конфігурації та атомно-позиційні середньоквадратичні флуктуації (RMSF). Доступні й інші методи, такі як лінійна енергія взаємодії (LIE) і використання обох розрахунків молекулярної механіки (MM), а також континуальних моделей сольватації, таких як площа поверхні Пуассона–Больцмана (PBSA) і узагальнена площа поверхні Борна (GBSA). Методи MM/GBSA дозволяють прямо обчислити вільну енергію зв'язку (ΔG_{bind}) [1].

Експериментальні фармакологічні дослідження на тваринах стикаються з низкою проблем, зокрема етичними питаннями та відсутністю достатнього обґрунтування їх застосування, особливо коли доступні альтернативні методи. Враховуючи це, у даному дослідженні використовували методи *in vitro* дослідження денатурації білка та *in silico* методи дослідження механізмів реалізації анальгетичного та протизапального ефектів алкоксіпохідних 1,4-бензодіазепіну. Наразі відомо, що пропоксазепам одночасно гальмує і гострий, і хронічний біль, має протизапальну та антиконвульсантну дію. Він діє як агоніст бензодіазепінових рецепторів, посилюючи гальмівну дію ГАМК (γ -аміномасляної кислоти) у центральній нервовій системі. Ця робота зосереджена на уточненні механізмів протизапальної, анальгетичної дії пропоксазепаму шляхом встановлення можливого інгібування теплової денатурації БСА, дослідження взаємодії з циклооксигеназами та рецепторами брадикініну, взаємодії з

потенціалозалежними калієвими каналами, з NMDA-рецептором, впливу на $\alpha 1$ -адренорецептором шляхом зв'язування з фосфодіестеразою 4, взаємодії з рецепторами TRPV1 та канабіноїдними рецепторами.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Умови проведення експерименту

Дослідження проводились на базі Фізико-хімічний інституту ім. О.В. Богатського НАН України, Одеса. Для проведення дослідження *in silico* використовували наступне програмне забезпечення відкритого доступу або пробні версії комерційних програм: iGEMDOCK v2.1 [36, 147], AutoDock [63], AutoDock Vina [20], Schrödinger Maestro Glide [52], PlayMolecule [112]. Використання кількох програм молекулярного докінгу дозволяє отримати більш надійні та узагальнені результати, оскільки різні алгоритми можуть мати варіації в оцінці зв'язування лігандів. Це допомагає зменшити методологічні упередження та забезпечує більш точний аналіз взаємодії лігандів із білками.

Структури білків були завантажені з відкритої бази даних RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>) [138]. Підготовка білків до проведення молекулярного докінгу відбувалась з використанням програмного забезпечення Molecular Graphics Laboratory (MGL) [63]. 3D структури досліджених лігандів були отримані з відкритої бази даних PubChem у форматі .sdf. [24]. Для оптимізації структур лігандів використовувалось програмне забезпечення Avogadro (v1.2.0) [116].

2.2. Методика біоаналізу денатурації білка *in vitro*

З метою визначення протиденатураційних властивостей пропоксазепаму використовували бичачий сироватковий альбумін (БСА) виробництва “Sigma-Aldrich” (США), який розчиняли у тріс-ацетатному буфері (0,01 М, рН 7,6) до кінцевої концентрації 4 %. Об'єктами дослідження були оксазепам, діазепам, пропоксазепам і його метаболіт (3-гідроксипохідне). Ібупрофен застосовували як позитивний контроль і референтну сполуку. Тест-зразки готували з вихідних метанольних розчинів сполук у

концентраційному діапазоні 15–60 мМ, при цьому концентрації ібупрофену становили 1,5–20 мкМ, а похідних 1,4-бенздіазепіну – 0,6–6 мкМ.

Протективну активність сполук у моделі термічної денатурації БСА оцінювали, додаючи 40 мкл розчину досліджуваної речовини до 2 мл білкового розчину, після чого суміш інкубували при 37 °С протягом 15 хвилин, нагрівали на водяній бані до 79 °С протягом 12 хвилин, а потім охолоджували до кімнатної температури. Оптичну щільність зразків вимірювали при 660 нм, а ступінь протективної дії визначали за відповідною формулою

$$\%prot = \frac{A_{contr} - A_{exp}}{A_{contr}} * 100$$

де $\%prot$ – відсоток захисту від денатурації; A_{exp} – поглинання досліджуваного розчину; A_{contr} – поглинання контрольного розчину (розчин альбуміну з метанолом).

Значення IC_{50} , що відповідає концентрації, необхідній для пригнічення термічної денатурації БСА на 50 %, обчислювали за формулою b/k , де параметри k і b визначаються як нахил прямої та її перетин з віссю ординат у координатах: $C, \lg((\frac{\%max}{\%prot}) - 1)$.

Фізико-хімічні характеристики досліджуваних сполук, зокрема молекулярну масу, об'єм, рефракцію, парахор та поляризованість, розраховували за допомогою програми ACD/Labs 12.01 (v).

Дипольний момент та коефіцієнт розподілу при pH 7 ($\log D$) визначали із застосуванням програми Chem Axom (Marvin Sketch 21.7) (<http://www.chemaxon.com>). Отримані результати наведено як середнє значення $\pm$ стандартне відхилення.

2.3 Методика проведення молекулярного докінгу взаємодії пропоксазепаму з біологічними мішенями

Молекулярне моделювання методом докінгу виконували із застосуванням програмного пакета iGEMDOCK v2.1 [147], використовуючи

структурні дані білків, отримані з бази біологічних макромолекул (<http://www.rcsb.org/>). Досліджували взаємодію ЛСА у комплексах із діазепамом (2BXF) та ібупрофеном (2BXG), ензими циклооксигеназу-1 (комплекс із целекоксибом, 3KK6), циклооксигеназу-2 (комплекс із саліцилатом, 5F1A) та рецептор брадикініну (нативний рецептор без зв'язаного ліганду, 7EIB). Оптимізацію геометрії лігандів, зокрема діазепаму, оксазепаму, пропоксазепаму, його 3-гідроксипохідного та ібупрофену, здійснювали в програмному середовищі Avogadro (v1.2.0) [116] із застосуванням методу молекулярної механіки Merck (MMFF94, 5000 ітерацій), збереженням отриманих структур у форматі *.pdb. Молекулярні структури сполук, що аналізуються як інгібітори ЦОГ-1 і ЦОГ-2 (ацетилсаліцилат, целекоксиб, диклофенак, ібупрофен, кеторолак), а також брадикінін, похідні діамінопіримідину (сполуки I та II), 1,4-бенздіазепіну (сполука III), що є відомими антагоністами брадикінінового рецептора, а також молекула пропоксазепаму для даного дослідження, також були оптимізовані за допомогою програми Avogadro (v 1.2.0) [116] з використанням алгоритму молекулярних силових полів Merck (MMFF94, 10000 ітерацій). Результати були збережені у форматі *.pdb.

Докінг-аналіз включав розрахунок вільної енергії зв'язування та оцінку внеску різних типів молекулярних взаємодій. Для цього використовували силове поле з моделюванням 80 генерацій конформаційної рухливості лігандів (по 300 станів у кожній генерації, population size). Автоматичне визначення центру зв'язування базувалося на параметрах локалізації референтних лігандів (діазепаму або ібупрофену), при цьому його радіус розширювали до 10 Å. У випадку загальної кристалічної структури ЛСА центр зв'язування не задавали, що давало змогу оцінити потенційні взаємодії з альтернативними ділянками білкової молекули. Докінг для рецептора брадикініну, що не містив ліганда в своїй структурі, був здійснений на основі доступної поверхні цього рецептора. Візуалізацію результатів виконували за

(https://www.dxulab.org/software?utm_source=chatgpt.com) [53, 54].

2.4 Методика проведення молекулярного докінгу взаємодії пропоксазепаму з потенціалзалежними калієвими каналами

Молекулярний докінг був здійснений за допомогою програми AutoDockTools-1.5.7 [63], використовуючи молекулярні структури 7PHK (напругозалежний калієвий канал людини Kv3.1 у димерній формі з цинком) та 7CR2 (KCNQ2 людини в комплексі з ретигабіном), що отримані з бази даних RCSB PDB (<http://www.rcsb.org/>) [138]. Через чотирикратну симетрію рецептора KCNQ2 було визначено чотири потенційні сайти зв'язування, з яких один був обраний для детального вивчення механізму взаємодії досліджуваних лігандів. У ході експерименту ретигабін був видалений із сайту зв'язування в структурі 7CR2, після чого проводили докінг ретигабіну, флупіртину, 4-амінопіридину, пропоксазепаму та оксазепаму з цим сайтом. Центр зв'язування був визначений за допомогою параметрів локалізації референтного ліганду (ретигабіну) з радіусом 10 Å. Також для докінгу використовували структуру 7PHK (напругозалежний калієвий канал Kv3.1), сайт зв'язування якої знаходиться в трансмембранній області, поблизу пори, що було враховано під час налаштування параметрів «grid». Процес докінгу, включаючи оцінку вільної енергії зв'язування, внеску окремих типів взаємодій і середньої енергії зв'язку, був проведений на основі силового поля з 80 генераціями гнучких конформацій лігандів (аналіз 300 станів у кожній генерації, population size). Візуалізація результатів докінгу була виконана за допомогою програм LigPlot+ [82], DiscoveryStudio2021 [26], PyMOL (<https://www.pymol.org/>) і онлайн-ресурсу ezCADD (https://www.dxulab.org/software?utm_source=chatgpt.com) [53, 54].

2.5 Методика проведення досліджень взаємодії пропоксазепаму з NMDA рецептором, $\alpha 1$ -адренорецептором, фосфодіестеразою 4, TRPV1 та канадбіноїдним рецептором *in silico*

Для вивчення молекулярних механізмів зв'язування пропоксазепаму з NMDA рецептором, у якості референтних сполук були обрані кетамін, кінуренова кислота, N-метил-D-аспартат. Для вивчення впливу досліджуваних лігандів на NMDA-рецептор використовували структуру людського GluN1-GluN2A NMDA-рецептора в комплексі з S-кетаміном, гліцином і глутаматом (7EU7) з бази RCSB PDB (<http://www.rcsb.org>) [138].

Для вивчення енергії зв'язування рецептора TRPV1 з досліджуваними сполуками було використано кріо-ЕМ структуру 8GFA – людського TRPV1 у комплексі з анальгетичним препаратом SB-366791 з RCSB PDB (<http://www.rcsb.org/>) [138].

Процедуру молекулярного докінгу пропоксазепаму з $\alpha 1$ -адренорецептором проводили з використанням структур, отриманих кріо-електронною мікроскопією (кріо-ЕМ) з RCSB PDB (<http://www.rcsb.org/>) [138]: 7YM8, 7YMH, 8THL. Референтними лігандами у дослідженні взаємодії похідних 1,4-бензодіазепіну виступали норадреналін (7YMH), адреналін (8THL), оксиметазолін (7YM8).

У процесі дослідження молекулярних механізмів взаємодії пропоксазепаму з фосфодіестерази 4 (PDE4) використовували 6 кристалічних структур фосфодіестерази 4 (PDE4) з RCSB PDB (<http://www.rcsb.org>) [138]: 2 PDE4A (3I8V, 3TVX), 2 PDE4B (4KP6, 3W5E), 2 PDE4D (6IM6, 2FM0). Еталонними лігандами були 0MO (3I8V), пентоксифілін PNX (3TVX), 1S1 (4KP6), NVW (3W5E), AH3 (6IM6), M98 (2FM0).

У дослідженні молекулярного докінгу пропоксазепаму з TRPV1 рецептором, $\alpha 1$ -адренорецептором та фосфодіестерази 4 для порівняння складових взаємодії були використані інші похідні 1,4-бензодіазепіну, а саме метаболіт пропоксазепаму 3-гідроксипропоксазепам, оксазепам та діазепам.

У випадку канабіноїдного рецептора 1 аналіз *in silico* його взаємодії з пропоксазепамом проводили з використанням 4 кристалічних структур канабіноїдного рецептора 1 з банку даних білків RCSB PDB (<http://www.rcsb.org>): 5TGZ, 8GHV, 5XRA, 5XR8. Під час дослідження було забезпечено докінг пропоксазепаму, діазепаму, оксазепаму та еталонних лігандів 5TGZ (ZDG), 8GHV (ZI5), 5XRA(8D3), 5XR8 (8D0) з CB1R.

Процес молекулярного докінгу пропоксазепаму з NMDA рецептором, $\alpha 1$ -адренорецептором, фосфодіестеразою 4, TRPV1, та канабіноїдним рецептором здійснювався за допомогою програмного забезпечення Schrödinger Maestro (пробна версія) [52].

Для підготовки структури лігандів перед молекулярним докінгом використовувався модуль LigPrep програмного пакета Schrödinger. Ліганди були оптимізовані за допомогою силового поля OPLS 2005, при цьому діапазон рН для генерації таутомерів та протонних форм був 7,4. Підготовка білків здійснювалась за допомогою інструменту Protein Preparation з Schrödinger Suite, де були додані атоми водню та оптимізовані водневі зв'язки при рН 7,4. Для оцінки взаємодії між білком та лігандом було враховано якість геометричних контактів і їх енергію.

Для ранжування лігандів за їх G-показниками було використано таку формулу: $G\text{-показник} = (0,05 * vdW) + (0,15 * Coul) + Lipo + Hbond + Metal + Rewards + RotB + Site$ (1), де: *vdW* – енергія Ван-дер-Ваальса, *Coul* – кулонівська енергія, *Lipo* – ліпофільність, *Rewards* – сприятливі гідрофобні взаємодії, *Hbond* – водневі зв'язки, *Metal* – зв'язування металу, *RotB* – вплив заморожування обертових зв'язків, *Site* – полярні взаємодії в активному центрі. Вільні енергії зв'язку (MM-GBSA) комплексів визначали за допомогою модуля Prime в наборі Schrödinger. Енергію зв'язку визначають за формулою: $\Delta G_{bind} = E_{complex(minimized)} - E_{ligand(minimized)} - E_{receptor(minimized)}$ [49, 52]. Візуалізацію результатів докінгу проводили за допомогою Schrödinger Maestro [50], DiscoveryStudio2021 (BIOVIA, Dassault

Systèmes. Discovery Study), PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 3.0 Schrödinger, LLC).

Для порівняння результатів молекулярного докінгу здійсненим Schrödinger Maestro докінг проводився також за допомогою програмного забезпечення AutoDockVina [20]. Структури лігандів надано у форматі *.pdb* та оптимізовано в програмі Avogadro (версія 1.2.0) [116] за внутрішньою енергією за допомогою алгоритму молекулярного силового поля Merck (MMFF94), з урахуванням протонування при фізіологічному pH 7,4. Структури білка були оптимізовані за допомогою інструментів AutoDock 1.5.7 [63]. Для оптимізації білка були додані полярні водні, заряди Колмана та отримана структура формату *pdbqt*. Афінність зв'язування визначалась за найнегативнішою оцінкою Autodock Vina.

2.5.1 Методика QSAR-прогнозування активності пропоксазепаму до TRPV1 рецептору

QSAR-аналіз для прогнозування властивостей пропоксазепаму по відношенню до TRPV1 рецептору проводили з пропоксазепамом, його можливим метаболітом 3-гідроксипропоксазепамом, діазепамом, оксазепамом та референтними сполуками SB-366791, RTX, капсазепіном, капсаїцином. QSAR прогноз проводили за допомогою автоматизованої панелі QSAR Maestro Schrödinger Suite (<https://www.schrodinger.com/life-science/>). Для побудови моделі QSAR використовувалися 408 порівнянних між собою антагоністів TRPV1. Список цих речовин узято з додаткових матеріалів статті дослідницької групи Pharmacoinformatics Research Group під керівництвом проф. доктора Герхарда Ф. Еккера, відділ фармацевтичних наук Віденського університету фармацевтичної хімії. Набір даних мав діапазон IC_{50} від 0,4 до 17490 нМ. У цьому типі аналізу активність капсазепіну становить 100 нМ. Це значення було використано як порогове значення для класифікації сполук на активні та неактивні щодо їх здатності

блокувати рецептор після активації капсаїцину. У результаті було отримано набір даних із 201 активної сполуки та 207 неактивних сполук [143].

2.5.2 Методика дослідження молекулярної динаміки комплексу пропоксазепаму з фосфодіестеразою 4

Для детальнішого дослідження стійкості комплексу пропоксазепам-фосфодіестераза 4 було проведено дослідження його молекулярної динаміки. Досліджуваними комплексами виступали ліганди (пропоксазепам, його метаболіт 3-гідроксипропоксазепам та референтні ліганди) з структурами фосфодіестерази 4 (3TVX, 3W5E, 6IM6). Молекулярно-динамічне моделювання структур ліганд – білок було виконано за допомогою програмного забезпечення PlayMolecule (<https://open.playmolecule.org/landing>). Ліганди готували за допомогою силового поля GAFF2 і функції параметризації. Ми використовували інструменти ProteinPrepare для приготування білка [26] та SystemBuilder для побудови системи для моделювання (pH=7,4, силове поле жовте) [63, 112]. SimpleRun використовували для проведення молекулярної-динаміки з часом виконання 6 нс [63].

РОЗДІЛ 3

МЕХАНІЗМИ ПРОТИЗАПАЛЬНОЇ ДІЇ ТА ОСОБЛИВОСТІ ЗВ'ЯЗУВАННЯ ПРОПОКСАЗЕПАМУ ТА РЯДУ ПОХІДНИХ 1,4- БЕНЗОДІАЗЕПІНУ З СИРОВАТКОВИМ АЛЬБУМІНОМ

3.1 Інгібування термічної денатурації бичачого сироваткового альбуміну пропоксазепамом та його фармакологічні ефекти

Перший етап роботи був спрямований на дослідження протизапальної активності пропоксазепаму та деяких похідних 1,4-бензодіазепіну *in vitro* шляхом аналізу їхнього захисного впливу на стабільність сироваткового альбуміну за умов термічної денатурації. Насамперед треба було детальніше вивчити механізм дії пропоксазепаму та його фізико-хімічні параметри, щоб дослідити можливий вплив на стабільність сироваткового альбуміну.

На рисунках 3.1., 3.2. наведено результати аналізу протективної дії похідних 1,4-бензодіазепіну та референтної сполуки ібупрофену.

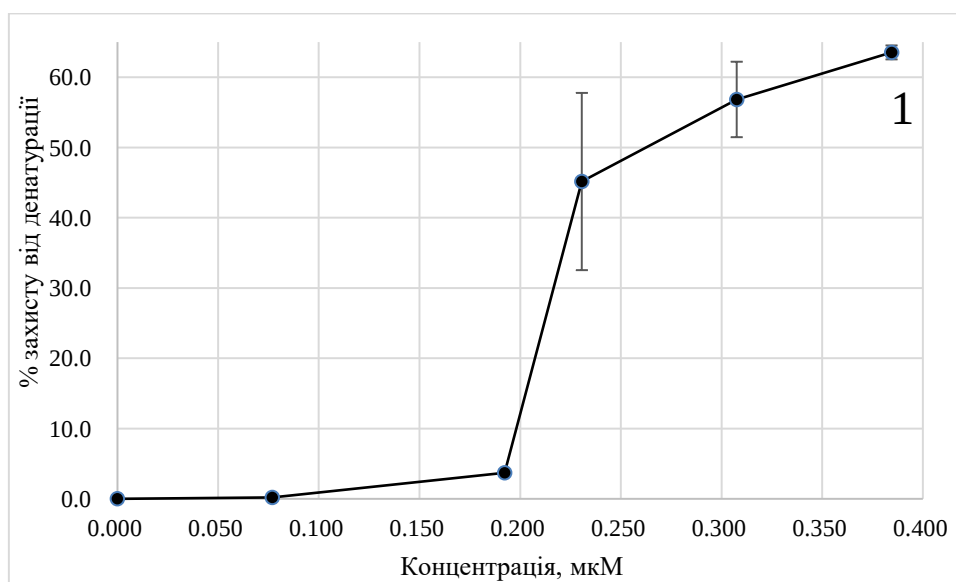


Рис. 3.1. Концентраційна залежність захисного ефекту ібупрофену (1) проти термічної денатурації БСА

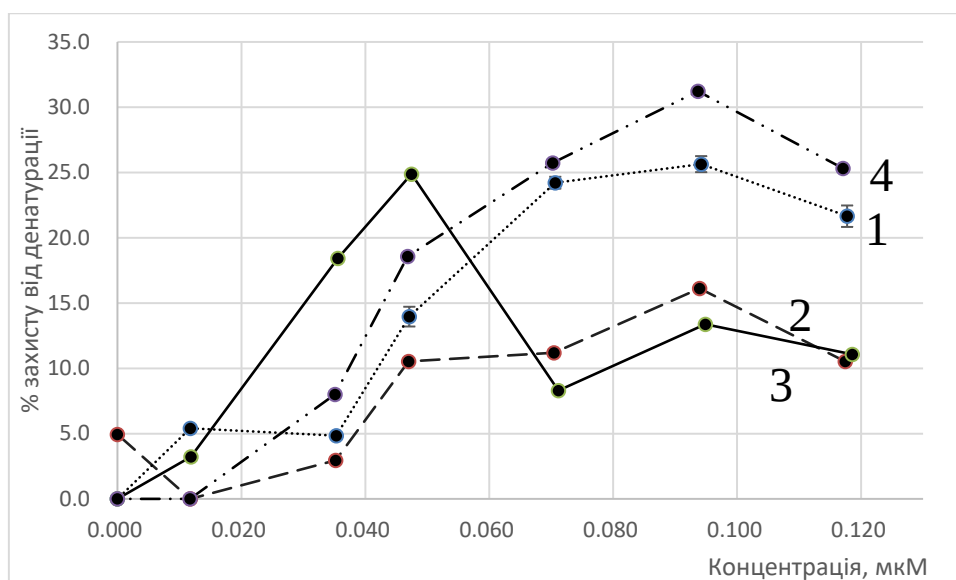


Рис. 3.2. Концентраційна залежність захисного ефекту пропоксазепаму (1), 3-гідроксипропоксазепаму (2), оксазепаму (3) та діазепаму (4) проти термічної денатурації БСА

Із наведених даних видно, що всі досліджені сполуки продемонстрували дозозалежний вплив. Криві залежності “концентрація сполук – відсоток захисту” мають сигмоїдну форму. Для похідних 1,4-бензодіазепіну (рис. 3.2.), на відміну від ібупрофену (рис. 3.1.), зі збільшенням концентрації, яка забезпечує максимальний ефект, не досягається стабільний рівень протективної дії. Навпаки, спостерігається певне зниження захисного ефекту. Значення IC_{50} захисного впливу на теплову денатурацію альбуміну є найвищим у ібупрофену (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Показники IC_{50} 1,4-бенздіазепіну та ібупрофену щодо гальмування термічної денатурації БСА

Сполука	IC_{50} , мкМ	Максимальний захисний ефект, %max
Діазепам	0,077	31,22
Оксазепам	0,117	24,88
3-гідроксипропоксазепам	0,107	11,18
Пропоксазепам	0,077	25,64
Ібупрофен	0,134	59,57

Водночас похідні 1,4-бензодіазепіну демонструють більш виражений вплив, оскільки мають нижчі значення IC_{50} . Проте максимальний рівень захисного ефекту ібупрофену (59,57%) значно перевищує відповідний показник для похідних 1,4-бензодіазепіну, серед яких найбільш ефективним є діазепам (31,22%).

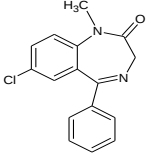
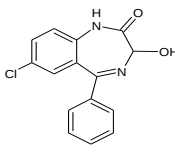
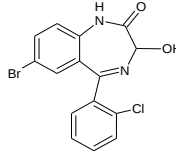
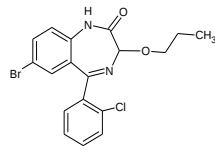
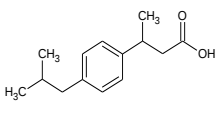
Для визначення фізико-хімічних характеристик сполук, які впливають на стабілізацію структури альбуміну під час термічної денатурації, були розраховані такі параметри: молекулярна маса, молекулярний об'єм, молекулярна рефракція, паракор, поляризованість, дипольний момент і коефіцієнт розподілу при pH 7,4 ($\log D$) (табл. 3.2). Ці показники обрані, виходячи з гіпотези, що зв'язування та стабілізація структури протейну залежать від таких факторів, як розміри молекули, здатність до поляризації та утворення міжмолекулярних зв'язків. Крім того, було враховано показник ліпофільності за фізіологічних умов (pH 7,4), оскільки гідрофобні взаємодії відіграють ключову роль у формуванні зв'язків між сироватковим альбуміном і неспецифічними лігандами [4].

Рівень та міцність зв'язування сполук із БСА, а також їхній протективний ефект залежать від структури та фізико-хімічних характеристик молекул. Хоча місця зв'язування на молекулі сироваткового альбуміну розташовані на її поверхні, молекулярний об'єм залишається важливим параметром, який впливає на можливість взаємодії досліджуваних сполук з БСА. Молекулярна маса сполук, що досліджували значно варіюється, навіть серед похідних 1,4-бензодіазепіну, що зумовлено різноманітністю радикалів у складі молекул. Зокрема, атом броду в положенні 7 (пропоксазепам і його метаболіт) має значно більші розміри порівняно з атомом хлору (діазепам і оксазепам). Це впливає не лише на молекулярний об'єм, але й на значення паракору, який відображає молекулярний об'єм сполуки за умов рівноважного поверхневого натягу. Найвищі показники молекулярного об'єму та паракору спостерігаються у пропоксазепаму та 3-гідроксипропоксазепаму, що підтверджує значний

внесок атома бром у загальний молекулярний об'єм. Водночас, ібупрофен, хоч і має найменші значення молекулярного об'єму та паракору, демонструє наявність об'ємного ізобутилового радикалу в положенні 4, як і рухомий пропілоксирадикал пропоксазепаму (табл. 3.2) [4].

Таблиця 3.2

Фізико-хімічні параметри досліджуваних сполук

Показник	Діазепам 	Оксазепам 	3-гідрокси-пропокса-зепам 	Пропокса-зепам 	Ібупрофен 
1	2	3	4	5	6
Молекулярна маса, г/моль	284,74	286,71	365,61	407,69	220,31
Молекулярний об'єм, см ³ /моль	225,8 ± 7,0	201,8 ± 7,0	214,4 ± 7,0	270,9 ± 7,0	216,8 ± 3,0
Парахор, см ³	588,6 ± 8,0	548,8 ± 8,0	592,3 ± 8,0	714,1 ± 8,0	537,4 ± 4,0
Молекулярна рефракція, см ³ /моль	80,9 ± 0,5	76,43 ± 0,5	83,99 ± 0,5	98,17 ± 0,5	65,40 ± 0,3
Поляризованість, 10 ⁻²⁴ , см	32,07 ± 0,5	30,30 ± 0,5	33,29 ± 0,5	38,91 ± 0,5	25,93 ± 0,5
Коефіцієнт розподілу, logD (pH 7,4)	3,08	2,92	3,69	5,21	1,27

Транспортна функція сироваткового альбуміну спрямована на зв'язування переважно ліпофільних сполук, оскільки гідрофільні речовини легше виводяться з організму. Таким чином, сполуки з високою ліпофільністю зазвичай мають сильніший зв'язок з альбуміном і здатність стабілізувати його під час термічної денатурації [118]. Це підтверджується

значеннями IC_{50} (табл. 3.1), де більш ліпофільні діазепам і пропоксазепам демонструють вищі протективні властивості (табл. 3.2). Максимальний захисний ефект ібупрофену зумовлений його взаємодією з іншими ділянками зв'язування, відмінними від тих, що характерні для бензодіазепінів, а також особливостями взаємодії лігандів із сайтом альбуміну (табл. 3.1). У формуванні комплексу беруть участь різні типи сил, зокрема електростатичні, водневі, ван-дер-ваальсові тощо. Ібупрофен за фізіологічних умов частково іонізується ($\log D$ становить 1,27), що дозволяє йому формувати як електростатичні взаємодії через карбоксильний аніон, так і гідрофобні зв'язки завдяки π -елекtronom бензольного кільця та гідрофобним взаємодіям ізопропільного радикала. Натомість досліджувані похідні 1,4-бензодіазепіну в організмі не іонізуються, що забезпечує їх високу ліпофільність. Враховуючи, що значення IC_{50} для цих сполук значно нижчі, ніж для ібупрофену, можна припустити, що їхня взаємодія у бензодіазепіновому місці зв'язування включає не лише електростатичні зв'язки, але й інші типи взаємодій, зокрема індукційні сили, що виникають між високо поляризованими молекулами [4]. Так, похідні 1,4-бензодіазепіну характеризуються значно вищою, порівняно з ібупрофеном поляризованістю і, відповідно, молекулярною рефракцією, що є показником здатності молекули до поляризації та зміни електронної густини (табл. 3.2).

3.2 Особливості взаємодії пропоксазепаму з діазепамовим та ібупрофеновим сайтами зв'язування людського сироваткового альбуміну

Похідні 1,4-бензодіазепіну, демонструють здатність захищати БСА від термічної денатурації, що може бути зумовлено його взаємодією з конкретними сайтами зв'язування [20]. Тому наступним етапом роботи було проведення докінг-аналізу пропоксазепаму з сайтами зв'язування людського сироваткового альбуміну (ЛСА), оскільки це покращує розуміння механізмів дії препарату та розширює отримані результати *in vitro* дослідження

протизапальних властивостей похідних 1,4-бензодіазепіну. Молекула ЛСА містить кілька основних сайтів зв'язування. Окрім ділянок, які взаємодіють з катіонами та аніонами через електростатичні сили, існують також специфічні сайти, такі як індоловий, саліцилатний, білірубіновий та ібупрофеновий. Їх формування забезпечується водневими, Ван-дер-Ваальсовими та гідрофобними взаємодіями, зумовленими присутністю залишків певних амінокислот. Саме тому вивчення структури залишків амінокислот є важливим для аналізу взаємодій та прогнозування потенційних процесів конкуренції за місця зв'язування лігандів. Це має ключове значення у розробці нових лікарських засобів. На основі результатів докінг-аналізу були визначені значення загальної енергії взаємодії та її складових – Ван-дер-Ваальсових взаємодій і водневих зв'язків – для пропексазепаму, 3-гідроксипропексазепаму, оксазепаму, діазепаму та ібупрофену. Аналіз проводився для двох сайтів зв'язування ЛСА: діазепінового та ібупрофенового, з використанням відповідних референтних структур (табл. 3.3) [1].

Таблиця 3.3

Розрахована енергія взаємодії між досліджуваними структурами та людським сироватковим альбуміном у різних сайтах зв'язування

Ліганд	Енергія взаємодії залежно від місця зв'язування, ккал/моль					
	Загальна		Ван-дер-Ваальсова		Водневий	
	I	Д	I	Д	I	Д
3-Гідрокси-пропексазепам	-6,95	-9,57	-5,96	-8,3	-1,55	-1,27
Діазепам	-7,32	-9,38	-7,09	-8,89	-0,23	-0,49
Ібупрофен	-6,89	-8,05	-6,64	-7,21	-0,25	-0,84
Оксазепам	-7,51	-8,39	-7,09	-7,95	-0,41	-0,44
Пропексазепам	-7,51	-10,27	-6,05	-9,85	-0,9	-0,43

Примітка. I – сайт зв'язування з ібупрофеном, Д – сайт зв'язування з діазепамом.

Взаємодія в кожному з місць зв'язування обумовлена внеском окремих амінокислотних залишків, які визначають тип та інтенсивність взаємодії. Для

характеристики цих взаємодій були ідентифіковані залишки амінокислот, що забезпечують найбільший внесок (сумарно понад 50 %) у загальний ефект взаємодії кожної зі сполук. У діазепіновому сайті зв'язування виявлено 13 амінокислотних залишків, які забезпечують від 55 % до 65 % загальної енергії взаємодії (табл. 3.4) [1].

Таблиця 3.4

Амінокислотні залишки діазепамового сайту, які забезпечують водневі (H) та Ван-дер-Ваальсові (V) взаємодії з людським сироватковим альбуміном

Сполука	3-Гідрокси-пропоксазепам	Діазепам	Ібупрофен	Оксазепам	Пропоксазепам
1	2	3	4	5	6
Загальна енергія взаємодії	-9,57	-9,38	-8,05	-8,39	-10,27
H-CYS-392	-0,487	-0,238	-0,239	-	-0,176
H-CYS-438	-0,25	-0,25	-0,25	-	-0,25
H-SER-489	-	-	-	-0,25	-
V-PRO-384	-0,106	-0,093	-0,302	-0,404	-0,139
V-LEU-387	-0,196	-0,319	-0,297	-0,468	-0,433
V-ILE-388	-0,636	-0,655	-0,258	-0,569	-0,691
V-ASN-391	-0,856	-1,096	-0,745	-0,957	-1,021
V-PHE-403	-0,463	-0,383	-0,269	-0,091	-0,512
V-VAL-433	-0,762	-0,742	-0,52	-0,281	-0,755
V-GLY-434	-0,366	-0,519	-0,317	-0,121	-0,428
V-GLU-450	-0,388	-0,229	-0,511	-0,21	-0,205
V-LEU-453	-0,547	-0,667	-0,338	-0,679	-0,667
V-ARG-485	-0,512	-0,521	-0,423	-1,258	-0,537

Примітка. V – Ван-дер-Ваальсова взаємодія, H – водневий зв'язок.

Аналіз ібупрофенового сайту зв'язування виявив 19 амінокислотних залишків, які забезпечують від 55 % до 79 % загального внеску у взаємодію (табл. 3.5). В обох випадках основний внесок у взаємодію припадає на слабкі

Ван-дер-Ваальсові сили, тоді як частка міцніших водневих зв'язків не перевищує 15 %.

Таблиця 3.5

Амінокислотні залишки ібупрофенового сайту, які забезпечують водневі (H) та Ван-дер-Ваальсові (V) взаємодії з людським сироватковим альбуміном

Сполука	3-Гідрокси- пропоксазепам	Діазе- пам	Ібупро- фен	Оксазе- пам	Пропокса- зепам
1	2	3	4	5	6
Загальна енергія взаємодії	-6,95	-7,32	-6,89	-7,51	-7,51
H-ARG-218	-	-	-	-	-1,05
H-ASN-391	-	-0,23	-	-0,41	-
H-TYR-411	-	-	-0,25	-	-
H-ASP-451	-	-	-	-	-0,5
H-ASN-483	-0,9	-	-	-	-
V-LEU-387	-	-0,47	-0,05	-0,4	-
V-ASN-391	-	-0,59	-0,58	-0,63	-
V-PHE-403	-	-0,21	-0,49	-0,28	-
V-LEU-407	-	-0,45	-0,14	-0,41	-
V-ARG-410	-	-0,95	-0,33	-1,08	-
V-TYR-411	-	-0,64	-0,5	-0,45	-
V-LEU-430	-	-0,37	-0,75	-0,54	
V-PRO-447	-	-	-	-	-0,78
V-CYS-448	-	-	-	-	-1,1
V-ASP-451	-	-	-	-	-0,45
V-TYR-452	-	-	-	-	-0,49
V-LEU-453	-	-0,59	-0,68	-0,79	-
V-SER-480	-0,42	-	-	-	-
V-ASN-483	-0,95	-	-	-	-
V-ARG-485	—	-0,44	-0,18	-0,37	-
V-PRO-486	-0,49	-0,06	—	-0,06	-
V-CYS-487	-0,95	-0,01	—	-0,01	-
V-SER-489	—	-0,55	-0,04	-0,49	-

Примітка. V – Ван-дер-Ваальсова взаємодія, Н – водневий зв'язок.

Аналіз результатів докінгу показав, що референтні сполуки діазепам та ібупрофен взаємодіють не лише зі своїми специфічними сайтами зв'язування, але також здатні до перехресних взаємодій (рис. 3.3 в, г). Зокрема, ібупрофен у діазепіновому сайті контактує із амінокислотними залишками, які також беруть участь у зв'язуванні інших досліджуваних сполук (табл. 3.4). Водночас ібупрофеновий сайт проявляє більшу специфічність, демонструючи однакові амінокислотні залишки, що залучені у взаємодію, крім ібупрофену, переважно з діазепамом і оксазепамом (табл. 3.5).

На основі розрахованих значень загальної енергії зв'язування (табл. 3.3) референтні сполуки демонструють різні показники спорідненості до сайтів зв'язування. Хоча обидві сполуки виявляють здатність до перехресної взаємодії, діазепам значно сильніше зв'язується зі своїм специфічним сайтом, що підтверджується вищою від'ємною величиною енергії взаємодії (табл. 3.3). Ібупрофен, навпаки, має майже рівну здатність взаємодіяти з обома сайтами зв'язування ($-8,05$ ккал/моль для діазепамового сайту та $-6,89$ ккал/моль для власного), що, ймовірно, зумовлює відносно високе значення його константи дисоціації [1].

Досліджувані похідні, загалом, демонструють більшу спорідненість до діазепінового сайту зв'язування. Пропоксазепам, зокрема, характеризується найнижчим значенням енергії зв'язування ($-10,27$ ккал/моль), у порівнянні навіть для діазепаму. Цікаво, що 3-гідроксипропоксазепам має близьке до діазепаму значення енергії зв'язування ($-9,57$ ккал/моль проти $-9,38$ ккал/моль відповідно), тоді як оксазепам, структурно схожий на діазепам, демонструє дещо нижчу спорідненість ($-8,39$ ккал/моль).

Значний внесок у загальну енергію взаємодії 3-гідроксипропоксазепаму з обома сайтами зв'язування ($-1,27$ ккал/моль для діазепамового і $-1,55$ ккал/моль для ібупрофенового сайту) забезпечується не лише гідроксигрупою в положенні 3, але й наявністю атомів галогенів (броду

і хлору). Вони сприяють утворенню додаткових Ван-дер-Ваальсових зв'язків, стабілізуючи молекулу в енергетично вигідному положенні. Для порівняння, відповідні показники для оксазепаму є нижчими ($-0,44$ ккал/моль і $-0,41$ ккал/моль для діазепінового та ібупрофенового сайтів відповідно).

Водневий зв'язок має місце виключно за участю трьох амінокислотних залишків (цистеїн 392 і 438, серін 489) у діазепамовому сайті та 5 залишків у ібупрофеновому (аргінін 218, аспарагін 391 і 483, тирозин 411 та аспарагін 451). В ібупрофеновому сайті кожна зі сполук взаємодіє з окремим залишком (виключенням є аспарагін 931, з яким взаємодіють діазепам та оксазепам). Зазначене дозволяє зробити висновок, що водневий зв'язок не є основним за умов взаємодії з ібупрофеновим сайтом, а виявлені амінокислотні залишки, що утворюють водневий зв'язок, є індивідуальними для кожної сполуки. Навпаки, у діазепамовому сайті залишки цистеїну з порівняною ефективністю здатні утворювати зв'язки з усіма досліджуваними структурами, крім оксазепаму (табл. 3.4). До того ж, у діазепамовому сайті всі сполуки взаємодіють з амінокислотами за рахунок Ван-дер-Ваальсових сил, навіть аспарагін ASN-391.

Вочевидь ароматичні фрагменти досліджуваних структур орієнтуються в порожнині таким чином, що енергетично вигідним стає утворення слабких зв'язків з більшою кількістю амінокислотних залишків. Висока полярність залишку аспарагіну підтверджує зазначене (табл. 3.4). Навпаки, той самий залишок у ібупрофеновому сайті бере участь в утворенні зв'язків лише з ібупрофеном, діазепамом та оксазепамом (табл. 3.5), а енергія цих взаємодій є нижчою порівняно з аналогічними показниками діазепамового сайту (табл. 3.4).

Основний внесок у процеси зв'язування сполук вносять гідрофобні амінокислотні залишки, які формують Ван-дер-Ваальсові взаємодії в діазепамовому та ібупрофеновому місцях зв'язування. Зокрема, це залишки лейцину (LEU-387 і LEU-430), ізолейцину (ILE-388), валіну (VAL-433), фенілаланіну (PHE-403) та тирозину (TYR-411), здатні також до р-р

взаємодій з ароматичними фрагментами молекул (табл. 3.4, 3.5). Примітно, що пропоксазепам, що має високе значення вільної енергії зв'язування як у діазепамовому ($-10,27$ ккал/моль), так і в ібупрофеновому ($-7,51$ ккал/моль) місцях зв'язування, в ібупрофеновому сайті взаємодіє з більш полярними амінокислотними залишками (PRO-447, CYS-448, ASP-451, TYR-452), розташованими окремо.

Варто відзначити, що пропоксазепам відрізняється від інших бензодіазепінових сполук наявністю алкоксигрупи в положенні "3", яка є не лише гідрофобною, але й рухливою, що може ускладнювати зв'язування в ділянці молекули ЛСА, що зв'язує ібупрофен. Тому пропоксазепаму, ймовірно, вигідніше використовувати інший сайт зв'язування з енергетичної точки зору. Результати докінгу були візуалізовані через просторове розташування молекул ібупрофену та пропоксазепаму відносно молекули референтної сполуки в кожному з вибраних сайтів (рис. 3.3.) [1].

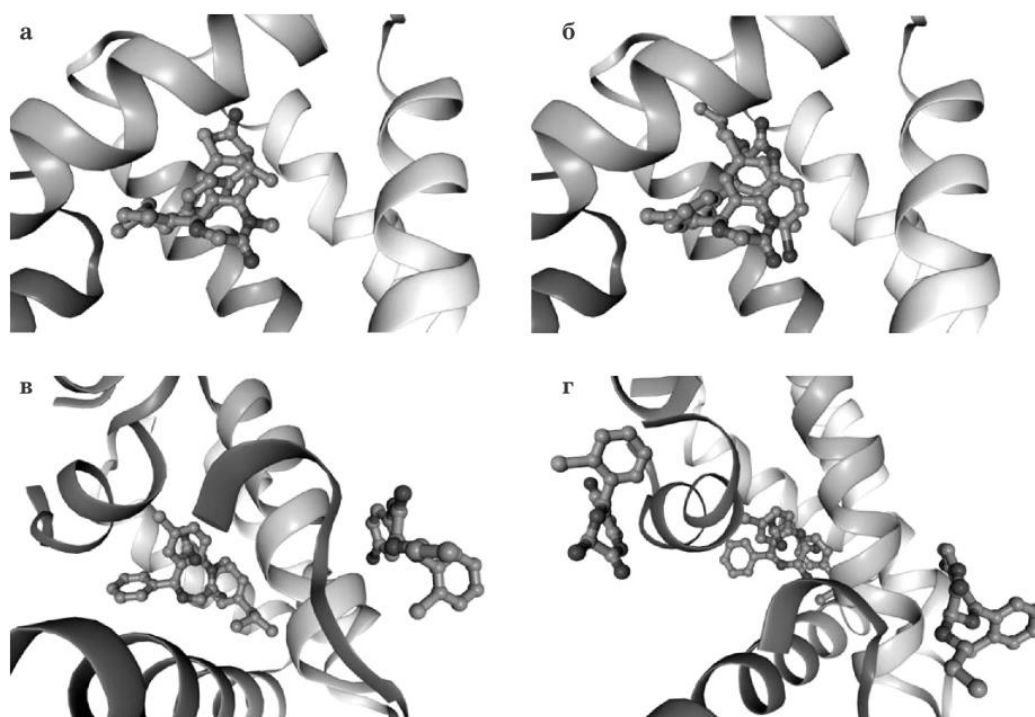


Рис. 3.3 Розташування референтних сполук діазепаму (а) та ібупрофену (в) у специфічних місцях зв'язування й відповідне положення пропоксазепаму (б, г). Додатково наведено розташування 3-гідроксипропоксазепаму в ібупрофеновому сайті (г)

Візуалізація результатів докінгу показала, що діазепам може займати як мінімум два положення, причому було вибрано таке розташування, яке відповідає положенню в кристалічному зразку комплексу ЛСА з діазепамом. Крім того, ібупрофен та діазепам розташовані в діазепамовому сайті так, що їх ароматичні фрагменти (π -електрони бензенових кілець) знаходяться в практично однаковому положенні (рис. 3.3., а). В діазепамовому сайті пропоксазепам також розташований у тій самій порожнині, але в іншому положенні, оскільки більш вигідним є розташування гнучкого алкоксильного радикала в частині порожнини, де зазвичай знаходиться атом хлору в діазепамі (рис. 3.3., б). Полярний кисень карбонільної групи гетерокільця діазепаму, в свою чергу, більш схильний до полярних взаємодій, а атом бром, що знаходиться в цьому положенні, сприяє поляризації і диполь-дипольній взаємодії. Навіть в ібупрофеновому сайті місця зв'язування ібупрофену та діазепаму розташовані в майже однаковому положенні (рис. 3.3., в), в той час як пропоксазепам, ймовірно, взаємодіє з іншим сайтом, але з тими самими амінокислотними залишками, як вказувалось (табл. 3.5). Крім того, 3-гідроксипропоксазепам, близький за структурою до пропоксазепаму, займає зовсім інше місце зв'язування на протилежній ділянці ібупрофенового сайту (рис. 3.3, г).

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Похідні 1,4-бензодіазепіну демонструють певний захисний ефект проти термічної денатурації БСА. За значеннями IC_{50} діазепам і пропоксазепам майже вдвічі перевищують референтний препарат ібупрофен, хоча поступаються йому за рівнем максимального ефекту. Сполуки, що містять вільну гідроксильну групу в положенні 3 (оксазепам і 3-гідроксипропоксазепам), проявляють менш виражену дію, що може бути пов'язано з їхньою здатністю до взаємодії з БСА. Поляризованість молекул похідних 1,4-бензодіазепіну має значний вплив на їхню взаємодію з БСА та виразність захисного ефекту, переважаючи роль ліпофільності. Це дозволяє припустити, що індукційна взає-

модія відіграє ключову роль у процесі зв'язування з сироватковим альбуміном.

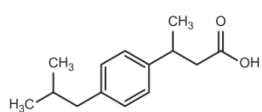
Результати молекулярного докінгу до сайтів зв'язування діазепаму та ібупрофену в ЛСА з референтними сполуками – діазепамом і ібупрофеном – свідчать про їхню перехресну спорідненість до цих ділянок. Водночас діазепам має вищу енергію взаємодії зі своїм власним сайтом (-9,38 ккал/моль) порівняно з ібупрофеновим (-7,32 ккал/моль). Серед усіх досліджуваних структур пропоксазепам демонструє найбільшу енергію зв'язування з діазепамовим сайтом (-10,27 ккал/моль), навіть перевищуючи відповідний показник для діазепаму. Його положення відрізняється тим, що взаємодія відбувається через атом бромі (в положенні «7»), тоді як діазепам утворює зв'язок за рахунок кисню карбонільної групи гетерокільця. В ібупрофеновому сайті зв'язування пропоксазепам, ймовірно, взаємодіє з іншою ділянкою, проте залучає спільні амінокислотні залишки.

РОЗДІЛ 4

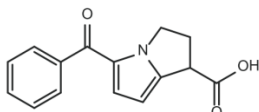
МЕХАНІЗМИ АНАЛЬГЕТИЧНОЇ ДІЇ ПОХІДНИХ 1,4-БЕНЗОДІАЗЕПІНУ

4.1 Простагландиновий і брадикініновий механізми анальгетичної та протизапальної дії пропоксазепаму

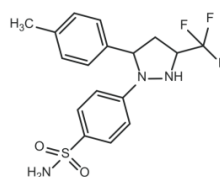
Під час скринінгових досліджень було виявлено, що пропоксазепам демонструє анальгетичний ефект у моделях карагенінового та зимозанового набряків, а також при брадикінін-індукованій альгезії [17]. На основі цього можна припустити, що, окрім інших механізмів реалізації периферичної анальгетичної дії, пропоксазепам може взаємодіяти з циклооксигеназами або рецепторами брадикініну. Для перевірки цієї гіпотези було проведено молекулярний докінг пропоксазепаму з рецептором брадикініну, а також із ЦОГ-1 і ЦОГ-2. Ці ензими мають майже однакову молекулярну масу (70 та 72 кДа відповідно) і високу схожість каталітичних сайтів. Проте важливою фармакологічною відмінністю є наявність у 523-му положенні ізолейцину в молекулі ЦОГ-1, що є більш гідрофобним, тоді як у ЦОГ-2 присутній валін. Окрім пропоксазепаму, який є об'єктом дослідження, для проведення процедури докінгу було використано низку сполук, відомих як ліганди для вибраних рецепторів або ензимів, які слугували позитивним контролем: відомі нестероїдні протизапальні препарати (ацетилсаліцилова кислота, ібупрофен, кеторолак, диклофенак), селективний блокатор ЦОГ-2 целекоксиб, похідні діамінопіримідину (сполуки I і II), 1,4-бенздіазепіну (сполука III), які є описаними антагоністами брадикінінового рецептора (рис. 4.1).



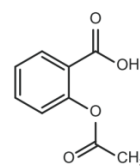
Ібупрофен



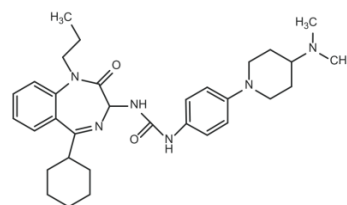
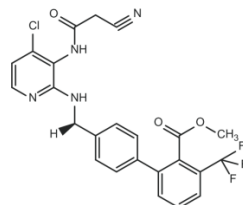
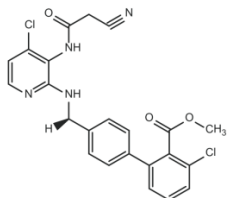
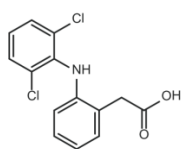
Кеторолак



Целекоксиб



Ацетилсаліцилова
кислота



Диклофенак

Сполука I

Сполука II

Сполука III

Рис. 4.1 Структури сполук, використаних у докінг аналізі з рецептором брадикініну, ЦОГ-1 і ЦОГ-2

Досліджені сполуки здебільшого характеризуються різними місцями зв'язування з рецепторами. Цікавим є той факт, що для пропоксазепаму у випадку ЦОГ-1 ідентифіковано місце зв'язування, яке розташоване на певній відстані від активного центру (рис. 4.2). У разі взаємодії з ЦОГ-2 пропоксазепам і ібупрофен зв'язуються в ділянці, що відрізняється від сайту зв'язування целекоксибу, кеторолаку й ацетилсаліцилату (рис. 4.3). Для рецептора брадикініну пропоксазепам зв'язується в ділянці, аналогічній до природного ліганду – брадикініну, тоді як додатково вивчені антагоністи виявляють спорідненість до інших ділянок зв'язування (рис. 4.4).

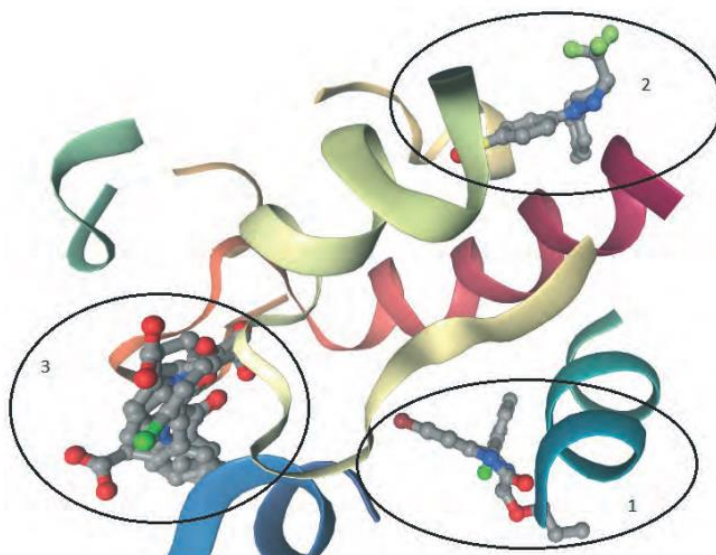


Рис. 4.2 Розташування досліджуваних сполук в активному центрі циклооксигенази-1: 1 – пропоксазепам; 2 – целекоксиб; 3 – кеторолак, ібупрофен та диклофенак.

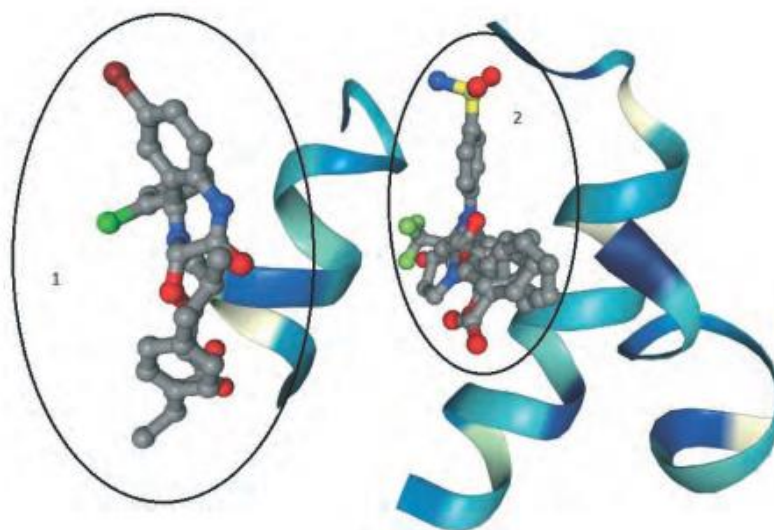


Рис. 4.3 Розташування досліджуваних сполук в активному центрі циклооксигенази-2: 1 – пропоксазепам та ібупрофен; 2 – кеторолак, целекоксиб й ацетилсаліцилат.

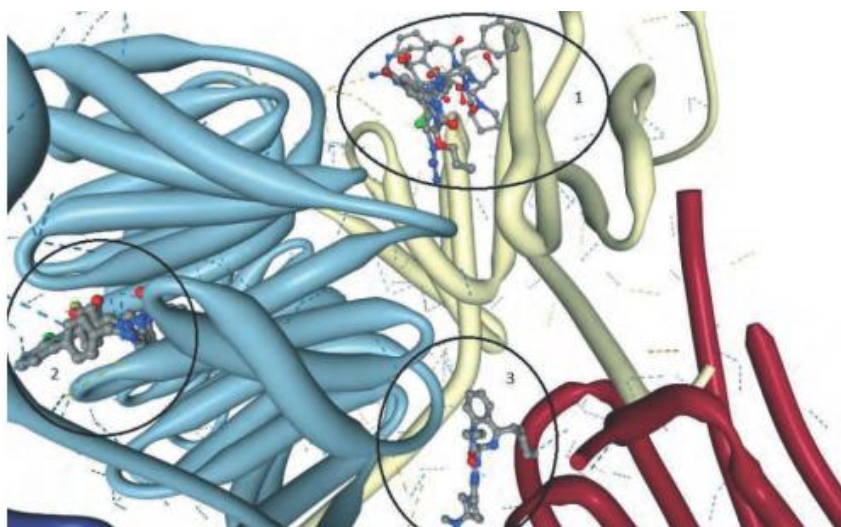


Рис. 4.4 Розташування досліджуваних сполук у рецепторі брадикініну: 1 – брадикінін та пропоксазепам; 2 – сполука I і сполука II; 3 – сполука III.

Ацетилсаліцилова кислота та ібупрофен демонструють значно нижчий афінитет порівняно з іншими сполуками за значеннями енергії взаємодії. Найвищу здатність до зв'язування із ЦОГ-1 та ЦОГ-2 виявляють целекоксиб (–9,6 та –9,5 ккал/моль, відповідно) і кеторолак (–9,6 та –8,2 ккал/моль,

відповідно) (табл. 4.1, 4.2). Варто зазначити, що пропоксазепам, за показником загальної енергії взаємодії, демонструє більшу ефективність зв'язування із ЦОГ-1 (–9,0 ккал/моль), ніж із ЦОГ-2 (–7,3 ккал/моль) (табл. 4.1, 4.2).

Таблиця 4.1

**Розрахована енергія взаємодії досліджуваних структур
з активним центром циклооксигенази-1**

Сполука	Параметр, ккал/моль				
	Загальна енергія взаємодії	Ван-дер-Ваальсова взаємодія	Водневий зв'язок	Електро-статична взаємодія	Середня енергія взаємодії
Ацетил-саліцилат	-7,7	-6,9	-0,8	-	-3,4
Целекоксиб	-9,6	-8,5	-1,1	-	-2,7
Ібупрофен	-8,1	-7,3	-0,8	-	-3,6
Кеторолак	-9,6	-9,0	-0,6	—	-3,0
Пропокса-зепам	-9,0	-9,0	—	—	-2,5
Диклофенак	-8,4	-7,7	-0,7	—	-3,0

Таблиця 4.2

**Розрахована енергія взаємодії досліджуваних структур
з активним центром циклооксигенази-2**

Сполука	Параметр, ккал/моль				
	Загальна енергія взаємодії	Ван-дер-Ваальсова взаємодія	Водневий зв'язок	Електро-статична взаємодія	Середня енергія взаємодії
Ацетил-саліцилат	-6,9	-6,3	-0,6	-	-3,2
Целекоксиб	-9,5	-8,0	-1,5	—	-3,1
Ібупрофен	-6,9	-4,9	-2,0	—	-2,3
Кеторолак	-8,2	-7,2	-0,9	-0,2	-3,1
Пропокса-зепам	-7,3	-7,1	-0,2	—	-1,9

Серед досліджених сполук лише кеторолак здатний утворювати електростатичний зв'язок в активному центрі ЦОГ-2, хоча його внесок є незначним. Загалом, слабка вандерваальсова взаємодія відіграє значну роль у зв'язуванні сполук як з ЦОГ-1 (табл. 4.1), так і з ЦОГ-2 (табл. 4.2), становлячи від 85 до 95 %. При цьому найбільший внесок інтенсивнішої водневої взаємодії спостерігається лише для целекоксибу, де він досягає 15 %. Важливо відзначити, що пропоксазепам взаємодіє виключно за рахунок слабкої вандерваальсової сили, що дає підстави вважати, що його комплекс із ЦОГ-1 або ЦОГ-2 не буде стійким. Це підтверджується тим, що середнє значення енергії зв'язку є найменшим для пропоксазепаму. У випадку селективного блокатора ЦОГ-2, целекоксибу, середня енергія зв'язку при утворенні комплексу з цим ферментом є найбільшою і становить -3,1 ккал/моль (табл. 4.2), тоді як для ЦОГ-1 вона дорівнює лише -2,7 ккал/моль (табл. 4.1). Згідно з результатами дослідження, ацетилсаліцилова кислота та кеторолак, як неселективні блокатори, мають порівняно високу середню енергію зв'язку для обох типів циклооксигенази (ЦОГ-1 і ЦОГ-2) (табл. 4.1, 4.2). Відсутність значної взаємодії пропоксазепаму з циклооксигеназами може пояснити відсутність побічних ефектів на шлунково-кишковий тракт при його тривалому застосуванні, що є типовим для інгібіторів циклооксигеназ.

Під час візуалізації місць зв'язування було виявлено кілька сайтів взаємодії, що різняться за розташуванням (рис. 4.2, 4.3). Для ЦОГ-1 кеторолак, ібупрофен та диклофенак зв'язуються в одному спільному місці, тоді як целекоксиб і пропоксазепам мають інші місця зв'язування, розташовані на певній відстані (рис. 4.2). Оскільки кеторолак, ібупрофен і диклофенак ефективно блокують активність ЦОГ-1, можна припустити, що місця зв'язування пропоксазепаму та целекоксибу є неспецифічними з функціональної точки зору. Натомість кеторолак, ібупрофен і диклофенак чинять на ЦОГ-1 безпосередню блокувальну дію.

Що стосується зв'язування з ЦОГ-2, то спільне місце зв'язування мають целекоксиб, ацетилсаліцилат і кеторолак. Ібупрофен, ефективний блокатор

ЦОГ-2, має спільне місце зв'язування з пропоксазепамом. Проте це місце знаходиться близько до першого, залучаючи до взаємодії амінокислотні залишки одного білкового домену (рис. 4.3).

Загалом, зв'язки з активними центрами ЦОГ-1 і ЦОГ-2 утворюються завдяки певним амінокислотним залишкам, що є унікальними для кожної з досліджених сполук або їх груп (табл. 4.3, 4.4). Для ЦОГ-1 було виявлено сім амінокислотних залишків, здатних утворювати водневий зв'язок або вандерваальсову взаємодію (табл. 4.3), зокрема HIS-90 та SER-516 взаємодіють з кеторолаком, ібупрофеном і ацетилсаліцилатом через водневі зв'язки. Водночас слабкіші вандерваальсові взаємодії залучають значно більшу кількість амінокислотних залишків, що є переважаючим механізмом у процесі взаємодії. У ЦОГ-2 виявлено дев'ять амінокислотних залишків, здатних до утворення водневих зв'язків (табл. 4.4), з яких лише чотири (HIS-90, LEU-352, SER-353, TYR-385) також взаємодіють через вандерваальсові сили. Як показала візуалізація взаємодій, амінокислотні залишки ЦОГ-2 утворюють класери, які зумовлюють взаємодію у двох центрах: один фіксує пропоксазепам і ібупрофен, а інший – кеторолак, целекоксиб і ацетилсаліцилат [5].

Таблиця 4.3

Роль окремих амінокислотних залишків у формуванні загальної енергії взаємодії досліджуваних сполук з активним сайтом циклооксигенази-1

Параметр	Сполука					
	Кеторолак	Целекоксиб	Пропкса- зепам	Диклофенак	Ібупрофен	Ацетил- саліцилат
1	2	3	4	5	6	7
Загальна енергія взаємодії, ккал/моль	-9,6	-9,6	-9	-8,4	-8,1	-7,8

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5	6	7
Загальна енергія взаємодії з визначеними амінокислотними залишками, ккал/моль	-7,3	-7,1	-6,9	-6,6	-5,6	-5,4
Відсоток внеску взаємодії з визначеними амінокислотними залишками в загальну взаємодію, %	76,0	74,0	76,7	78,6	69,1	69,2
*H-HIS-90	-0,4	-	-	-	-0,4	-0,4
*H-HIS-95	-	-	-	-0,4	-	-
*H-TYR-385	-	-0,6	-	-	-	-
*H-ASN-515	-	-	-	-0,4	-	-
*H-SER-516	-0,3	-	-	-	-0,4	-0,5
*H-GLY-533	-	-0,4	-	-	-	-
V-ILE-89	-	-	-1,9	-	-	-
*V-HIS-90	-0,6	-	-0,1	-0,7	-0,2	-0,5
V-PHE-91	-0,3	-	-	-0,4	-0,4	0
V-THR-94	-1,4	-	-	-1,2	-1	-1,5
*V-HIS-95	-0,7	-	-	-0,9	-0,6	-0,3
V-LEU-115	-	-	-0,6	-	-	-
V-VAL-116	-	-	-0,6	-	-	-
V-VAL-119	-	-	-2	-	-	-
V-ARG-120	-	-	-0,9	-	-	-
V-GLN-192	-0,9	-	-	-0,3	-0,2	-0,3
V-PHE-205	-	-0,9	-	-	-	-
V-PHE-209	-	-0,9	-	-	-	-
V-VAL-344	-	-0,8	-	-	-	-
V-GLY-354	-0,6	-	-	-0,3	-0,4	-0,4
V-PHE-381	-	-1,3	-	-	-	-
*V-TYR-385	-	-0,4	-	-	-	-
V-HIS-513	-0,5	-	-	-0,4	-0,6	-0,1
V-PRO-514	-0,4	-	-	-0,5	-0,3	-0,2
*V-ASN-515	-0,9	-	-	-1	-0,6	-0,8
*V-SER-516	-0,3	-	-	-0,1	-0,5	-0,4
V-GLU-524	-	-	-0,8	-	-	-
V-SER-530	-	-0,9	-	-	-	-
*V-GLY-533	-	-0,9	-	-	-	-

Примітки: V – вандерваальсова взаємодія, H – водневий зв'язок, * – амінокислоти, здатні до вандерваальсової взаємодії та утворення водневого зв'язку.

Отже, взаємодія сполук з ЦОГ-2 має більш виразний специфічний характер порівняно з ЦОГ-1, що дозволяє припустити, що взаємодія

пропоксазепаму з місцем, близьким до активного центру в ЦОГ-2, може частково впливати на активність цього ензиму.

Таблиця 4.4

Роль окремих амінокислотних залишків у формуванні загальної енергії взаємодії досліджуваних сполук з активним сайтом циклооксигенази-2

Параметр	Сполука				
	Целекоксиб	Кеторолак	Пропокса- зепам	Ацетил- саліцилат	Ібупрофен
1	2	3	4	5	6
Загальна енергія взаємодії, ккал/моль	-9,5	-8,2	-7,3	-6,9	-6,9
Загальна енергія взаємодії з визначеними амінокислотними залишками, ккал/моль	-6,3	-5,6	-4,3	-4,7	-4
Відсоток внеску взаємодії з визначеними амінокислотними залишками в загальну взаємодію, %	66,3	68,3	58,9	68,1	58,0
*H-HIS-90	-0,4	-	-	-	-
H-ARG-120	-	-0,7	-	-	-
H-VAL-344	-	-	-	-	-0,7
H-ILE-345	-	-	-	-	-0,4
H-GLU-346	-	-	-	-	-0,7
*H-LEU-352	-0,4	-	-	-	-
*H-SER-353	-0,4	-	-	-	-
*H-TYR-385	-	-	-	-0,3	-
H-SER-530	-	-0,2	-	-0,4	-
*V-HIS-90	-0,4	-	-	-	-
V-PHE-198	-	-	-0,4	-	-0,2
V-PHE-201	-	-	-0,6	-	-0,8
V-ASP-347	-	-	-1,1	-	-0,5
V-TYR-348	-	-	-0,7	-	-0,6
V-HIS-351	-	-	-1,5	-	-0,1
*V-LEU-352	-0,2	-0,6	-	-0,7	-
*V-SER-353	-1,2	0	-	-0,1	-

Продовження таблиці 4.4

1	2	3	4	5	6
V-TYR-355	-0,2	-0,5	-	-0,1	-
*V-TYR-385	-0,3	-0,4	-	-0,5	-
V-TRP-387	-0,2	-0,2	-	-0,4	-
V-PHE-518	-0,6	-0,3	-	-0,5	-
V-VAL-523	-0,8	-0,6	-	-0,5	-
V-GLY-526	-0,6	-0,7	-	-0,7	-
V-ALA-527	-0,5	-0,9	-	-0,5	-
V-LEU-531	-0,1	-0,5	-	0	-

Примітки: V – вандерваальсова взаємодія, H – водневий зв'язок, * – амінокислоти, здатні до вандерваальсової взаємодії та утворення водневого зв'язку.

Брадикінін, як ендogenousний ліганд брадикінінових рецепторів, був обраний позитивним контролем у дослідженні. Для проведення докінгу також були використані похідні діамінопіридину, позначені як сполуки I та II, які мають високу афінитетність до V1-рецептора ($K_i = 0,7$ і $0,4$ нМ відповідно) та протизапальну дію на моделі набряку, викликаного ліпополісахаридом, у кроликів, з ED_{50} ($0,80 \pm 0,06$) та ($0,57 \pm 0,04$) мг/кг. Сполука III є похідним 1,4-бенздіазепіну і також демонструє афінитет до V1-рецептора ($K_i = 28$ нМ) [79].

Серед досліджуваних сполук брадикінін, як ендogenousний ліганд, має найбільшу загальну енергію взаємодії з брадикініновими рецепторами ($-10,8$ ккал/моль) (табл. 4.5). Для похідних діамінопіридину загальна енергія взаємодії знаходиться близько до енергії брадикініну ($-10,6$ і $-10,7$ ккал/моль для сполук I та II відповідно). Лише брадикінін здатний утворювати електростатичні зв'язки, що пояснюється його пептидною природою та частковою іонізацією. Проте основна частина взаємодії брадикініну з рецептором забезпечується вандерваальсовими силами ($-7,7$ ккал/моль, 71 %) завдяки наявності фенілаланінових залишків.

**Розрахована енергія взаємодії досліджуваних структур
з рецептором брадикініну**

Сполука	Параметр, ккал/моль				
	Загальна енергія взаємодії	Ван-дер-Ваальсова взаємодія	Водневий зв'язок	Електро-статична взаємодія	Середня енергія взаємодії
Сполука I	-10,6	-7,2	-3,4	—	-2
Сполука II	-10,7	-8,3	-2,4	—	-2,1
Сполука III	-9,7	-8,4	-1,3	—	-1,4
Брадикінін	-10,8	-7,7	-2,9	-0,2	-0,9
Пропокса-зепам	-8,2	-7,6	-0,6	—	-2,3

Похідні 1,4-бенздіазепіну (сполука III та пропоксазепам) мають найменшу загальну енергію взаємодії (–9,7 і –8,2 ккал/моль відповідно), при цьому основну частину цієї взаємодії становлять вандерваальсові сили (86–92 %). Незважаючи на слабкі взаємодії, ці сполуки можуть утворювати стійкі зв'язки з рецептором, зокрема пропоксазепам демонструє найбільше значення середньої енергії зв'язку, яка складає –2,3 ккал/моль (табл. 4.5), що свідчить про його більш сталу взаємодію з рецептором.

Брадикініновий рецептор є трансмембранним протеїном з семи структурних елементів (доменів), тому під час докінгу була використана вся молекула, що дозволило визначити найбільш енергетично вигідні місця зв'язування для лігандів. Візуалізація результатів докінгу виявила кілька місць зв'язування, які відрізняються в залежності від типу ліганду (рис. 4.4). Похідні діамінопіридину (сполуки I та II) продемонстрували афінитет до окремого селективного сайту, тоді як похідні 1,4-бенздіазепіну (сполука III та пропоксазепам) мають тенденцію до зв'язування з іншими сайтами (рис. 4.4).

Неочікувано, пропоксазепам зв'язувався в тому ж місці, що й брадикінін, розташованому на віддаленому домені. Це місце зв'язування,

ймовірно, є функціональним "активним центром", що взаємодіє з природним ендogenousним лігандом, і саме за допомогою цієї взаємодії можуть проявлятися антагоністичні ефекти пропоксазепаму.

Аналіз амінокислотних залишків, які беруть участь у цій взаємодії, показав наявність щонайменше п'яти залишків (GLU-207, ARG-208, ARG-209, ASP-239 та SER-242), які також взаємодіють з брадикініном. Ці амінокислотні залишки є досить полярними, але взаємодія з пропоксазепамом виявляється більш сильною завдяки основним (аргінін) залишкам, ніж завдяки кислотні (аспарагінова кислота) (табл. 4.6). Загалом, взаємодія пропоксазепаму з цими амінокислотними залишками є більш ефективною з енергетичної точки зору порівняно з брадикініном, що вказує на можливу конкуренцію між ними [5].

Таблиця 4.6

Роль окремих амінокислотних залишків у формуванні загальної енергії взаємодії досліджуваних сполук з рецептором брадикініну

Параметр	Сполука				
	брадикінін	сполука II	сполука I	сполука III	пропоса- зепам
1	2	3	4	5	6
Загальна енергія взаємодії, ккал/моль	-10,8	-10,7	-10,6	-9,7	-8,2
Загальна енергія взаємодії з визначеними амінокислотними залишками, ккал/моль	-6,1	-6,2	-6,5	-7,0	-3,7
Відсоток внеску взаємодії з визначеними амінокислотними залишками в загальну взаємодію, %	56,5	57,9	61,3	72,2	45,1
*H-GLN-68	-	-	-	-0,4	-
H-ARG-31	-	-	-	-0,7	-
H-ASP-206	-1,3	-	-	-	-
*H-SER-242	-	-	-	-	-0,3
H-PRO-194	-	-	-0,3	-	-
H-CYS-233	-	-0,7	-0,9	-	-
H-PHE-234	-	-0,4	-0,6	-	-

Продовження таблиці 4.6

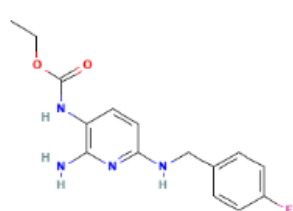
1	2	3	4	5	6
H-ILE-270	-0,7	-	-	-	-
H-VAL-276	-	-0,4	-0,4	-	-
H-SER-277	-	-0,7	-0,7	-	-
*H-PHE-278	-	-0,2	-0,4	-	-
*V-GLN-68	-	-	-	-0,7	-
V-GLN-149	-	-	-	-1	-
V-ARG-151	-	-	-	-1,1	-
V-ARG-152	-	-	-	-0,4	-
V-LYS-27	-	-	-	-0,8	-
V-GLN-28	-	-	-	-0,4	-
V-ARG-31	-	-	-	-1,5	-
V-GLU-207	-0,4	-	-	-	-0,6
V-ARG-208	-0,5	-	-	-	-1,2
V-ARG-209	-0,6	-	-	-	-0,7
V-GLU-235	-0,8	-	-	-	-
V-ASP-239	-0,6	-	-	-	-0,6
*V-SER-242	-0,2	-	-	-	-0,4
V-ARG-150	-	-0,6	-0,3	-	-
V-LEU-192	-	-0,4	-0,3	-	-
V-ALA-193	-	-0,7	-0,2	-	-
V-PRO-194	-	-1,2	-0,6	-	-
V-PHE-235	-	-0,2	-0,4	-	-
V-PRO-236	-	-0,3	-0,7	-	-
V-ASP-247	-0,4	-	-	-	-
*V-PHE-278	-	-0,4	-0,6	-	-

Примітки: V – вандерваальсова взаємодія, H – водневий зв'язок, * – амінокислоти, здатні до вандерваальсової взаємодії та утворення водневого зв'язку.

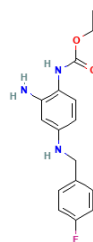
4.2 Механізми взаємодії пропоксазепаму з потенціалозалежними калієвими каналами

З попередніх досліджень механізму дії пропоксазепаму відомо, що його анальгетична дія зумовлена впливом на гліцинові рецептори, потенціалозалежні калієві канали, дофамінергічну систему, NMDA-рецептори та альфа-1 адренорецептори [1]. Тому потенціалозалежні калієві канали були обрані нами, як об'єкти дослідження їх взаємодії з похідними

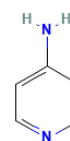
1,4-бензодіазепіну. У якості референтних сполук були обрані флупіртин, ретигабін та 4-амінопіридин (рис. 4.5).



Флупіртин



Ретигабін



4-амінопіридин

Рис. 4.5 Структури сполук, використаних у докінг аналізі з потенціалозалежними калієвими каналами

Привертає до себе увагу те, що пропоксазепам демонструє вищу афінність зв'язування з Kv7.2 (оцінка докінгу AutoDock Vina -8,24 ккал/моль) порівняно з ретигабіном (-7,67 ккал/моль) (табл. 4.7). Такий показник зумовлений значним внеском гідрофобних взаємодій із залишками Pro 308, Phe 240, Trp 236, Leu 299, Leu 243 та Phe 100. Ретигабін, у свою чергу, формує водневі зв'язки із залишками Phe 305 та Leu 299, а також формує гідрофобні зв'язки із Pro 308, Gly 239, Trp 236 та Leu 299, що подібно до механізму взаємодії пропоксазепаму (рис. 4.6).

Таблиця 4.7

Розрахована енергія взаємодії досліджуваних сполук

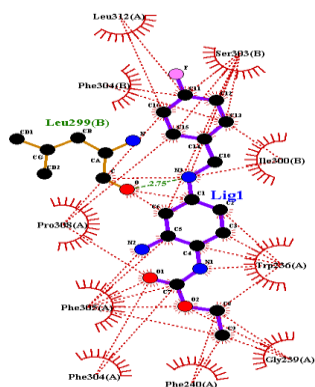
Сполука	Параметри, ккал/моль							
	Вільна енергія зв'язування		Кінцева міжмолекулярна енергія		Ван-дерваальсова взаємодія, водневий зв'язок		Електро-статична взаємодія	
	Kv3.1	Kv7.2	Kv3.1	Kv7.2	Kv3.1	Kv7.2	Kv3.1	Kv7.2
1	2	3	4	5	6	7	8	9

Продовження таблиці 4.7

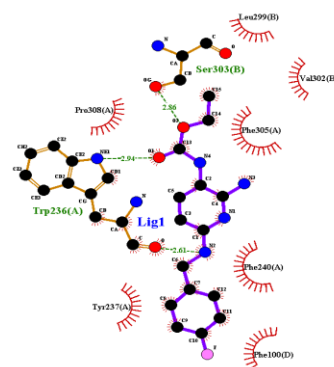
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ретигабін	-4,52	-7,67	-6,61	-9,76	-6,59	-9,75	-0,02	-0,01
Флупір- тин	-3,99	-6,51	-6,08	-8,59	-6,05	-8,50	-0,02	-0,09
4-аміно- піридин	-3,43	-3,92	-3,73	-4,22	-3,69	-4,20	-0,03	-0,02
Пропокса- зепам	-6,44	-8,24	-7,63	-9,43	-7,63	-9,46	-0,01	+0,0 3
Окса- зепам	-5,71	-7,78	-6,30	-8,38	-6,30	-8,32	-0,01	-0,06

Дані також підтверджують, що гідрофобні взаємодії відіграють ключову роль у зв'язуванні сполук із Kv7.2, що пов'язано з наявністю у їхніх молекулах поляризованих груп (галогенів) та ароматичних структур, які забезпечують π - π взаємодії. Водневі зв'язки утворюються виключно за участю шести амінокислотних залишків: Phe 305, Phe 304, Trp 236, Ser 303, Leu 299, Ala 235 (рис. 4.6).

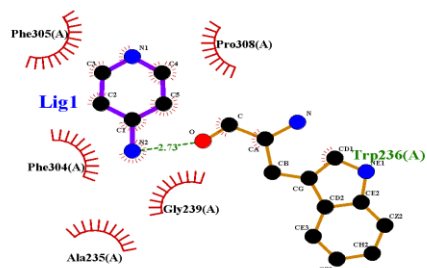
а



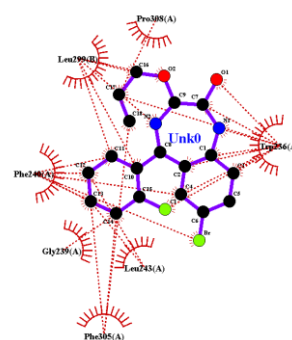
б



в



г



Д

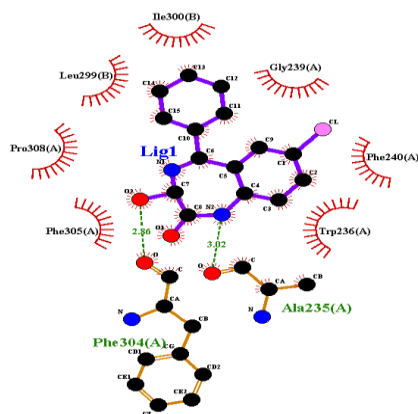


Рис. 4.6 Візуалізація розташування ретигабін (а), флупіртин (б), 4-амінопіридин (в), пропоксазепам (г) та оксазепам (д) у специфічних місцях зв'язування з амінокислотами KCNQ2 з використання програми LigPlot+

Досліджувані сполуки мають переважно різні сайти зв'язування з Kv3.1 (Додаток Б, рис.1). Згідно з отриманими даними, пропоксазепам демонструє найвищу афінність зв'язування з Kv3.1 (–6,44 ккал/моль). Водночас флупіртин і 4-амінопіридин характеризуються значно нижчим афінітетом порівняно з іншими сполуками. Примітно, що пропоксазепам утворює зв'язок виключно через слабкі гідрофобні взаємодії, що може свідчити про потенційну нестабільність його комплексу з Kv3.1. Пропоксазепам і флупіртин мають схожий сайт зв'язування, що підтверджується наявністю спільних амінокислот, які беруть участь у взаємодії з цими сполуками: Leu 415 C, Leu 357 D, Ala 418 C, Met 414 C, Ala 353 D, Phe 391 D і Val 356 D (рис. 4.7.).

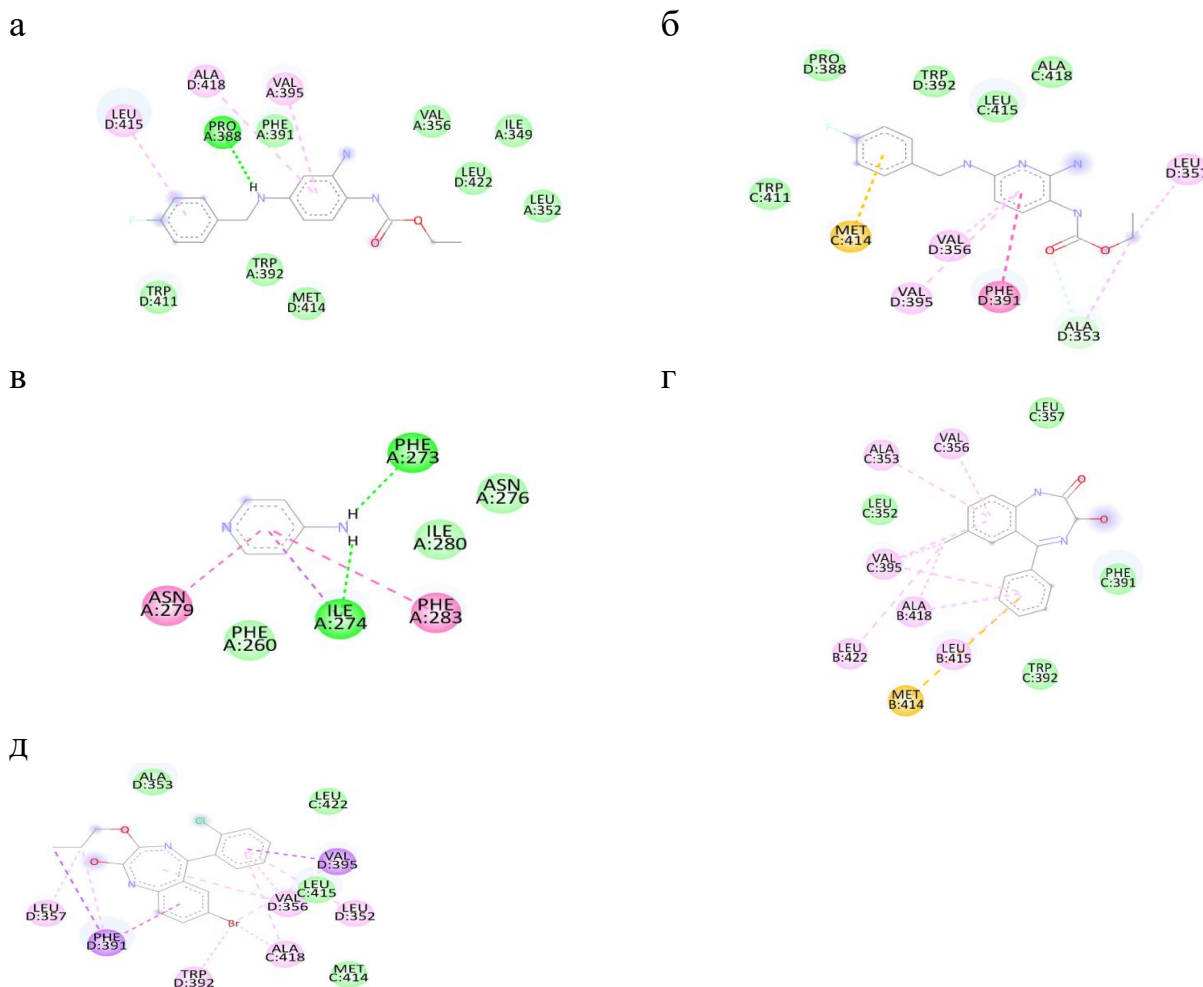


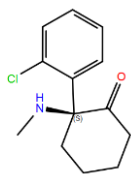
Рис. 4.7 Візуалізація розташування ретигабін (а), флупіртин (б), 4-амінопіридин (в), пропоксазепам (г) та оксазепам (д) у специфічних місцях зв'язування з амінокислотами Kv3.1 з використання програми DiscoveryStudio2021

Оксазепам також взаємодіє з більшістю цих амінокислот, але на інших ланцюгах і в іншому сайті зв'язування (Leu 415 B, Leu 357 C, Ala 418 B, Phe 391 C і Val 356 C). Це зумовлено чотирикратною симетрією напругозалежних калієвих каналів. Водневі зв'язки формують лише ретигабін (Pro 388) і 4-амінопіридин (Phe 273 і Ile 274 A).

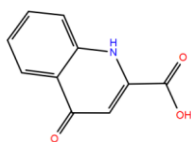
4.3 Механізми взаємодії пропоксазепаму з NMDA-рецептором

Попередні дослідження механізму дії пропоксазепаму свідчать про те, що його анальгетичний ефект пов'язаний з впливом на NMDA-рецептори. Тому наступним етапом *in silico* дослідження було проведення

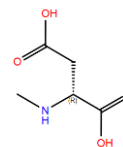
молекулярного докінгу пропоксазепаму з NMDA-рецептором. Референтними лігандами були обрані кетамін, кінуренова кислота та N-метил-D-аспартат (рис. 4.8).



Кетамін



Кінуренова кислота



N-метил-D-аспартат

Рис. 4.8 Структури сполук, використаних у докінг аналізі з NMDA-рецептором

Таблиця 4.9 показує, що в рамках обчислювального прогнозу пропоксазепам має одну із найвищих оцінку докінгу (–6,77 ккал/моль) у порівнянні з кінуреновою кислотою (–6,60 ккал/моль), кетаміном (–5,34 ккал/моль) та N-метил-D-аспартатом (–4,32 ккал/моль). Вільна енергія зв’язування була розрахована за допомогою методу MMGBSA, який використовується у молекулярній механіці (табл. 4.8). Більш негативне значення MMGBSA свідчить про те, що ліганд і рецептор мають сильнішу спорідненість зв’язування, що відображає більшу ймовірність утворення стабільного комплексу та сприятливої взаємодії в біологічному контексті. Значення MMGBSA для пропоксазепаму становить –45,82 ккал/моль, для кінуренової кислоти –32,59 ккал/моль, для кетаміну –29,45 ккал/моль, а для N-метил-D-аспартату –12,79 ккал/моль (табл. 4.8).

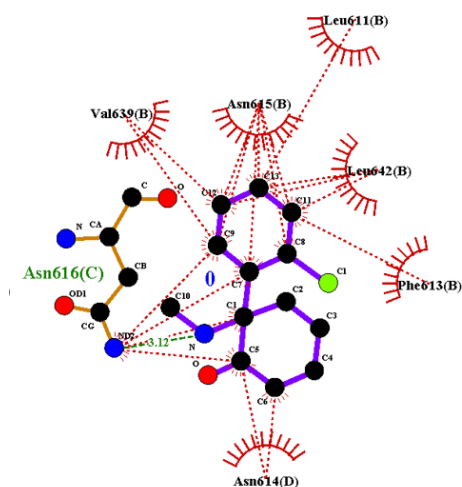
Таблиця 4.8

Оцінка докінгу та значення вільної енергії зв’язування досліджуваних сполук з NMDA-рецептором з використанням GLIDE модуля

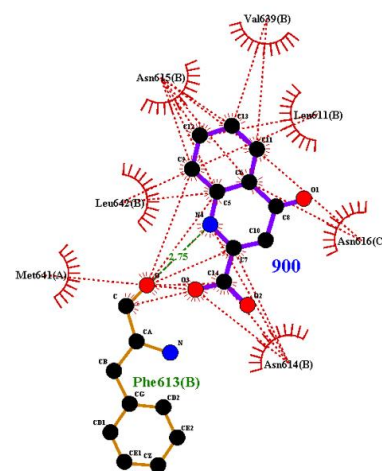
Maestro властивості Ккал/моль	Кетамін	Кінуренова кислота	N-метил-D- аспартат	Пропокса- зепам
Оцінка докінгу (Gscore)	-5,34	-6,60	-4,32	-6,77
Ліпофільні взаємодії	-2,11	-1,86	-0,38	-2,81

1	2	3	4	5
Водневі зв'язки	-0,12	-0,32	-0,29	-0,57
Ван-дер-Вальсові взаємодії	-23,07	-22,84	-14,73	-35,60
Кулонівська енергія взаємодії	-2,29	-5,78	-14,15	-5,82
MMGBSA	-29,45	-32,59	-12,79	-45,82

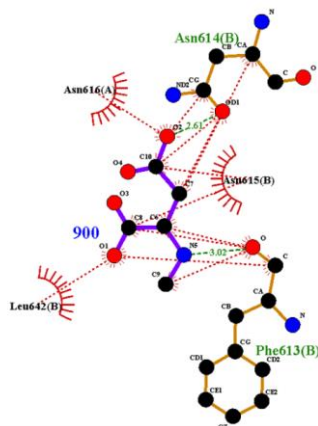
Основні водневі зв'язки пропоксазепам формує із залишками Asn 616 та Asn 614. Карбонільна група цієї сполуки зв'язується з AsnA 616 (дистанція 2,88 Å), де Asn 616 виступає донором водню. Вторинна аміногрупа утворює зв'язок із AsnB 614 (дистанція 3,01 Å), де пропоксазепам виступає донором водню. Крім того, важливими є гідрофобні взаємодії з MetC 641, ValC 644, PheB 613 та іншими амінокислотами через ван-дер-ваальсові сили, π -алкільні та алкільні контакти, включаючи взаємодії через атом брому (рис. 4.9).



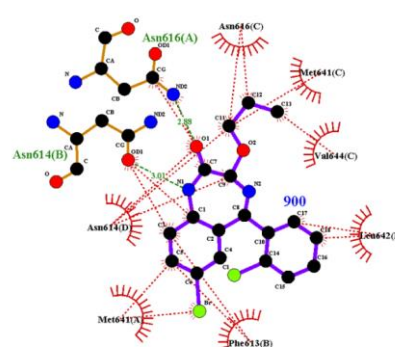
Кетамін



Кінуренова кислота



N-метил-D-аспартат



Пропоксазепам

Рис. 4.9 Візуалізація взаємодії досліджуваних сполук з NMDA-рецептором

Загалом, усі розглянуті ліганди демонструють спільний механізм взаємодії з Asn 616 and Asn 614 через карбонільну або аміногрупу. Однак пропоксазепам виділяється завдяки утворенню додаткових алкільних взаємодій, пов'язаних із атомом бром, що забезпечує його більшу стабільність у комплексі з рецептором. Крім того, гідрофобні взаємодії з Leu 642, Val 639 і MetC 641 підсилюють афінність пропоксазепаму до рецептора. Враховуючи ці особливості, пропоксазепам може демонструвати високу спорідненість та стабільність у зв'язуванні з NMDA-рецептором.

4.4 Механізми антиноцицептивної активності похідних 1,4-бензодіазепіну, що пов'язані із впливом на $\alpha 1$ -адренорецептором шляхом зв'язування з фосфодіестеразою 4

Як вже згадувалось вище, анальгезивний ефект пропоксазепаму частково реалізується через його вплив на альфа-1-адренорецептори [17, 51]. Поточне дослідження лігандів альфа-1 адренергічних рецепторів і фосфодіестерази 4 переважно здійснюється за допомогою того ж сайту зв'язування, що й у референтних лігандів.

Альфа-1 адренергічний рецептор. Як і очікувалось, референтні сполуки (оксиметазолін, норадреналін, L-спінефрин) мають найнижчі енергії зв'язування з $\alpha 1A$ адренергічним рецептором за результатами MMGBSA (табл. 4.9).

Результати докінгу досліджуваних лігандів з α 1A-адренергічним рецептором за допомогою програм AutoDock Vina та Schrödinger Maestro

Glide

Речовини	7ym8 (Оксиметазолін)			7ymh (Норадреналін)			8thl (L-епінефрин)		
	Glide Score	MMGBSA	Auto Dock Vina	Glide Score	MMGBSA	Auto Dock Vina	Glide Score	MMGBSA	Auto Dock Vina
Референтний ліганд	-7,5	-83,9	-8,8	-7,9	-45,6	-6,0	-7,9	-57,6	-6,0
Норадреналін	-8,0	-52,9	-6,8	-7,9	-45,7	-6,0	-8,1	-47,7	-5,8
L-епінефрин	-7,0	-60,0	-6,9	-7,9	-53,2	-6,2	-7,9	-57,7	-6,0
Пропоксазепам	-6,8	-38,5	-8,7	-6,2	-17,2	-6,6	-6,0	-6,9	-5,1
3-гідрокси-пропоксазепам	-7,5	-47,7	-8,9	-6,9	-39,8	-5,9	-7,4	-21,0	-7,9
Оксазепам	-7,7	-39,2	-8,8	-7,3	-31,5	-7,9	-6,7	-7,1	-6,8
Діазепам	-8,5	-56,9	-9,2	-7,9	-35,7	-6,6	-8,1	-28,3	-8,3

Примітка: 7ym8-Сryo-ЕМ комплекс Nb29-alpha1AAR-miniGsq, зв'язаний з оксиметазоліном; 7ymh-Сryo-ЕМ комплекс Nb29-alpha1AAR-miniGsq, зв'язаний з норадреналіном, 8thl- Сryo-ЕМ альфа-1A- адренорецептор зв'язаний з адреналіном в комплексі з гетеротримером Gq-протеїн, Glide Score - емпірична оціночна функція, яка наближена до вільної енергії зв'язування ліганду, AutoDock Vina- показники афінності зв'язування, розраховані програмою з відкритим кодом для молекулярного докінгу, MMGBSA -Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area (Молекулярна механіка/Узагальнена площа поверхні).

Серед досліджених похідних 1,4-бензодіазепіну діазепам демонструє найнижчі значення MMGBSA: 7YM8 (–56,9 ккал/моль), 7YMH (–35,7 ккал/моль), 8THL (–28,3 ккал/моль). Діазепам також має найнижчий передбачуваний Glide score серед усіх досліджених білків: 7YM8 (–8,5 ккал/моль), 7YMH (–7,9 ккал/моль), 8THL (–8,1 ккал/моль), що свідчить про стабільний комплекс ліганд-рецептор. За результатами AutoDock Vina, взаємодія похідних 1,4-бензодіазепіну з α 1A адренергічним рецептором має кращі значення оцінки докінгу порівняно з референтними лігандами.

Серед усіх досліджених лігандів найвищі значення MMGBSA та Glide Score виявлені у пропоксазепаму (табл. 4.9).

У таблиці 4.10 узагальнено вільні енергії зв'язування, отримані з розрахунків MM-GBSA, у порівнянні з відповідними експериментальними вільними енергіями зв'язування для адренорецептора $\alpha 1A$ з еталонними речовинами.

Таблиця 4.10

Порівняння експериментальної вільної енергії зв'язування із прогнозованою

Референтні ліганди	Ki (nM)	ΔG_{exp} (ккал/моль)	MMGBSA (ккал/моль)
Оксиметазолін CHEMBL1909085	16	-12,07	-83,89
Норадреналін CHEMBL679	3000	-8,24	-52,94
L-епінефрин CHEMBL679	2800	-7,71	-60,00

Примітка: Ki (nM) – константа інгібування, ΔG_{exp} - експериментальна вільна енергія зв'язування, MMGBSA -Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area

Фосфодіестераза 4 (PDE4). Пропоксазепам характеризується низькими значеннями енергії зв'язування MMGBSA з PDE4A (3I8V –55,1 ккал/моль, 3TVX –60,7 ккал/моль), а також за результатами моделювання в AutoDock Vina (3I8V –8,7 ккал/моль, 3TVX –9,2 ккал/моль) можна відзначити його високу афінність до цього білка (табл. 4.11). Метаболіт пропоксазепаму 3-гідроксипропоксазепам також має високий афінитет до всіх підтипів PDE4, що підтверджується оцінками докінгу AutoDock Vina, які варіюються від –8,3 ккал/моль до –9,8 ккал/моль.

Таблиця 4.11

**Результати докінгу (прогнозована енергія зв'язування, ккал/моль)
досліджуваних лігандів з рецептором ФДЕ за допомогою програмного
забезпечення AutoDock Vina та Schrödinger Maestro Glide**

Білок	Методика розрахунку	Пропоксазепам	Діазепам	Оксазепам	3-гідрокси-пропоксазепам	Референтні ліганди
3I8V (PDE4A)	AutoDock Vina	-8,7	-8,1	-8,7	-8,7	-7,3
	Glide GScore	-7,8	-8,1	-8,2	-6,1	-8,9
	MMGBSA	-55,1	-35,05	-37,9	-10,4	-24,1
3TVX (PDE4A)	AutoDock Vina	-9,2	-7,8	-8,7	-9,3	-7,2
	Glide GScore	-7,7	-8,5	-7,4	-6,7	-6,2
	MMGBSA	-60,7	-67,0	-64,6	-35,8	-68,9
4KP6 (PDE4B)	AutoDock Vina	-9,5	-9,0	-9,4	-9,8	-8,2
	Glide GScore	-6,5	-6,7	-6,0	-5,4	-6,9
	MMGBSA	-2,4	-1,4	-24,0	-29,1	1,3
3W5E (PDE4B)	AutoDock Vina	-10,3	-9,3	-10,6	-9,3	-12,2
	Glide GScore	-7,9	-9,7	-8,6	-7,9	-13,9
	MMGBSA	-37,5	-47,5	-34,3	-47,7	-103,8
6IM6 (PDE4D)	2AutoDock Vina	-8,8	-8,5	-8,5	-9,0	-7,8
	Glide GScore	-	-7,3	-7,1	-5,2	-7,3
	MMGBSA	-	-50,25	-40,73	-4,04	-59,14
2FM0 (PDE4D)	AutoDock Vina	-8,7	-8,4	-8,5	-8,3	-9,6
	Glide GScore	-8,2	-8,9	-8,3	-8,2	-11,7
	MMGBSA	-52,6	-37,8	-36,3	-43,9	20,2

3I8V: Діазепам та оксазепам як і референтний ліганд ОМО утворюють р-р взаємодію з PHE 584. Пропоксазепам та 3-гідроксипропоксазепам мають гідрофобну взаємодію з цим залишком. Діазепам та ОМО також утворюють π - π взаємодії з TYR 371. 3-гідроксипропоксазепам має подібну взаємодію з референтним лігандом ОМО у сайті зв'язування, утворюючи водневі зв'язки

через водяні містки з MET 485 та HIS 372. Діазепам та 3-гідроксипропоксазепам утворюють зв'язок через атоми галогену з GLN 581 (Додаток Б рис.2).

3TVX: Пропоксазепам та 3-гідроксипропоксазепам формують водневий зв'язок з залишком ASP 530 через водень амідної групи. Пропоксазепам має ще один водневий зв'язок з ASN 533 через кисень алкоксигрупи. Більшість лігандів (пропоксазепам, діазепам, оксазепам та референтний ліганд PNX) утворюють π - π взаємодію з PHE 584. 3-гідроксипропоксазепам створює металевий зв'язок з Mg^{2+} через кисень амідної групи. Цей тип взаємодії також характерний для PNX (через кисень карбонільної групи). 3-гідроксипропоксазепам формує водневий зв'язок з HIE 416 через гідроксильну групу (Додаток Б рис.3).

4KP6: Лише діазепам формує аналогічний водневий зв'язок (за рахунок кисню карбонільної групи) із GLN 443 у зв'язувальному сайті 4KP6, як і референтний ліганд 1S1. Пропоксазепам та 3-гідроксипропоксазепам формують р-р взаємодії з PHE 446, подібно до 1s1. GLN 443 має зв'язки за участю галогенів з оксазепамом та 3-гідроксипропоксазепамом. Оксазепам демонструє утворення водневих зв'язків, через взаємодію з водою, з тими ж амінокислотними залишками, що й 1S1, через кисень карбонільної групи з ASP 392 і через NH групу діазепінового кільця з TYR 233. Референтний ліганд 1s1 утворює ці зв'язки через N гетероциклічного тріазину з ASP 392, через NH групу амінобутаненітілу з ASP 392 та через TYR 233 (Додаток Б рис. 4).

3W5E: Згідно з прогнозованими результатами докінгу (Schrödinger Maestro), діазепам, оксазепам та еталонний ліганд NVW утворюють водневий зв'язок з амінокислотним залишком GLN 443, де діазепам формує цей зв'язок через нітроген діазепінового кільця, оксазепам таким же механізмом та також через гідроксильну групу, а NVW через Нітроген піримідинового гетероциклічного кільця. Пропоксазепам, в свою чергу, взаємодіє з GLN 443 через галогеновий зв'язок. Усі досліджувані похідні 1,4-бензодіазепіну, окрім

3-гідроксипропоксазепаму, створюють р-р взаємодію з PHE 414. Пропоксазепам формує зв'язок з ASN 395 через оксиген амідної групи (Рис. 4.10, Додаток рис. 5).

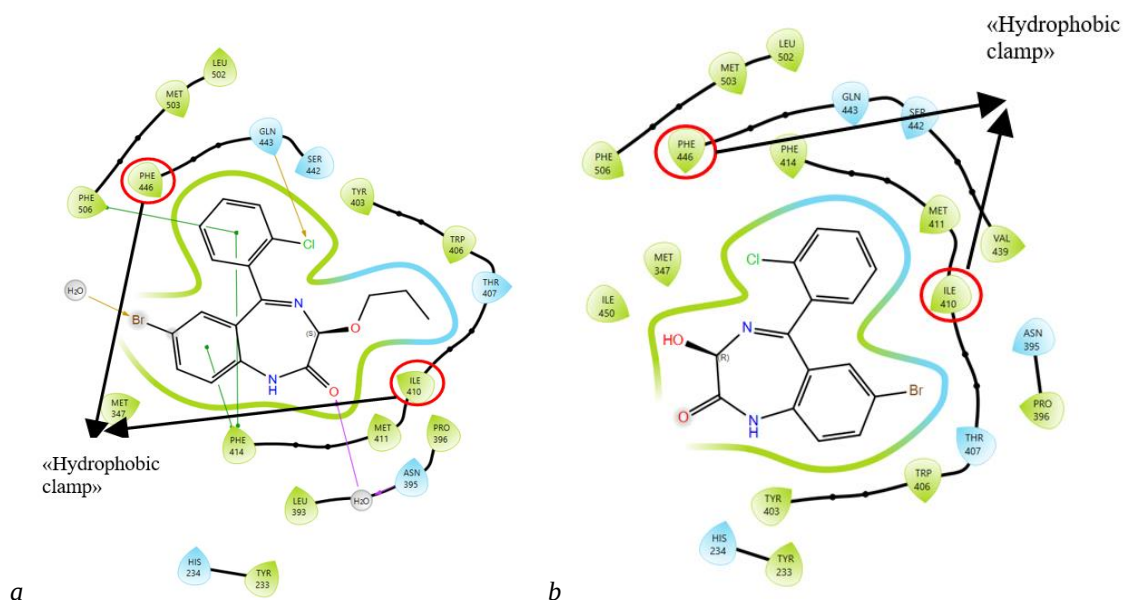


Рис. 4.10. Візуалізація положення в специфічних сайтах зв'язування PDE4B (3W5E) досліджуваних лігандів: пропоксазепам (а), 3-гідроксипропоксазепам (б) (Schödinger Suite)

6IM6: Згідно з молекулярним докінгом (Schrödinger Maestro), пропоксасепам не створює стабільного комплексу з 6IM6. Діазепам, оксазепам і АНЗ утворює π - π взаємодію з PHE 372 (кишеня Q) (Додаток Б рис.6).

2FM0: Усі досліджені ліганди утворюють р-р взаємодію з TYR 159 (Q-кишеня). Пропоксазепам і його метаболіт 3-гідроксипропоксазепам займають положення «Р-затискача» і взаємодіють з ключовими залишками ILE 336 і PHE 372 (рис. 4.11, Додаток Б рис.7).

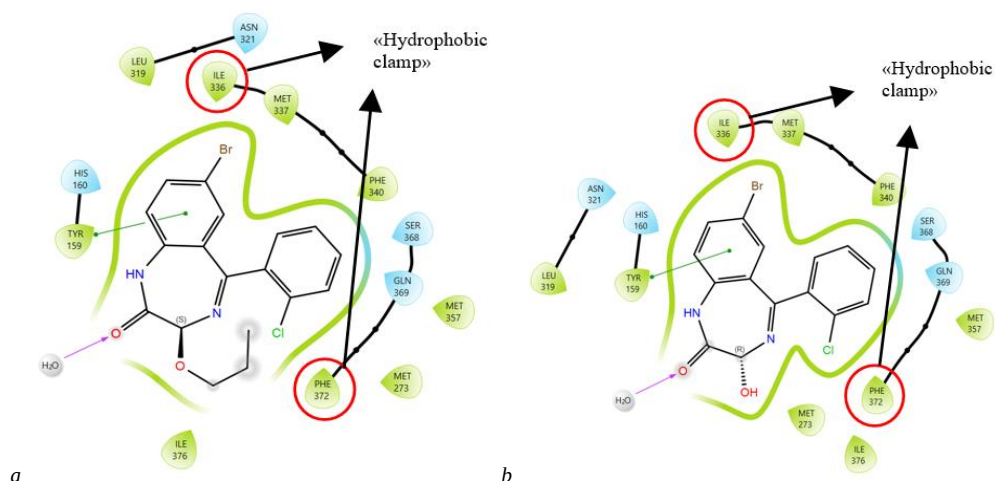


Рис. 4.11 Візуалізація положення в сайтах специфічного зв'язування PDE4D (2FM0) досліджуваних лігандів: пропоксазепам (а), 3-гідроксипропоксазепам (б) (Schödinger Suite)

Аналіз структурної взаємодії та прогнозованих оцінок внеску окремих амінокислотних залишків (табл. 4.13) дозволяє визначити спільні та відмінні особливості їхньої ролі в активному центрі фосфодіестерази при зв'язуванні з різними лігандами.

PDE4A: У комплексі 3I8V з досліджуваними лігандами амінокислотні залишки PHE 584, PHE 552 та ILE 548 відіграють ключову роль, забезпечуючи найбільший внесок в енергію зв'язування та беручи участь у найбільшій кількості взаємодій з усіма дослідженими сполуками. Серед похідних 1,4-бензодіазепіну 3-гідроксипропоксазепам утворює найбільшу кількість лігандних взаємодій. Пропоксазепам, порівняно з референтним лігандом 3I8V 0MO, демонструє подібний рівень взаємодії з гідрофобними та полярними залишками, головним чином зв'язуючись із GLN 581 і ASN 533 через атом галогену Br. У комплексі 3TVX залишок ILE 548 формує найбільшу кількість взаємодій із лігандами та робить значний внесок в енергію зв'язування (–5,0 ккал/моль для діазепаму, –3,8 ккал/моль для пропоксазепаму, –3,7 ккал/моль для оксазепаму, –1,6 ккал/моль для 3-гідроксипропоксазепаму та –4,6 ккал/моль для еталонного ліганду PNX) (табл. 4.12).

Таблиця 4.12

**Внесок зв'язків окремих амінокислотних залишків у загальну енергію
взаємодії досліджуваних сполук з активним центром PDE4A**

Аміно кислотні залишки	Діазепам		Пропоксазепам		Оксазепам		3-гідрокси- пропоксазепам		Референтні ліганди	
	3I8V	3TVX	3I8V	3TVX	3I8V	3TVX	3I8V	3TVX	3I8V	3TVX
PHE 584	-6,4	-5,3	-6,6	-5,9	-5,9	-4,5	-3,9	-0,6	-4,5	-5,8
TYR 371	-2,6	-3,3	-1,8	-1,9	-2,3	-4,3	-0,9	-0,9	-2,2	-4,1
ASN 533	-1,2	-2,4	-1,6	-5,3	-1,4	-2,9	0,3	0,0	-0,4	-1,1
GLN 581	-2,4	-3,1	-1,6	-1,8	-2,3	-1,8	-1,4	-0,3	-4,5	-3,1
MET 485	-2,7	-1,6	-4,9	-2,8	-2,3	-2,8	-5,9	-3,1	-2,5	-2,0
LEU 531	-1,2	-2,1	-0,9	-3,0	-1,3	-2,7	-1,9	-1,3	-1,3	-2,6
ILE 548	-5,6	-5,0	-4,9	-3,8	-5,4	-3,7	-2,9	-1,6	-3,8	-4,6
PHE 552	-3,2	-3,0	-4,3	-2,3	-3,5	-2,2	-2,9	-2,1	-1,9	-1,7

PDE4B: GLN 443 (4KP6) утворює взаємодію з усіма лігандами: 3-гідроксипропоксазепам створює цю взаємодію через атом Br, оксазепам через метильну групу бензольного кільця, пропоксазепам має 2 взаємодії з цим залишком, через атоми карбону хлорфенільного кільця, діазепам утворює цей зв'язок за киснем амідної групи та референтний ліганд 1S1 за атомом нітрогену триазольного гетероциклу, азотом триазинового гетероциклу та атомом вуглецю метильної групи (Додаток рис.4). Амінокислотні залишки PHE 446 і PHE 414 (4KP6) демонструють найбільшу кількість взаємодій і високу енергетичну оцінку на один залишок: для діазепаму (-6,7, -1,8 ккал/моль), пропоксазепаму (-5,8, -3,4 ккал/моль), оксазепаму (-5,1, -2,2 ккал/моль), 3-гідроксипропоксазепаму (-4,7, -2,2 ккал/моль), референтного ліганду 1S1 (-8,6, -3,1 ккал/моль) (табл. 4.14).

Пропоксазепам і 1S1 взаємодіють із TYR 233: пропоксазепам через атом броміду, а 1S1 – за допомогою азоту триазинового гетероциклу. Взаємодії зосереджені в області, що охоплює TYR 233–ILE 450 (3W5E), оскільки в цій зоні розташований активний центр ферменту. Значний внесок у зв’язування всіх лігандів роблять залишки GLN 443, PHE 446, PHE 414, ILE 410, ASN 395 та MET 347 (3W5E) (табл. 4.13).

Таблиця 4.13

Внесок зв’язків окремих амінокислотних залишків у загальну енергію взаємодії досліджуваних сполук з активним центром PDE4B

Аміно кислотні залишки	Діазепам		Пропоксазепам		Оксазепам		3-гідрокси-пропоксазепам		Референтні ліганди	
	4KP6	3W5E	4KP6	3W5E	4KP6	3W5E	4KP6	3W5E	4KP6	3W5E
GLN 443	-2,3	-2,3	0,1	-3,6	-1,4	-3,4	-1,5	-0,7	-4,7	-5,1
PHE 446	-6,7	-3,0	-5,8	-5,8	-5,1	-6,2	-4,7	-4,3	-8,6	-7,7
PHE 414	-1,8	-3,3	-3,4	-1,5	-2,2	-3,5	-2,2	-1,9	-3,1	-7,5
ASN 395	-0,8	-2,6	-0,5	-1,6	-0,5	-1,4	-0,4	-2,3	-3,7	3,6
ASP 392	-2,2	-1,8	-4,1	-3,2	1,5	-2,0	0,3	-0,2	-5,4	2,3
TYR 233	-2,1	-3,5	-1,7	-2,3	-1,6	-4,5	-1,1	-2,3	-2,3	-1,4
MET 431	-1,0	0	-1,7	0	-0,9	0	-1,1	0	-1,3	-0,4
ILE 410	-3,9	-4,6	-1,9	-4,3	-2,4	-4,2	-2,3	-3,8	-4,3	-5,6
MET 347	-2,6	-1,1	-2,7	-0,5	-4,4	-1,6	-4,5	-0,9	-2,2	-3,4

PDE4D: LEU 319, TRP 332, ILE 336, PHE 340, MET 357, SER 368, GLN 369, PHE 372 відіграють вирішальну роль у взаємодії лігандів у місці зв’язування 6IM6. У комплексі 2FM0 з досліджуваними лігандами великий внесок в енергію зв’язку мають залишки TYR 159, MET 273, ASN 321, ILE 336, PHE 340, MET 357, GLN 369, PHE 372. Серед усіх лігандів лише пропоксазепам і еталонний ліганд M98 створюють гідрофобну взаємодію з ILE 376 (табл. 4.14).

Таблиця 4.14

**Внесок зв'язків окремих амінокислотних залишків у загальну енергію
взаємодії досліджуваних сполук з активним центром PDE4D**

Аміно кислотні залишки	Діазепам		Пропоксазепам		Оксазепам		3-гідрокси- пропоксазепам		Референтні ліганди	
	6IM6	2FM0	6IM6	2FM0	6IM6	2FM0	6IM6	2FM0	6IM6	2FM0
HIP 160	-2,6	-1,9	-	-1,6	-4,0	-1,6	-1,3	-1,4	-7,2	-2,1
GLN 369	-3,6	-2,2	-	-1,5	-3,8	-1,4	-2,2	-1,2	-4,5	-5,5
TYR 159	-2,1	-1,7	-	3,1	-1,9	-3,0	0,9	-3,3	-2,2	-3,1
PHE 372	-4,1	-6,4	-	-6,9	-3,6	-5,7	-3,1	-7,2	-4,7	-6,4
PHE 340	-3,1	-3,1	-	-3,4	-2,9	-3,4	-1,6	-3,2	-2,4	-3,5
MET 273	-2,0	-2,1	-	-3,8	-1,2	-3,2	-1,6	-3,4	-1,0	-8,1
MET 357	0,9	-1,3	-	-2,4	0,9	-1,6	6,1	-1,6	-1,9	-35
SER 368	-1,5	-1,4	-	-1,5	-1,7	-1,4	-1,5	-1,4	-1,1	0
ASN 321	-1,9	-2,5	-	-1,1	-1,5	-0,6	-1,3	-0,8	-0,9	-1,7
LEU 319	-1,5	-1,3	-	-1,0	-1,6	-1,3	-1,4	-1,2	-0,8	-2,5
TYR 159	-2,1	-1,7	-	-3,1	-1,9	-3,0	0,9	-3,3	-2,2	-3,1
TRP 332	-0,6	-1,3	-	-0,9	-0,9	-0,7	-1,6	-0,7	-1,2	-0,7
ILE 336	-2,4	-5,1	-	-4,7	-2,3	-4,3	-0,4	-4,2	-4,4	-4,3

Молекулярна динаміка. Для отримання більш детальної інформації стосовно складових взаємодії досліджуваних лігандів та білків було проведено молекулярну динаміку (МД) комплексів білок-ліганд.

Метою МД є визначення стабільності ліганд-білкових комплексів за допомогою системи, що моделює умови в організмі людини. Значення RMSD і RMSF використовувалися для визначення стабільності та гнучкості в цьому дослідженні. Високі відхилення та коливання білка можуть бути ознакою нестабільності під час моделювання [19]. RMSD було розраховано для комплексів PDE4A (3TVX), PDE4B (3W5E) і PDE4D (6IM6) з

досліджуваними лігандами для оцінки динамічної стабілізації протягом періоду моделювання (табл. 4.15)

Таблиця 4.15

Середньоквадратичне відхилення (RMSD) білка (PDE4) у комплексі з досліджуваними лігандами

3TVX	6 нс	12 нс	Діапазон
Без ліганду	0,945 Å	1,334 Å	0,389 Å
Референтний ліганд PNX	0,839 Å	1,273 Å	0,434 Å
Пропоксазепам	0,837 Å	1,095 Å	0,258 Å
3-гідрокси-пропксазепам	0,916 Å	1,244 Å	0,328 Å
3W5E	5 нс	10 нс	Діапазон
Без ліганду	1,015 Å	1,216 Å	0,201 Å
Референтний ліганд NVW	0,907 Å	1,293 Å	0,386 Å
Пропоксазепам	0,815 Å	1,244 Å	0,429 Å
3-гідрокси-пропксазепам	0,927 Å	1,875 Å	0,948 Å
6IM6	5 нс	10 нс	Діапазон
Без ліганду	0,868 Å	1,061 Å	0,193 Å
Референтний ліганд АНЗ	0,818 Å	1,205 Å	0,387 Å
Пропоксазепам	0,836 Å	1,299 Å	0,463 Å
3-гідрокси-пропксазепам	0,741 Å	1,276 Å	0,535 Å

Відповідно до рис. 4.12. білок PDE4B (3W5E) у комплексі з 3-гідроксипропоксазепамом має більше коливань, ніж пропоксазепам або еталонний ліганд на 9-10 нс.

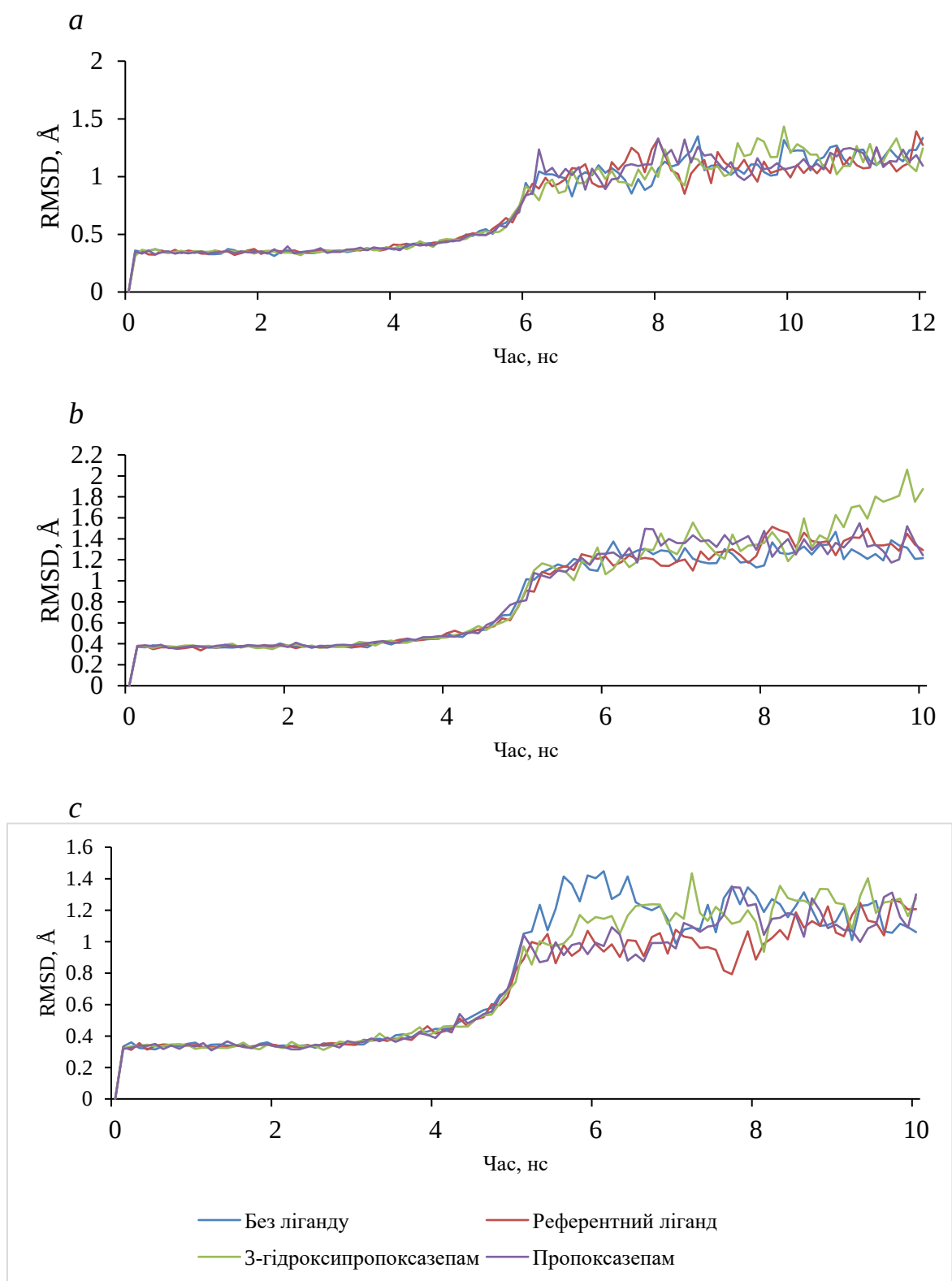
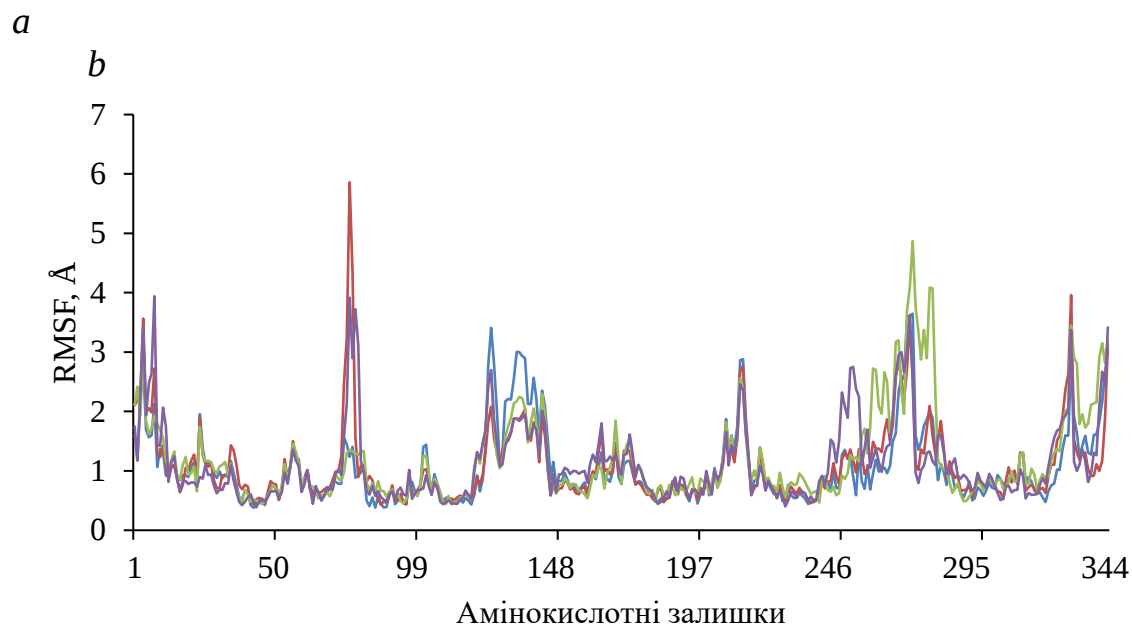
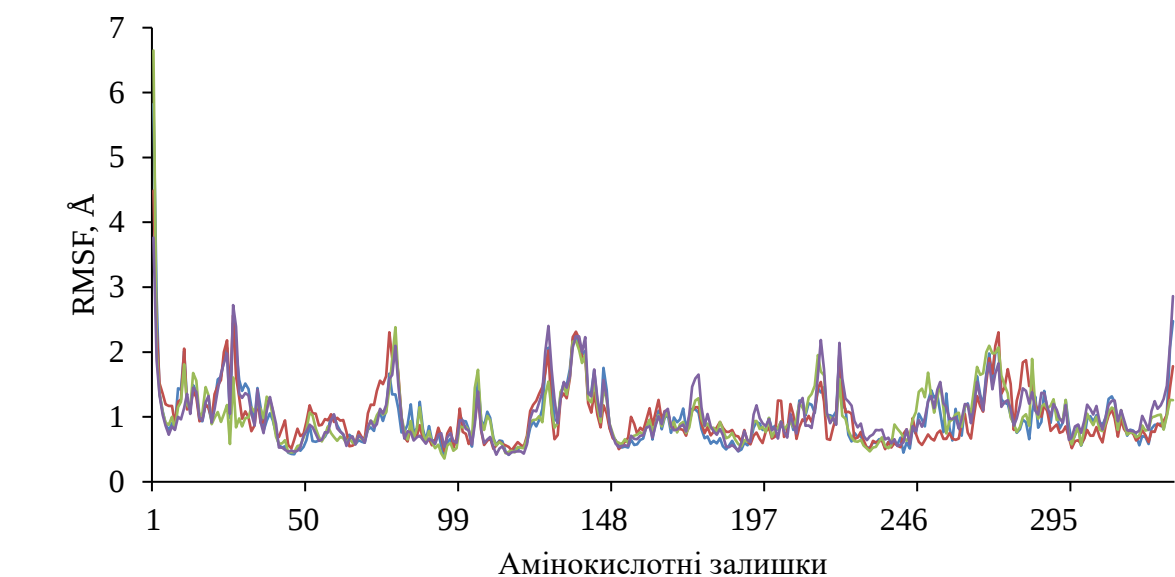


Рис.4.12 Середньоквадратичні значення PDE4 без лігандів і в комплексі з ними: (а)- PDE4 (3TVX), еталонний ліганд – PNX; (б)- PDE4B (3W5E), еталонний ліганд – NVW; (в)- PDE4D (6IM6) ліганд порівняння – АНЗ

Аналіз RMSF (середньоквадратичні коливання) проводили для оцінки рухливості амінокислотних залишків після зв'язування з лігандами. Ми виявили один пік коливань із високою рухливістю PDE4A (3TVX) (рис. 4.13). Це залишок MET 289 (на графіку -1), RMSF для PDE4A без ліганду становить 5,82 Å, для комплексу PDE4A – PNХ (ліганд порівняння) - 4,49 Å, для комплексу PDE4A-3-гідроксипропoxазепам - 6,65 Å, а для комплексу PDE4A – пропoxазепам- 3,76 Å.



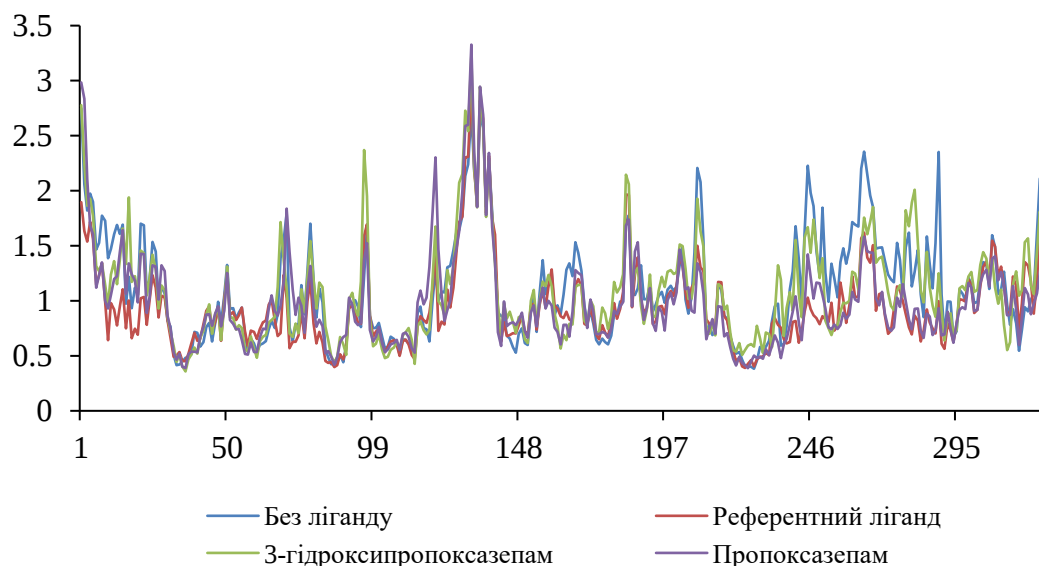


Рис. 4.13 Значення RMSF PDE4 без лігандів і в комплексі з ними: (а)- PDE4 (3TVX), еталонний ліганд – PNX; (б)- PDE4B (3W5E), еталонний ліганд – NVW; (в)- PDE4D (6IM6) , еталонний ліганд – АНЗ

Найбільший пік коливань має залишки ASP 230-VAL 231 (на графіку ASP77-VAL78) (рис. 4.13.). HIS 234 (на графіку HIS 81) – CYS 432 (на графіку CYS 279) є областю активного центру PDE4B. На підставі результатів MD, продемонстрованих на рис. 4.13., кишеня М PDE4B (область HIS 234 (на графіку HIS 81) – MET 347 (на графіку MET194)) показала значення RMSF у діапазоні 0,38– 3,00 Å для білка без ліганду, 0,46 -1,95 Å для комплексу PDE4B-NVW, 0,44-2,65 Å комплекс PDE4B-3-гідроксипропоксазепам, 0,44-2,69 Å комплекс PDE4B -пропоксазепам.

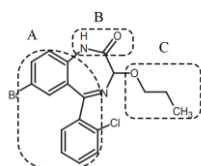
Згідно з рисунком 4.13, існує три піки (що відповідають трьом різним областям білка) коливань з високою рухливістю PDE4D (6IM6). Перший розміщений на залишках GLU 87 – GLU 89 (на ділянці 1-3), другий і найвищий – між залишками SER 217 -GLU 218 (на ділянці 131 – 132), третій – залишок PRO 411 (в області залишку 325) [67].

4.5 Молекулярні механізми взаємодії пропоксазепаму з рецепторами TRPV1

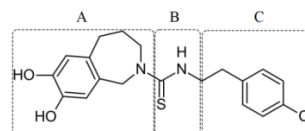
На цьому етапі досліджень ми використовували моделювання молекулярного докінгу, щоб дослідити взаємодію між пропоксазепамом і транзиторним рецепторним потенціалом ванілоїдом рецептори 1 (TRPV1) типу, оскільки він є одним з найпопулярніших мішеней для знеболюючої терапії [65]. Пропоксазепам має потрібні фармакофорні характеристики, що відповідають фармакофорній моделі лігандів TRPV1.

Ми побудували фармакофорну модель на основі списку лігандів, взятих із додаткової інформації статті дослідницької групи доктора Герхарда Ф. Екера [143]. У отриманій фармакофорній моделі можна виділити такі частини ліганду, як арильна зона взаємодії А, амідна В-зона та гідрофобний ланцюг С.

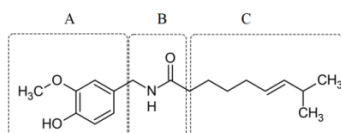
Пропоксазепам має необхідні фармакофорні характеристики: зона А – бензольне кільце, яке з'єднане з семичленним діазепіновим кільцем і арильним замісником у позиції 5; зона В – амідна група (NH-C=O). Ця група містить атом водню, який може діяти як донор водневого зв'язку, та карбонільний кисень, який може виступати як акцептор водневого зв'язку. Це робить її важливим місцем для взаємодій з іншими молекулами, такими як рецептори або інші білки в організмі; зона С – алкоксигрупа (рис. 4.14).



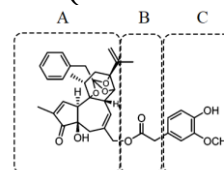
Пропоксазепам



Капсазепін (TRPV1 антагоніст)



Капсаїцин (TRPV1 агоніст)



Резініфератоксин (RTX) (TRPV1 агоніст)

Рис. 4.14 Структури фармакофорних особливостей лігандів, підготовлені Maestro Schrödinger Suite (A - головка арильної взаємодії, B - лінкер взаємодії H-зв'язку, C - гідрофобний хвіст)

Дослідження взаємодії лігандів з активним центром білка проводилося за допомогою програми Maestro Schrödinger Suite для визначення афінності зв'язування сполук з білковою мішенню. Структури досліджуваних лігандів наведено на рисунку 4.15. Результати докінгу дозволили визначити значення gscore взаємодії, а також її компоненти – гідрофобні взаємодії та водневі зв'язки для досліджених лігандів у сайті зв'язування рецептора TRPV1. Взаємодії в межах сайту зв'язування визначаються внеском специфічних залишків амінокислот у загальний процес, що визначає силу та тип взаємодії. Результати взаємодії були проаналізовані за допомогою оцінки докінгу.

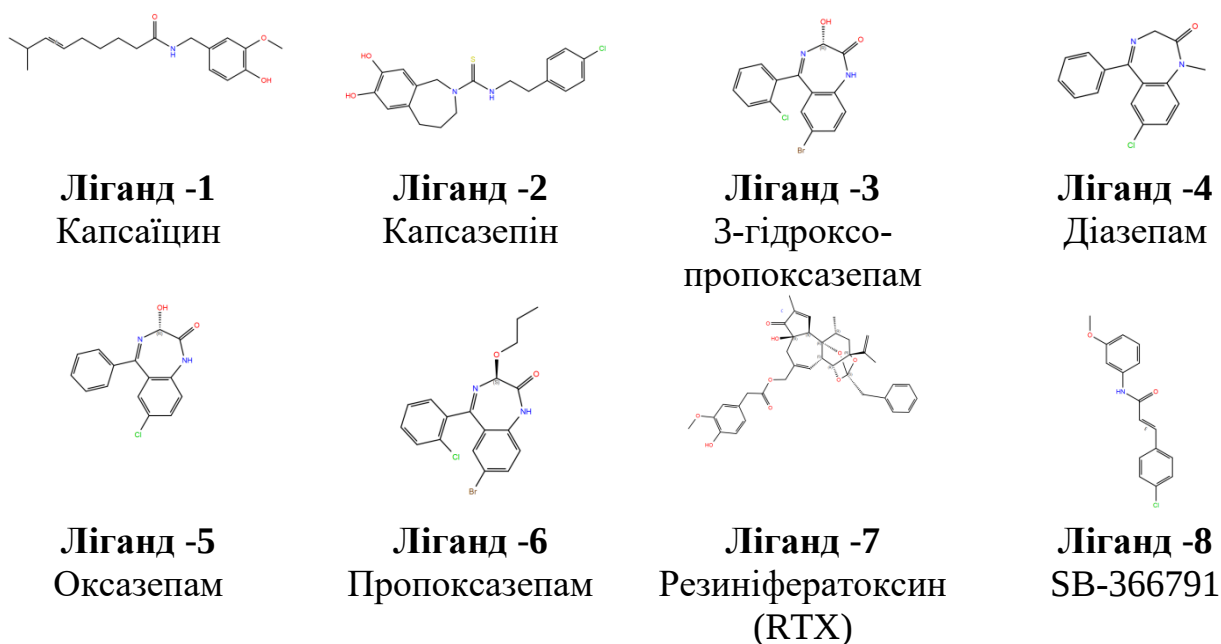


Рис. 4.15 Структури досліджуваних сполук, отриманих за допомогою модуля LigPrep

Референтна сполука SB-366791 має найнижчу оцінку докінгу та MMGBSA вільної енергії зв'язування, що означає, що ця сполука має найкращу спорідненість до TRPV1 рецептора. Зокрема, оцінка докінгу пропоксазепаму (–7,30 ккал/моль) вказує на сильнішу взаємодію з

рецептором TRPV1 у порівнянні з оксазепамом (–6,82 ккал/моль), 3-гідроксипропоксазепамом (–6,49 ккал/моль) та капсазепіном (–6,39 ккал/моль) (табл. 4.16). Енергію зв'язування аналізували за допомогою MMGBSA (узагальнена площа поверхні молекулярної механіки) (табл. 4.17).

Таблиця 4.16

**Розрахована оцінка докінгу досліджуваних структур
з ланцюгом А TRPV1 рецептору**

Ліганд	Оцінка докінгу	Ліпофільні взаємодії	Водневі зв'язки	Ван-дер-Вальсові взаємодії	Кулонівська енергія взаємодії	Інші типи взаємодії
1	-7,71	-3,73	-0,30	-39,98	-9,01	-0,33
2	-6,40	-3,18	0	-32,18	-4,09	-0,99
3	-6,49	-2,43	0	-29,38	-6,11	-1,68
4	-7,66	-3,05	-0,21	-28,39	-4,67	-2,29
5	-6,82	-2,60	0	-26,09	-5,17	-2,41
6	-7,30	-3,15	-0,57	-35,73	-4,52	-1,12
7	-8,23	-4,02	-0,32	-46,03	-4,67	-0,9
8	-9,54	-4,48	-0,32	-42,82	-6,50	-1,64

Таблиця 4.17

**Енергія зв'язування рецептор ліганд комплексів розрахована за
допомогою Prime MMGBSA рецептор TRPV1 (ланцюг А)**

Ліганди	MMGBSA	Кулонівська енергія	Ковалентна енергія зв'язування	Енергія водневих зв'язків	Ліпофільна енергія взаємодії	Pi-pi взаємодії	Електростатичні взаємодії	Ван-дер-Ваальсові взаємодії
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	-61,98	-26,45	2,09	-1,53	-29,45	-0,44	37,67	-43,88
2	-48,45	-15,09	-0,46	-0,83	-25,12	-2,39	27,59	-32,15
3	-38,01	-18,48	7,67	-1,01	-15,89	-0,63	20,97	-30,65

Продовження таблиці 4.17

1	2	3	4	5	6	7	8	9
4	-43,14	-13,40	4,54	-0,42	-21,35	-0,72	16,18	-27,95
5	-37,51	-16,81	4,18	-1,02	-18,44	-0,52	23,46	-28,37
6	-40,96	-15,60	8,51	-1,27	-23,59	-0,59	30,53	-38,95
7	-61,12	-13,09	4,96	-0,70	-36,81	-0,25	41,22	-56,45
8	-71,63	-18,84	0,799	-0,77	-29,01	-1,22	24,22	-46,83

Крім того, пропоксазепам демонструє нижче значення вільного MMGBSA енергії зв'язування порівняно з оксазепамом і 3-гідроксопропоксазепамом. Враховуючи значення вільної енергії взаємодій, ліганди можна ранжувати наступним чином: SB-366791 > Капсаїцин > RTX > Капсазепін > Діазепам > Пропоксазепам > 3-гідроксопропоксазепам > Оксазепам (табл. 4.18). Важливо зазначити, що пропоксазепам демонструє найбільший внесок водневих зв'язків в енергію взаємодії MMGBSA з рецептором (-1,27 ккал/моль), після референтної сполки капсаїцину (табл. 4.18).

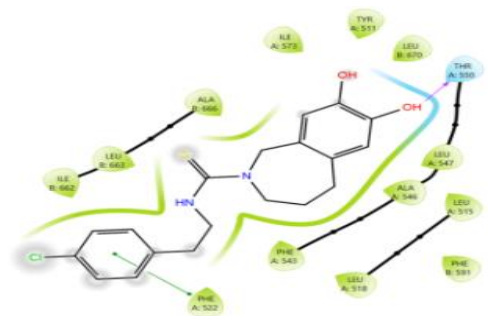
Пропоксазепам утворює два водневі зв'язки: один – між групою NH амідної групи (зона В - лінкер взаємодії Н-зв'язк) і THR550 білка, а інший – між киснем алкоксигрупи (гідрофобний хвіст) і TYR511 рецептора TRPV1. Інші бензодіазепіни також формують водневі зв'язки з рецептором. Наприклад, 3-гідроксопропоксазепам та оксазепам утворюють водневий зв'язок між гідроксильною групою діазепінового кільця та TYR511, а 3-гідроксопропоксазепам додатково утворює ще один водневий зв'язок між групою NH амідної групи діазепінового кільця та THR550 (рис. 4.16.).

Діазепам взаємодіє з рецептором через водневі зв'язки, використовуючи кисень амідної групи для взаємодії з TYR511. Ліганд, що має підтверджений вплив на рецептор TRPV1, також вступає у взаємодії з білком, утворюючи водневі зв'язки з тими ж амінокислотами, що й бензодіазепіни, а саме з THR550 та TYR511(рис. 4.16.). Капсаїцин використовує кисень амідної групи для утворення водневого зв'язку з THR511 рецептора, а гідроксильна група бензольного кільця взаємодіє з

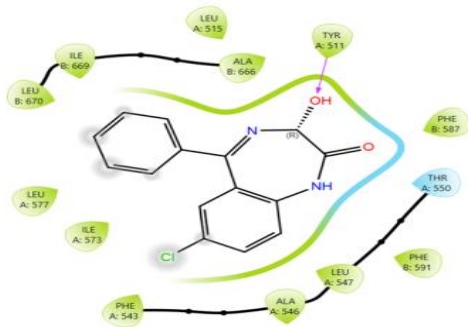
GLU570. Капсазепін утворює водневий зв'язок через свою ОН-групу з THR550. У взаємодії між RTX та рецептором TRPV1, TYR511 відіграє ключову роль, оскільки ця амінокислота утворює водневий зв'язок з естерною групою зони В. Щодо референтної сполуки SB-366791, то вона утворює один водневий зв'язок між киснем амідної групи та TYR511 (рис. 4.16.).



Капсаїцин



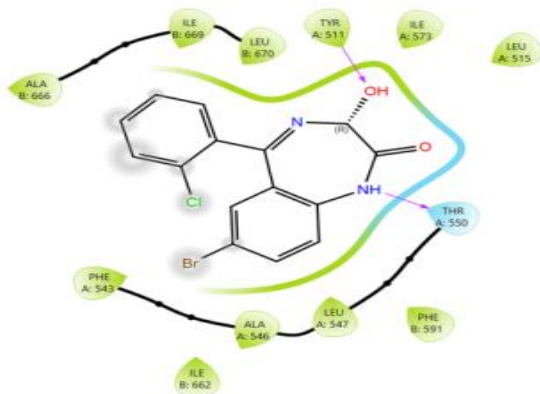
Капсазепін



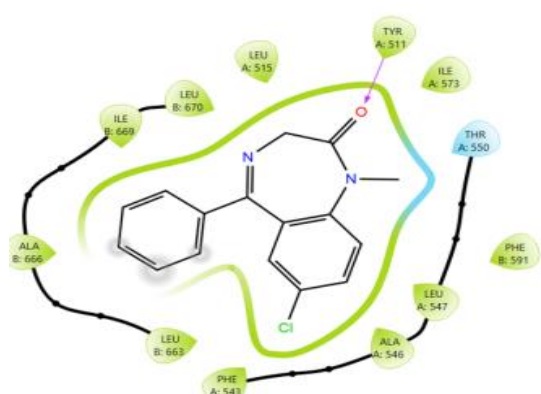
Оксазепам



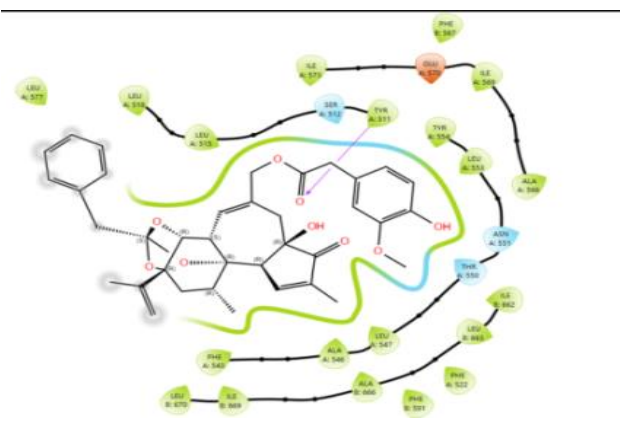
Пропоксазепам



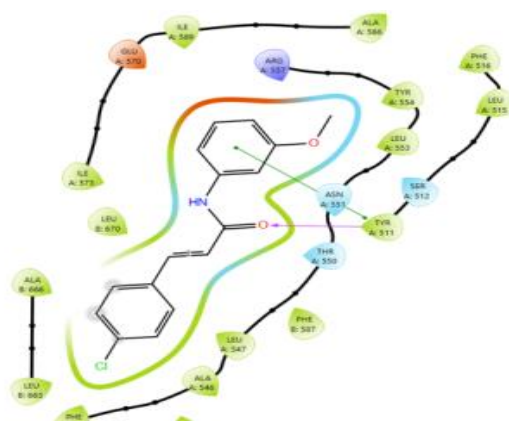
3-гідроксо-пропоксазепам



Діазепам



RTX



SB-366791

Рис. 4.16. Візуалізація розташування досліджуваних лігандів у сайті зв'язування TRPV1, підготовлене Maestro Schrödinger Suite

Наступним кроком було доповнення результатів молекулярного докінгу QSAR аналізом, що дозволяє надати додаткову кількісну оцінку активності лігандів.

У дослідженні була обрана модель `kpls_desc_19`. Ця модель має значення R^2 (коефіцієнт детермінації) регресії, яке становить 0,6445. R^2 вимірює, наскільки добре модель підходить до навчальних даних, і значення 0,6445 вказує на досить хорошу відповідність.

Модель «`kpls_desc_19`» має значення RMSE, яке становить 0,6601. Хоча це не найнижчий результат, він все ж таки є конкурентоспроможним. RMSE вимірює середню похибку прогнозу, і для моделі бажано, щоб це значення було якомога нижчим. Хоча RMSE цієї моделі не є найменшим, воно все ж перебуває в межах прийнятного діапазону.

Модель «`kpls_desc_19`» має значення Q^2 , яке становить 0,6430, що вказує на хорошу здатність до прогнозування для нових, невідомих даних. Це свідчить про те, що модель ймовірно буде робити точні прогнози за межами навчального набору даних. Q^2 MW (нульова гіпотеза): обрана модель має значення Q^2 MW 0,0042, що є позитивним і свідчить про те, що вона працює значно краще за модель нульової гіпотези. Це важливо, оскільки вказує на те, що модель має реальну прогностичну силу (рис. 4.17).

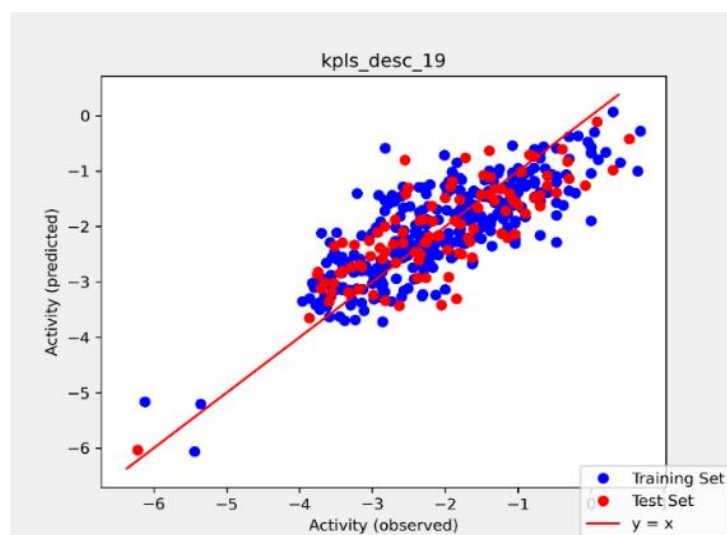


Рис. 4.17 Модель **kpls_desc_19**, створена за допомогою **Maestro Schrödinger Suite**, була використана для спостереження та прогнозування активності в навчальному та тестовому наборах даних

Через знак мінус вищі значення pIC_{50} вказують на експоненційно більшу потужність інгібіторів. Діазепам та оксазепам мають найнижчі передбачувані значення pIC_{50} , що свідчить про те, що модель прогнозує їх як сполуки, що проявляють меншу інгібіторну активність. Пропоксазепам має найвище передбачуване значення pIC_{50} , що означає, що модель прогнозує для нього найбільш виражені інгібіторні властивості по відношенню до TRPV1 рецептору (табл. 4.18).

Таблиця 4.18

**Прогнозований pIC_{50} досліджуваних сполук до TRRPV1 рецептору
шляхом QSAR аналізу**

	3-гідроксо- пропоксазепам	Діазепам	Оксазепам	Пропоксазепам
Pred pIC_{50}	-1,58	-2,283	-2,253	-1,115

У нашому дослідженні значення pIC_{50} для пропоксазепаму становить – 1,115, що вказує на його відносно низьку афінність до TRPV1. Однак значення pIC_{50} пропоксазепаму перевищує відповідні показники для інших

досліджених лігандів, що може свідчити про його сильніше зв'язування з рецептором порівняно з іншими сполуками [81].

4.6 Молекулярні механізми взаємодії пропоксазепаму з канабіноїдними рецепторами

За даними AutoDock Vina для білка 5TGZ, пропоксазепам має найнижчу оцінку (–8,8 ккал/моль), що свідчить про те, що він має найсильнішу афінність зв'язування порівняно з діазепамом (–7,4 ккал/моль) та оксазепамом (–7,9 ккал /моль). Для білка 5TGZ, 8GHV, 5XRA пропоксазепам має найнижчий показник ковзання GScore, що вказує на сильніше зв'язування порівняно з діазепамом і оксазепамом. Посилаючись на MMGBSA, пропоксазепам має нижчу енергію зв'язування зі структурами білків 5TGZ, 8GHV CB1R, ніж інші бензодіазепіни (табл. 4.19).

Таблиця 4.19

Результати докінгу похідних 1,4-бензодіазепіну з рецептором CB1 за допомогою програмного забезпечення AutoDock Vina та Schrödinger Maestro Glide

Білки	Пропоксазепам	Діазепам	Оксазепам	Референтні ліганди
5TGZ				ZDG
AutoDock Vina	-8,8	-7,4	-7,9	-12,2
Glide GScore	-9,5	-8,2	-8,9	-11,9
MMGBSA	-67,5	-50,7	-54,3	-109,0
8GHV				ZI5
AutoDock Vina	-8,5	-8,9	-8,9	-8,0
Glide GScore	-8,0	-7,2	-7,9	-9,7
MMGBSA	-63,4	-51,7	-47,8	-86,2
5XRA				8D3
AutoDock Vina	-8,9	-9,4	-9,6	-12,3
Glide GScore	-9,1	-8,6	-9,1	-11,9
MMGBSA	-57,1	-44,8	-57,7	-107,7
5XR8				8D0
AutoDock Vina	-9,3	-9,6	-10,2	-11,7
Glide GScore	-8,9	-8,6	-9,5	-12,18
MMGBSA	-55,3	-49,9	-63,4	-99,61

Пропоксазепам має нижчі значення MMGBS і Glide GScore з усіма дослідженими структурами CB1, ніж діазепам. Це вказує на вищу спорідненість пропоксазепаму до канабіноїдного рецептора 1.

Пропоксазепам створює водневий зв'язок із SER 383 через кисень амідної групи. Пропоксазепам також утворює зв'язок із залишком CYS 386 (у структурах 5TGZ і 8GHV) через атом хлору. Амінокислоти, які формують ван-дер-ваальсові взаємодії з найбільшим внеском у вільну енергію зв'язування, включають PHE 102, LEU 193, LEU 387, PHE 170, ILE 267, MET 103, TRP 356 і GLY 166. Залишок PHE 189 (у білках 5TGZ і 5XRA) утворює π - π стекингову взаємодію з бензольним кільцем (арильний замісник у 5-й позиції) пропоксазепаму. Оксазепам утворює водневі зв'язки через кисень амідної групи із залишком HIS 178 (у структурі 8GHV) і через азот амідної групи із SER 383 (у структурі 5XRA). Усі досліджувані бензодіазепіни формують π - π взаємодію із залишком PHE 268 (у структурах 8GHV і 5XRA).

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Вивчення взаємодії пропоксазепаму з ЦОГ-1, ЦОГ-2 та рецептором брадикініну може надати нові дані для розширення фармакологічного профілю сполуки, що є важливим для оптимізації її застосування в терапії. Пропоксазепам демонструє недостатню спорідненість до ключового ферменту синтезу простагландинів – циклооксигенази-1, оскільки взаємодії з нею переважно відбуваються через слабкі ван-дер-ваальсові зв'язки, а ідентифіковані ділянки зв'язування є неспецифічними. Взаємодія з циклооксигеназою-2 також може бути малоефективною, оскільки зв'язування відбувається поблизу активного центру, залучаючи амінокислотні залишки одного домену. Крім того, можливим є антагоністичний ефект при взаємодії з брадикініновим рецептором 1-го типу, що підтверджується збігом сайтів зв'язування з ендogenousним лігандом – брадикініном, а також високими значеннями середньої енергії зв'язування.

За результатами вивчення взаємодії Kv7.2 з ретигабіном, флупіртином, 4-амінопіридином, пропоксазепамом та оксазепамом встановлено, що пропо-

ксазепам має найвищу енергію зв'язування серед досліджених сполук (Auto-Dock -8,24 ккал/моль), навіть перевищуючи цей показник для референтної речовини – ретигабіну. Його просторове положення відрізняється тим, що він утворює гідрофобні зв'язки через атом бром у позиції «7», тоді як ретигабін взаємодіє через водневий зв'язок із залученням гідрогену -NH- групи. Взаємодія пропоксазепаму з Kv3.1 також характеризується найнижчим значенням енергії зв'язування (-6,44 ккал/моль), проте без формування водневих зв'язків.

Згідно з обчислювальним прогнозом Glide щодо NMDA рецептору, пропоксазепам має одну із найкращих оцінок докінгу -6,77 ккал/моль, для кінуренової кислоти цей показник складає - 6,60 ккал/моль, для кетаміну 5,34 ккал/моль та для N-метил-D-аспартату -4,32 ккал /моль. В результаті докінгу NMDA рецептору з вищевказаними лігандами можна відзначити, що найчастіше водневий зв'язок утворювався між Asp 616 з карбонільною групою (Н-акцептором) або вторинною аміногрупою і Phe 613 з вторинною аміногрупою.

Варто відзначити, що пропоксазепам демонструє помірну афінність до $\alpha 1A$ -адренорецепторів та високу спорідненість до PDE4, зокрема до PDE4B та PDE4D, що підтверджується низькими значеннями вільної енергії зв'язування. Взаємодії відбуваються через гідрофобний «затискач» та π - π стекінг-взаємодії, аналогічні референтним інгібіторам PDE4. Значення RMSD вказують на стабільність комплексу пропоксазепаму з PDE4A, що свідчить про його потенційну ефективність як інгібітора цього ферменту.

Результати *in silico* аналізу, показують, що пропоксазепам має найвищу афінність до каннабіноїдного рецептора 1 (CB1R) серед досліджених бензодіазепінів (діазепам та оксазепам). Це підтверджується його нижчими показниками в Glide GScore та MMGBSA, що свідчить про більш сприятливу енергію зв'язування. Крім того, утворення водневого зв'язку з амінокислотами, такими як SER 383, покращує взаємодію з рецептором. Загалом, ці результати вказують на потенціал пропоксазепаму як ліганда для CB1R, що робить

його перспективним для подальших досліджень у розробці препаратів, спрямованих на цей рецептор.

РОЗДІЛ 5

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Розробка нових дієвих знеболювальних препаратів є актуальним завданням сучасної медицини, оскільки, за даними ВООЗ, біль супроводжує приблизно 90% усіх захворювань [139]. У цій роботі були ідентифіковані молекулярні механізми антиноцицептивної дії інноваційного лікарського засібу пропоксазепаму з полімодальним механізмом дії.

Оцінка протизапальних властивостей сполук проводиться за допомогою моделей гострого (карагенановий набряк), підгострого (формаліновий набряк) та хронічного (ад'ювантний артрит) запалення. Проте в експериментальних фармакологічних дослідженнях на тваринах виникають певні труднощі, зокрема етичні питання та необхідність обґрунтування їхнього використання, якщо існують інші доступні методи. У зв'язку з цим, завданням першого етапу роботи, було проведення *in vitro* дослідження протизапальної активності пропоксазепаму та ряду похідних 1,4-бензодіазепіну за ефектом протективного впливу на стабільність сироваткового альбуміну в умовах термічної денатурації. Денатурація тканинних білків є однією з добре задокументованих причин запальних та артритних захворювань через утворення аутоантигенів [117]. Таким чином, сполуки, які можуть перешкоджати денатурації білка, є перспективними для розробки протизапальних препаратів.

Запалення є складним процесом, який регулюється специфічними медіаторами та супроводжується порушенням балансу антиоксидантної системи й утворенням вільних радикалів. Альбумін, завдяки присутності тіольних груп, відіграє важливу роль як антиоксидант і нейтралізатор вільних радикалів [1, 12]. Унаслідок цього процесу молекули альбуміну зазнають хімічних змін, що спричиняє втрату їхньої нативної конформації (часткову денатурацію), зниження адсорбційних і транспортних функцій, а також збільшення схильності до протеолітичної деградації.

Альбумін відомий своєю здатністю зв'язувати різноманітні ендogenousні та екзогенні сполуки, виконуючи функцію неспецифічного рецептора. Оскільки зв'язування з певними лігандами може стабілізувати молекулу альбуміну, можна очікувати, що такі сполуки матимуть загальний вплив на запалення. Так, для нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП) виявлено високу кореляцію між їх протизапальним ефектом і ступенем захисту від термічної денатурації в умовах *in vitro* [14], що, ймовірно, має синергічний ефект у організмі, комбінуючи свою активність з гальмуванням циклооксигеназ.

Це стало основою для оцінки можливого протективного ефекту пропоксазепаму щодо термічно індукованої денатурації сироваточного альбуміну. Окрім пропоксазепаму, також було вивчено протективний ефект низки похідних 1,4-бензодіазепіну – діазепаму, який має власне місце зв'язування з молекулою альбуміну, його метаболіту, оксазепаму та 3-гідроксипропоксазепаму – метаболіту пропоксазепаму [4]. Референтним препаратом для порівняння був ібупрофен, один з найбільш відомих НПЗП. Досліджувані сполуки виявляють певний вплив на гальмування процесу термічної денатурації БСА, що варіюється за величиною та характером прояву. Залежність "концентрація–ефект" для ібупрофену має класичний S-подібний вигляд з максимальним ефектом близько 60 %. Для похідних 1,4-бензодіазепіну спостерігається слабкий максимум, після якого ефект частково зменшується при підвищенні концентрації. Характерною особливістю для похідних 1,4-бензодіазепіну є порівняно низьке значення максимального ефекту, і лише для діазепаму цей показник перевищує 30 %, тоді як для 3-гідроксипропоксазепаму ефект є мінімальним. Ключовим показником ефективності протективної дії сполук є концентрація, за якої досягається напівмаксимальний ефект (IC_{50}) гальмування термічної денатурації. Найбільш ефективними виявляються діазепам і пропоксазепам (чим менша концентрація, тим вища активність сполуки), тоді як ібупрофен,

навіть з високим максимальним ефектом (% max), досягає порівняного напівмаксимального ефекту при значно вищих концентраціях.

Зі збільшенням концентрації сполук спостерігається певний "проденатураційний" ефект. Це може бути пов'язано не лише з посиленням зв'язування з діазепіновим сайтом БСА, але й із взаємодією з неспецифічними ділянками молекули білка, що спричиняє порушення його конформації та четвертинної структури. Проте в умовах *in vivo* такий ефект надлишкових концентрацій бензодіазепінів не має суттєвого впливу на стабільність сироваткового альбуміну, оскільки ці речовини використовуються в значно нижчих дозах.

Варто також зазначити, що сполуки з вільною гідроксигрупою в положенні 3 (наприклад, 3-гідроксипропексазепам та оксазепам) демонструють менший захисний ефект (згідно з величиною IC_{50}). Ймовірно, це пов'язано з тим, що полярна гідроксигрупа ускладнює зв'язування цих сполук із сироватковим альбуміном за даного типу взаємодії. За винятком пропексазепаму, похідні 1,4-бензодіазепіну не демонструють значного протизапального ефекту. Однак високі дози діазепаму можуть проявляти такі властивості в умовах карагенанового тесту, ймовірно, через його вплив на систему оксиду азоту (NO) [16].

Раніше було встановлено висока ефективність пропексазепаму в різних моделях запалення [16]. У тесті на набряк лапи, спричинений карагенаном, продемонстровано, що його інгібіторна активність залежить від дози, досягаючи максимального ефекту при дозі 10 мг/кг [16].

Формаліновий тест, чутливий до НПЗП і легких анальгетиків, включає дві фази: ранню (незапальний біль, викликаний прямою дією формаліну на ноцицептори) і пізню (запальний біль). Пропексазепам дозозалежно знижує ноцицептивну реакцію в обох фазах, досягаючи ефективності, порівнянної з диклофенаком натрію.

Є переконливі дані, що протизапальна дія сполук у карагенановій моделі пов'язана з участю кількох хімічних медіаторів, зокрема гістаміну,

серотоніну, брадикініну та простагландинів. Формалін-індукована ноцицепція пов'язана з прямою дією сполук на TRPA1-канали, які локалізовані на волокнах C [17, 142]. У той же час, експерименти з ізольованим сироватковим альбуміном показують, що карагенан і формалін у певних умовах можуть змінювати конформацію білка та викликати його денатурацію. Отже, виявлений захисний ефект проти термічної денатурації сироваткового альбуміну може слугувати додатковим неспецифічним механізмом дії деяких похідних 1,4-бензодіазепіну в умовах *in vivo*.

Результати дослідження стабілізації третинної структури макромолекули сироваткового альбуміну похідними 1,4-бензодіазепіну були доповнені аналізом складових їх взаємодії, виконаним за допомогою методу молекулярного докінгу. Основну роль у взаємодії досліджуваних сполук із сайтами ЛСА відіграють Ван-дер-Ваальсові зв'язки. Це зумовлено наявністю в молекулах функціональних груп, які сприяють поляризації (галогени) та π - π взаємодіям (ароматичні структури).

Відповідно до рівняння $\Delta G = -RT \ln K_p$, енергія зв'язування діазепаму, розрахована на основі константи рівноваги ($K_p = 1,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$), становить – 6,92 ккал/моль, що трохи нижче за значення, отримані в процесі докінгу. У випадку ібупрофену відповідно розраховане значення дорівнює –8,59 ккал/моль, що дуже близьке до даних молекулярного докінгу. Загалом результати для референтних сполук підтверджують, що розрахунки молекулярного докінгу відповідають реальним характеристикам зв'язування, хоча для діазепамового сайту спостерігається невелике завищення значень. Основну роль у процесах зв'язування сполук відіграють амінокислотні залишки, які утворюють Ван-дер-Ваальсові зв'язки в діазепамовому та ібупрофеновому місцях зв'язування.

Аналізуючи порівняльні характеристики докінгу сполук у діазепіновому та ібупрофеновому сайтах, можна дійти висновку, що похідні 1,4-бенздіазепіну (зокрема, пропоксазепам) взаємодіють із ЛСА більш ефективно. Це пояснюється не лише їхньою вищою енергією зв'язування, але

й здатністю зв'язуватись у кількох альтернативних ділянках, що забезпечує більш виражений результат у стабілізації молекули ЛСА. Це можна пояснити тим, що у тесті теплової денатурації зазначені сполуки виявляють більш виражений ефект, про що свідчать нижчі значення IC_{50} порівняно з ібупрофеном [20].

Наступним етапом дослідження було вивчення взаємодії пропоксазепаму з ключовими елементами больової та запальної сигналізації, оскільки ці механізми суттєво впливають на ефективність терапевтичного застосування сполуки.

Простагландини та лейкотрієни, які є метаболітами арахідонової кислоти, синтезуються під дією циклооксигеназ, тоді як брадикінін, активний пептид кінінової групи, утворюється через дію калікреїнів. Ці молекули відіграють ключову роль у модуляції больової чутливості. Серед засобів, які пригнічують активність циклооксигеназ і синтез простагландинів, найбільш поширені НПЗП. Брадикінінові рецептори як мішені для фармакологічної дії почали активно досліджувати лише в останні десятиліття, а препарат "Ікатібант" уже застосовується в клініці для лікування ангіоневротичного набряку. У цьому контексті дослідження простагландинових і брадикінінових механізмів анальгетичної та протизапальної дії пропоксазепаму є важливим кроком для оцінки фармакологічного потенціалу цієї сполуки.

На основі молекулярного докінгу для трьох ключових макромолекул, задіяних у периферичних механізмах болю, встановлено, що пропоксазепам проявляє слабку взаємодію з циклооксигеназою-1 (ЦОГ-1), формуючи переважно слабкі Ван-дер-Ваальсові зв'язки, а місця взаємодії є неспецифічними. Його середня енергія зв'язків значно поступається таким референтним сполукам, як ацетилсаліцилат, кеторолак, диклофенак і целекоксиб. Взаємодія пропоксазепаму з циклооксигеназою-2 (ЦОГ-2) також є обмеженою через локалізацію сайтів зв'язування поблизу активного центру в одному домені. Щодо брадикінінового рецептора I типу, пропоксазепам

проявляє потенційний антагонізм, про що свідчить його зв'язування в тих самих ділянках, що й ендogenousний ліганд – брадикінін, та високий рівень середньої енергії зв'язку. Це підтверджується експериментальними даними [48], де пропоксазепам демонструє функціональну активність у тензометричних дослідженнях, знижуючи викликані брадикініном скорочення гладких м'язів шлунка щурів ($pK_B = 6,41$). Ці результати дозволяють віднести пропоксазепам до можливих антагоністів брадикінінових рецепторів.

Пропоксазепам взаємодіє з низкою біологічних мішеней, які беруть участь у механізмах болю, зокрема гліциновими рецепторами, потенціал-залежними калієвими каналами, дофамінергічною системою, NMDA-рецепторами та альфа-1 адренорецепторами [17].

За результатами молекулярного докінгу пропоксазепам проявляє високу афінність до NMDA рецептору, маючи вільну енергію зв'язування MM-GBSA -45,82 ккал/моль. Пропоксазепам формує водневий зв'язок через оксиген амідної групи з AsnC616, що також притаманно референтному ліганду кетаміну.

Потенціал-залежні калієві канали (Kv) відіграють важливу роль у регуляції нейрональної збудливості та беруть участь у механізмах виникнення нейропатичного болю. Тому вони можуть слугувати перспективними мішенями для анальгетичних препаратів [146]. У дослідженні на моделі судом [69], викликаних 4-амінопіридином (інгібітором Kv), пропоксазепам продемонстрував помірну ефективність ($ED_{50} = 91,5 \pm 19,5$ мкмоль/кг). Навіть при введенні високих доз (80 мг/кг) ця сполука не забезпечувала повного (100 %) фармакологічного ефекту, що свідчить про відсутність суттєвої антагоністичної взаємодії з 4-амінопіридином на рівні зазначених рецепторів. Незважаючи на помірну активність пропоксазепаму на цьому тесті, наступною мішенню для докінг аналізу ми обрали потенціалзалежні калієві канали.

Нейропатичний біль є одним із видів больового синдрому, що виникає внаслідок пошкодження нервової системи. Дослідження свідчать, що зміни в експресії або функціонуванні калієвих (K^+) каналів відіграють важливу роль у розвитку та підтримці цього типу болю. Зокрема, у тваринних моделях нейропатичного болю спостерігається зниження експресії окремих K^+ каналів, що спричиняє підвищену збудливість нейронів і посилену больову чутливість. Отже, модуляція K^+ каналів може також стати перспективним підходом до лікування нейропатичного болю [105].

Оскільки бензодіазепіни виявляють різнобічну нейромодуляторну активність, є ймовірність їхньої взаємодії з Kv7.2. Для молекулярного докінгу використовували людський KCNQ2 (Kv7.2) у комплексі з ретигабіном. Згідно з первинними даними, у структурі KCNQ2-R, асоційованій з ретигабіном, об'ємна щільність молекули RTG спостерігається в гідрофобній кишені, утвореній S5, поровою спіраллю та S6 сусідньої субодиниці, розташованої на межі між субодиницями порового домену [146]. Взаємодія RTG з KCNQ2 відбувається переважно через водневі зв'язки з боковими ланцюгами Trp236, Ser303 і карбонільними групами основного ланцюга Leu299, Phe305, а також через гідрофобні взаємодії із залишками Trp236, Phe240, Leu243, Leu272, Leu299, Phe304 і Phe305.

Ретигабін демонструє здатність зв'язуватися з Kv7.2, що підтверджується розрахованою енергією взаємодії ($-7,67$ ккал/моль). Водночас пропоксазепам має ще нижчу вільну енергію зв'язування ($-8,24$ ккал/моль), що вказує на його вищу афінність до цього каналу. Такий показник зумовлений внеском гідрофобних взаємодій із залишками Pro308, Phe240, Trp236, Leu299, Leu243 і Phe100.

Завданням наступного етапу досліджень було обґрунтування взаємодії пропоксазепаму з альфа-1 адренорецептором та фосфодіестеразою 4, оскільки з попередніх досліджень проведених у Фізико-Хімічному інституті імені О. В. Богатського відомо, що анальгетична дія пропоксазепаму зумовлена впливом, зокрема, на альфа-1 адренорецептори [17, 68].

G білки часто асоціюються з аденілілциклазою, мембранно-асоційованим ферментом, який при активації зв'язаною з GTP альфа-субодиницею синтезує цАМФ з молекул АТФ. Цікаво відзначити, що цАМФ розщеплюється лише ферментативно шляхом гідролізу ферментами фосфодіестеразами (PDE). Ключова роль ферментів PDE4 у передачі сигналів цАМФ робить їх цікавими фармакологічними мішенями для модуляції рівнів цАМФ при різноманітних розладах. Таким чином, інгібування PDE4 було вивчено як терапевтичний підхід для посилення передачі сигналів цАМФ [33].

Вільямс та колеги у своїх дослідженнях з'ясовували, чи діють бензодіазепіни (такі як мідазолам, діазепам і лоразепам) як позитивні алостеричні модулятори (РАМ) $\alpha 1A$ - і $\alpha 1B$ -адренорецепторів (AR), які є залученими до скорочення гладкої мускулатури та передачі нейронних сигналів. Використовуючи очищені, стабілізовані рецептори та клітинні аналізи, дослідники не виявили прямого зв'язування бензодіазепінів з цими рецепторами. Хоча деякі бензодіазепіни, як виявилось, посилюють передачу сигналів цАМФ, цей ефект пояснюється нецільовим інгібуванням фосфодіестераз (PDE), а не прямою модуляцією $\alpha 1$ -AR. Дослідники продемонстрували, що позитивна модуляція стимуляції репортера елемента відповіді цАМФ (CRE) через активацію $\alpha 1$ -AR пояснюється здатністю діазепаму інгібувати фосфодіестеразу (PDE), відому мішень деяких бензодіазепінів. Білки $G\alpha q/11G$ передають сигнали $\alpha 1$ -AR, активуючи протеїн фосфоліпазу C (PLC). PLC утворює діацилгліцерин (DAG), активуючи фосфокіназу C (PKC) та інозитолтрифосфат (IP3) для вивільнення Ca^{2+} . Стимуляція виробництва цАМФ через стимульовану кальмодуліном аденілатциклазу (AC) також є вторинним ефектом активації AR. Можливо, що PKC і вторинне сполучення білка G також беруть участь в активації AC [43].

Інгібітори PDE4, в свою чергу, запобігають болю, посилюючи експресію Cx43 через передачу сигналів cAMP-PKA в спинному розі хребта.

Серед фосфодіестераз, саме фосфодіестераза 4 (PDE4) є основним ферментом, відповідальним за гідроліз цАМФ у нервових та імунних клітинах. Інгібування PDE4 має антиноцицептивну та протизапальну дію на мозок. Крім того, PDE4 регулює вироблення запальних цитокінів шляхом руйнування цАМФ [135, 83, 11]. Структурні характеристики PDE4 були визначені шляхом перегляду наукової літератури для проведення детального аналізу механізмів взаємодії між похідними 1,4-бензодіазепіну та PDE4. Структурні особливості різних ізоформ фосфодіестераз є подібними. Вони містять консервативний каталітичний домен із ~300 амінокислот, який розташований у С-кінцевій частині білка, регуляторні ділянки, які є специфічними для ізоформ та розташовані у їхніх N-кінцевих частинах [109]. Активний центр складається з трьох субкішень: М-кишеня (містить йони металів (Zn^{2+} і Mg^{2+}), важливі для гідролізу цАМФ), Q-кишеня (є найважливішим доменом для інгібування PDE4D, який додатково поділяється на гідрофобний зажим (Р-зажим) і консервативний пурин-селективний глутамін), S-кишеня (представляє собою заповнену розчинником бічну кишеню, що містить полярні залишки). Активний центр зв'язує інгібітори PDE за допомогою «гідрофобного затискача», що є критичною особливістю гідрофобної взаємодії та загального механізму зв'язування. Цей зажим, утворений парою висококонсервованих гідрофобних залишків, зазвичай включає фенілаланін (F446^{4B}, F372^{4D}) з одного боку в більшості членів родини PDE. Протилежна сторона зажиму також залишається гідрофобною, однак її склад може варіюватися, включаючи залишки валіну, лейцину або ізолейцину (I410^{4B}, I336^{4D}) у різних PDE [129].

Після оцінки цих досліджень ми провели молекулярний докінг похідних 1,4-бензодіазепу та референтних молекул з різними Cryo-EM структурами α 1A-адренергічних рецепторів і з різними підтипами PDE4, щоб дослідити компоненти взаємодії між цими лігандами та білками.

α 1A-адренергічний рецептор. Референтний ліганд оксиметазолін має найнижче значення K_i (16 нМ) серед трьох референтних сполук, що свідчить

про найвищу спорідненість до мішені. Його ΔG_{exp} (–12,07 ккал/моль) та MMGBSA (–83,89 ккал/моль) значення також значно негативніші, ніж у норепінефрину та епінефрину, що додатково підтверджує високу афінність зв'язування. Значення MMGBSA для референсних сполук (норепінефрин, епінефрин та оксиметазолін) добре корелюють з експериментальними даними, що підсилює надійність методу MMGBSA для прогнозування спорідненості лігандів до білків. У порівнянні з пропоксазепамом, його метаболіт 3-гідроксипропоксазепам демонструє вищий прогнозований афінитет до $\alpha 1A$ -адренергічного рецептора, завдяки утворенню більшої кількості водневих зв'язків за рахунок гідроксильної групи.

Фосфодіестераза 4. Пропоксазепам демонструє вищу спорідненість до PDE4 у порівнянні з діазепамом та оксазепамом для різних ізоформ цього ферменту, що підтверджується більш негативними прогнозованими енергіями зв'язування. Це вказує на вищий потенціал пропоксазепаму створювати стабільний комплекс з ізоформами PDE4.

PDE4A. Пропоксазепам і його метаболіт 3-гідроксипропоксазепам демонструють сприятливу взаємодію з PDE4A, на що вказують низькі значення MMGBSA (–55,1 ккал/моль для 3I8V та –60,7 ккал/моль 3TVX) та висока оцінками докінгу згідно результатів AutoDock Vina (–8,7 ккал/моль для 3I8V та –9,2 ккал/моль для 3TVX). Залишки, такі як Phe 584, Ile 548 та Tyr 371, стабільно утворюють сильні взаємодії з багатьма лігандами, переважно через π - π взаємодії (структури 3I8V, 3TVX). Це свідчить про їх важливість у розпізнаванні та зв'язуванні лігандів. Моделювання за методом молекулярної динаміки проводилося протягом 12 нс з використанням комплексів PDE4A 3TVX – ліганд для складових молекулярних взаємодій. Початкове середньоквадратичне значення після перших 6 нс і кінцеве середньоквадратичне значення для 3TVX у комплексі з еталонними лігандами (PNX) як позитивного контролю становили 0,839 Å і 1,273 нм відповідно протягом усього періоду моделювання (коливання: 0,434 Å). Таким чином, потенційні хімічні кандидати повинні мати діапазон

середньоквадратичного відхилення менше 0,434 Å. Протягом періоду моделювання початкове середньоквадратичне значення після перших 6 нс і кінцеве середньоквадратичне значення для комплексу білок-пропоксазепам 3TVX становили 0,837 і 1,095 Å відповідно (коливання: 0,258 Å). Значення RMSD для PDE4A(3TVX) у комплексі з пропоксазепамом були меншими, ніж для PDE4A без ліганду та PDE4A з контрольним лігандом (PNX). Це вказує на те, що пропоксазепам може стабілізувати білок. PDE4A у комплексі з 3-гідроксипропоксазепамом також має менші коливання, ніж позитивний контроль також у комплексі з PDE4A(3TVX). Усі значення RMSD були нижчими за 2 Å, що вказує на стабільні взаємодії ліганду з білком для всіх симуляцій МД. Приєднання пропоксазепаму до PDE4A зменшує коливання амінокислотного залишку MET 289. Рухливість залишків у комплексах PDE4A нижча, ніж у залишків у комплексах PDE4B та PDE4D, що може свідчити про вищу стабільність комплексу білок-ліганд.

PDE4B. Згідно з прогнозованими результатами AutoDock Vina та MMGBSA, 3-гідроксипропоксазепам створює найстабільніший комплекс серед інших похідних 1,4-бензодіазепіну з PDE4B(4KP6), маючи найнижчі значення оцінки докінгу -9,8 та -29,1 ккал/моль відповідно. Пропоксазепам демонструє сильну спорідненість зв'язування (-10,3 ккал/моль) з PDE4B (3W5E) порівняно з діазепамом (-9,3 ккал/моль) і 3-гідроксипропоксазепамом (-9,3 ккал/моль), що видно з більш негативних прогнозованих результатів AutoDock Vina. Пропоксазепам і його метаболіт 3-гідроксипропоксазепам розташовані в активному центрі PDE4B (3W5E) і створюють взаємодії із залишками Q-кишені в гідрофобному затискачі (P-затискачі) PHE 446 і ILE 410, що є важливою особливістю гідрофобної взаємодії інгібіторів з PDE4B [8]. Залишки TYR 233, GLN 443, ILE 410 і PHE 446 (кишеня Q) і PHE 414 (кишеня S) мають найвищі показники взаємодії, що відображає вирішальну роль цих залишків у взаємодії. Значення RMSD комплексу PDE4B(3W5E)-пропоксазепам трохи вище (0,429 Å), ніж RMSD для білка без ліганду (0,201 Å) або з еталонним лігандом – NVW (0,386 Å). Це може вказувати на

відмінності в специфічності зв'язування або спорідненості між пропоксазапам і білком порівняно з еталонним лігандом. Результати RMSF для PDE4B вказують на нижчі коливання залишків кишені M (найбільш консервативної серед структури ферменту PDE4) каталітичного домену в комплексі білок-ліганд (усі досліджувані сполуки) порівняно з білком без ліганду, що підтверджує висновки, що зв'язування ліганду стабілізує структуру білка.

PDE4D. Результати прогнозування AutoDock Vina показали, що пропоксазапам і 3-гідроксипропоксазапам мають найнижчі оцінки докінгу (-8,8 ккал/моль і -9,0 ккал/моль), що означає високу спорідненість цих лігандів до 6IM6. На відміну від Vina, Schrodinger Suite демонструє створення нестабільного комплексу 6IM6-пропоксазапам. Але його метаболіт 3-гідроксипропоксазапам утворює подібний водневий зв'язок з HIP 160 (6IM6) (M-кишеня) за допомогою кисню амідної групи як еталонний ліганд AN3 (за допомогою кисню альдегідної групи), що підкреслює подібність механізмів взаємодії. Пропоксазапам має найвищу передбачувану енергію зв'язування з 2FMO згідно з методом MMGBSA (-52,6 ккал/моль), за яким слідує 3-гідроксипропоксазапам (-43,9 ккал/моль). Залишки PHE 372 та ILE 336 мають один із найвищих вкладів у вільну енергію зв'язування для більшості лігандів, особливо для пропоксазапаму та його метаболіту 3-гідроксипропоксазапаму. Ці залишки відіграють значну роль інгібіторів гідрофобної взаємодії ФДЕ. Діапазон RMSD PDE4D(6IM6) у комплексі з пропоксазапамом вищий, ніж PDE4D(6IM6)-комплекс ліганду порівняння, це означає, що комплекс з 1,4-бензодіазепіном менш стабільний. Комплекси 6IM6 - пропоксазапам і 6IM6-3-гідроксипропоксазапам мають менші коливання залишків PHE 372 (на ділянці 286), ILE 336 (на ділянці 250) порівняно з білком без ліганду. Стабілізуючи ці залишки, похідні 1,4-бензодіазепіну створюють з ним стійку гідрофобну взаємодію. Можна спостерігати, що криві RMSD для атомів скелета PDE4D (6IM6) без ліганду досягають 1,447 Å при 6,1 нс, але PDE4D (6IM6) у комплексі з

пропоксазепамом RMSD становить 0,971 Å. Таким чином, зв'язування пропоксазепаму зробило комплекс більш стабільним. Рухливість залишків комплексу PDE4D(6IM6) – 3-гідроксипропоксазепам і PDE4D без ліганду була найвищою серед комплексів PDE4D з лігандами. Пропоксазепам демонструє помірну спорідненість до $\alpha 1A$ -адренорецепторів та сильну взаємодію з фосфодіестеразою 4 (PDE4), що дозволяє прогнозувати його інгібуючий ефект і потенційну терапевтичну активність як анальгетика та протизапального засобу.

В наступному етапі дослідження, для поглиблення розуміння анальгетичної дії пропоксазепаму нами було обрано одну з найпопулярніших мішеней для лікування болю, TRPV1 рецептор. Капсаїциноподібні ліганди TRPV1 мають чітко визначену фармакофорну модель, що складається з послідовного розташування трьох хімічних структур: голівка арильної взаємодії, шийка (лінкер взаємодії Н-зв'язку) і хвіст (ліпофільний ланцюг). Ці фармакофорні особливості можна виявити як в агоністів TRPV1, так і в антагоністів. Ванілоїдна група (4-гідрокси-3-метоксифеніл) розташована в головній області ліганду капсаїцину [27]. Широкий спектр синтезованих лігандів TRPV1, таких як катехолвмісні структури, похідні 2,3-дигідро-1,4-бензодіоксину, 3-фтор-4-(метилсульфоніламіно)фенілвмісні структури та халкони, містять інші групи, а не ванілоїдний фрагмент [28].

В результаті дослідження було виявлено, що пропоксазепам має необхідні фармакофорні особливості, що присутні в структурах відомих лігандів TRPV1, а саме арильна область взаємодії (A), амідна область (B) і гідрофобний ланцюг (C). Це дозволяє припустити ймовірну здатність пропоксазепаму утворювати стабільну взаємодію з TRPV1 в відомому сайті зв'язування цього рецептору. Окрім того, docking score, як кількісна оцінка взаємодії між лігандом та цільовим рецептором для пропоксазепаму вища (–7,30 ккал/моль) ніж для оксазепаму, метаболіту пропоксазепаму 3-гідроксипропоксазепаму та капсазепіну. Це дає підстави вважати, що пропоксазепам має більший потенціал для ефективного зв'язування з

рецептором. Вільна енергія зв'язування для пропоксазепаму становить $-40,96$ ккал/моль, що також є кращим результатом у порівнянні з 3-гідроксипропоксазепамом і оксазепамом. Варто відзначити, що один із найбільших вкладів водневих зв'язків у вільну енергію зв'язування належить пропоксазепаму, поступаючись лише капсаїцину. Проте, незважаючи на позитивні результати молекулярного докінгу, QSAR аналіз демонструє низький аффінітет пропоксазепаму до TRPV1, що підтверджується передбаченими значеннями pIC_{50} $-1,115$, які, в свою чергу, є вищими, ніж у інших похідних 1,4-бензодіазепінів. Низькі значення pIC_{50} вказують на меншу інгібіторну активність лігандів по відношенню до TRPV1 рецептору, що відображає, слабшу афінність до цільового білка, відповідно речовина менш ймовірно впливатиме на його активність. Отже, отримані дані молекулярного докінгу демонструють обнадійливі результати щодо створення стабільної взаємодії пропоксазепаму з TRPV1 рецептором, однак низькі спрогнозовані значення pIC_{50} QSAR аналізом свідчать про необхідність високих концентрацій сполуки для досягнення 50% інгібування рецептора. Це також може означати, що хоча пропоксазепам показує потенціал для взаємодії з TRPV1 рецептором на основі результатів молекулярного докінгу, його фактичний зв'язок з рецептором в реальних біологічних умовах може бути менш ефективним, ніж очікувалося.

Наступною білковою мішенню було обрано канабіноїдний рецептор CB1. Дослідження Гарсія-Гутьєррес та колег, показали, що миші, генетично модифіковані на відсутність канабіноїдних рецепторів CB1 (CB1 $^{-/-}$), демонстрували вищий рівень тривожності та не реагували на антитривожні ефекти бензодіазепінів. Це означає, що бензодіазепіни можуть проявляти свою заспокійливу дію частково через рецептори CB1. Результати, отримані в цьому дослідженні, чітко свідчать про те, що анксиолітична дія бензодіазепінів була пов'язана з функціональною активацією рецептора CB1 в мигдалеподібному тілі і областях гіпокампу [59]. Також відомо, що активація рецепторів канабіноїдів 1 (CB1) і канабіноїдів 2 (CB2) знижує

ноцицептивну обробку в гострих і хронічних тваринних моделях болю [59]. Сучасна розробка ліків, спрямованих на CB1R або CB2R, здебільшого зосереджена на маломолекулярних сполуках, які взаємодіють із тим самим сайтом зв'язування, що й фітоканабіноїди. Це місце зв'язування було детально досліджено, що дозволило створити низку ключових сполук, таких як римонабант і WIN-55,212, оптимізованих для його взаємодії [126] (рис. 5.1).

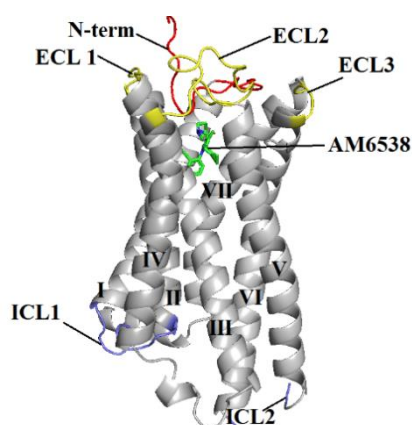


Рис. 5.1 Кристалічна структура канабіноїдного рецептора людини CB1 в комплексі з лігандом AM6538 (PDB 5TGZ)

Примітка: ICL - внутрішньоклітинна петля, CL - позаклітинна петля

Згідно з прогнозованими результатами AutoDock Vina, MMGBSA та Glide GScore, пропоксазепам демонструє найвищу афінність зв'язування з CB1R (5TGZ, 8GHV, 5XRA) порівняно з діазепамом та оксазепамом, що підтверджується його нижчими енергетичними показниками. Крім того, він утворює водневий зв'язок із SER 383, що може сприяти його стабільнішій взаємодії з рецептором.

Отримані результати дозволяють глибше зрозуміти молекулярні механізми дії пропоксазепаму та його потенційний внесок у регуляцію больової чутливості. Ідентифіковані сайти зв'язування пропоксазепаму з рядом білків ЛСА, ЦОГ-1, ЦОГ-2, брадикінінові рецептори, NMDA рецептор, потенціалзалежні калієві канали (Kv7.2, Kv3.1) NMDA рецептор, альфа-адренорецептор А, фосфодіестераза 4, TRPV1 рецептор та канабіноїдний

рецептор CB1. Серед вивчених білків пропоксазепам виявляє високу афінність до ЛСА, брадикінінових рецепторів, Kv7.2, NMDA рецептору та фосфодіестераза 4 рис. (5.2). З іншими білковими молекулами пропоксазепам формує помірної сили та стабільності взаємодії. Перспективи подальших досліджень включають валідацію ідентифікованих взаємодій у біологічних моделях та оцінку клінічного потенціалу пропоксазепаму як анальгетика нового покоління.

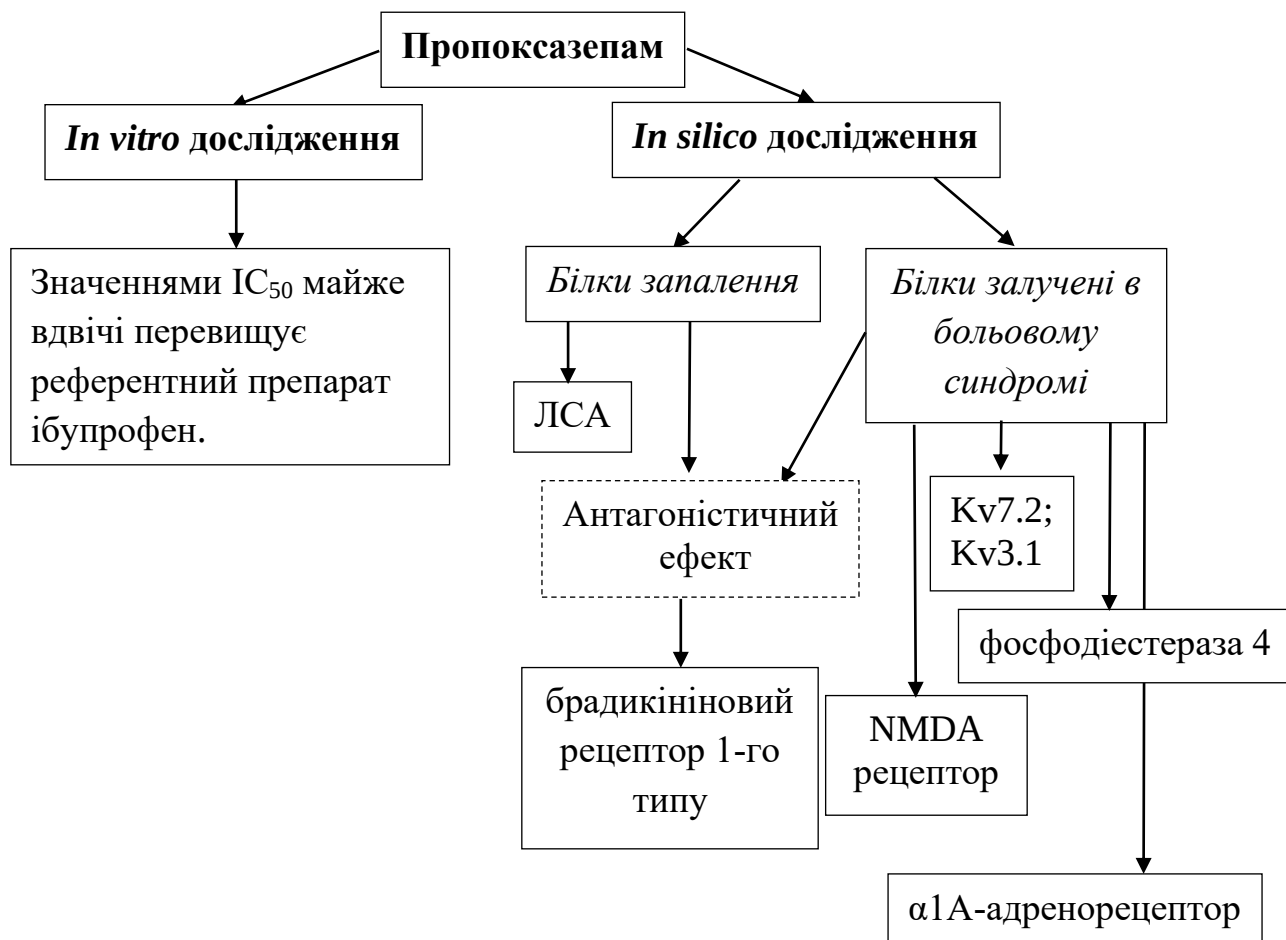


Рис. 5.2 Схема проведеного дослідження

ВИСНОВКИ

За результатами досліджень анальгетичних та протизапальних ефектів алкоксіпохідних 1,4-бензодіазепіну, проведених методами *in silico* було встановлено, що основний внесок у їх реалізацію відбувається через ГАМК-ергічну систему. Однак також виявлено потенційні рецепторні мішені, з якими може відбуватися взаємодія для реалізації зазначених дій - брадикініновий рецептор 1-го типу, NMDA рецептор, фосфодіестераза 4, TRPV1 рецептор та каннабіноїдний рецептор 1.

1. Похідні 1,4-бензодіазепіну демонструють певний захисний ефект проти термічної денатурації БСА. За значеннями IC_{50} діазепам і пропоксазепам майже вдвічі перевищують референтний препарат ібупрофен, хоча поступаються йому за рівнем максимального ефекту. Сполуки оксазепам і 3-гідроксипропоксазепам проявляють менш виражену дію. Поляризованість молекул похідних 1,4-бензодіазепіну має значний вплив на їхню взаємодію з БСА та виразність захисного ефекту, переважаючи роль ліпофільності. Тому, індукційна взаємодія відіграє ключову роль у процесі зв'язування з сироватковим альбуміном.

2. Результати молекулярного докінгу до сайтів зв'язування діазепаму та ібупрофену в ЛСА з референтними сполуками – діазепамом і ібупрофеном – свідчать про їхню перехресну спорідненість до цих ділянок. Водночас діазепам має високу енергію взаємодії зі своїм власним сайтом (–9,38 ккал/моль) порівняно з ібупрофеновим (–7,32 ккал/моль). Пропоксазепам демонструє найбільшу енергію зв'язування з діазепамовим сайтом (–10,27 ккал/моль). Взаємодія пропоксазепаму відбувається через атом броду (в положенні «7»), тоді як діазепам утворює зв'язок за рахунок кисню карбонільної групи гетероцикла. В ібупрофеновому сайті зв'язування пропоксазепам, ймовірно, взаємодіє з іншою ділянкою, проте залучає спільні амінокислотні залишки.

3. Пропоксазепам демонструє недостатню спорідненість до циклооксигенази-1, оскільки взаємодії з нею переважно відбуваються через слабкі ван-дер-

ваальсові зв'язки, а ідентифіковані ділянки зв'язування є неспецифічними. Взаємодія з циклооксигеназою-2 є малоефективною, оскільки зв'язування відбувається поблизу активного центру, залучаючи амінокислотні залишки одного домену. Можливим є антагоністичний ефект при взаємодії з брадикініновим рецептором 1-го типу, що підтверджується збігом сайтів зв'язування з брадикініном, а також високими значеннями середньої енергії зв'язування.

4. Пропоксазепам проявляє високий афінітет до NMDA рецептора. За результатами молекулярного докінгу до Kv7.2 з ретигабіном, флупіртином, 4-амінопіридином, пропоксазепамом та оксазепамом встановлено, що пропоксазепам має найвищу енергію зв'язування серед досліджених сполук ($-8,24$ ккал/моль), перевищуючи цей показник для референтної речовини ретигабіну. Пропоксазепам утворює гідрофобні зв'язки через атом броду в позиції «7», тоді як ретигабін взаємодіє через водневий зв'язок із залученням гідрогену NH- групи. Взаємодія пропоксазепаму з Kv3.1 також характеризується найнижчим значенням від'ємної енергії зв'язування ($-6,44$ ккал/моль), проте без формування водневих зв'язків.

5. Пропоксазепам демонструє помірну афінність до $\alpha 1A$ -адренорецепторів та високу спорідненість до PDE4, зокрема до PDE4B та PDE4D, що підтверджується низькими значеннями вільної енергії зв'язування. Взаємодії відбуваються через гідрофобний «затискач» та π - π стекінг-взаємодії, аналогічні референтним інгібіторам PDE4. Значення RMSD вказують на стабільність комплексу пропоксазепаму з PDE4A, що свідчить про його потенційну ефективність як інгібітора цього ферменту.

6. Пропоксазепам має необхідні фармакофорні властивості моделі лігандів TRPV1 та демонструє помірну афінність до цього рецептору. Пропоксазепам має найсильнішу афінність до каннабіноїдного рецептора 1 (CB1R) серед досліджених бензодіазепінів (діазепам та оксазепам). Утворення водневого зв'язку з амінокислотами, такими як SER 383, покращує взаємодію з рецептором. Це вказує на потенціал пропоксазепаму як ліганда для CB1R, що є перспективним для подальшої розробки препаратів, спрямованих на цей рецептор.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Головенко М. Я. Пропоксазепам – новаторський анальгетичний засіб, що гальмує гострий та хронічний біль і має полімодальний механізм дії. *Вісник Національної академії наук України*. 2021. № 4. С. 76–90. URL: <https://doi.org/10.15407/visn2021.04.076>
2. Докінг-аналіз взаємодії пропоксазепаму з діазепамовим та ібупрофеновим місцями зв'язування людського сироваткового альбуміну / В. Б. Ларіонов та ін. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2022. Т. 16, № 1. <https://doi.org/10.33250/16.01.045>
3. Клігуненко Є. Н., Зозуля О. А. Людський сироватковий альбумін (минуле та майбутнє). *Медицина нагальних станів*. 2017. №5 (84). С. 26-31.
4. Пригнічення термоіндукованої денатурації бичачого сироваткового альбуміну пропоксазепамом і його фармакологічні наслідки / В. Б. Ларіонов та ін. *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine*. 2022. № 3. С. 77–86. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2022.03.077>
5. Простагландинний і брадикініновий механізми анальгетичної та протизапальної дії пропоксазепаму: дані молекулярного докінгу / В. Б. Ларіонов та ін. *Medical and Clinical Chemistry*. 2022. № 1. С. 9–19. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681x.2022.i1.13033>
6. Прогнозування механізмів взаємодії кверцетину, α -циперметрину та його похідних з α -рецептором естрогену (дослідження *in silico*) / А.С. Акішева та ін. *Вісник ОНУ. Біологія*. 2024. Т. 29, вип. 1(54). С. 81 – 105. [https://doi.org/10.18524/2077-1746.2024.1\(54\).309040](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2024.1(54).309040)
7. A distinct structural mechanism underlies TRPV1 activation by piperine / Y. Dong et al. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2019. Vol. 516 (2). P. 365–372. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.06.039>
8. A Drug Repurposing Approach for Antimalarials Interfering with SARS-CoV-2 Spike Protein Receptor Binding Domain (RBD) and Human Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) / P. Coghi et al. *Pharmaceuticals*.

2021. Vol. 14 (10). P. 954. <https://doi.org/10.3390/ph14100954>

9. A phase I study evaluating the pharmacokinetic profile of a novel oral analgesic propoxazepam/ M.Y. Golovenko et al. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*. 2023. Vol. 17(3). P. 138–144. doi: 10.26444/jpccr/169426

10. Albumin-mediated regulation of cellular glutathione and nuclear factor kappa B activation / A. M. Cantin, B. Paquette, M. Richter, P. Larivée. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2000. Vol. 162 (4). P. 1539–1546. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.4.9910106>.

11. Al-Nema M., Gaurav A., Lee V. S. Docking based screening and molecular dynamics simulations to identify potential selective PDE4B inhibitor. *Heliyon*. 2020. Vol. 6 (9). P. e04856. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04856>

12. An effector analysis of the interaction of propoxazepam with antagonists of GABA and glycine receptors / N. Y. Golovenko, V.B. Larionov, A.S. Reder, I.P. Valivodz. *Neurochemical Journal*. 2017. Vol. 11 (4). P. 302–308. <https://doi.org/10.1134/s1819712417040043>

13. Angiotensin II type 1 receptor blockers decrease kynurenic acid production in rat kidney in vitro / I. Zakrocka et al. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2018. Vol. 392 (2). P. 209–217. URL: <https://doi.org/10.1007/s00210-018-1572-7>

14. Antiallodynic effect of propoxazepam at monoiodoacetate-induced osteoarthritis in rats / M. Y. Golovenko et al. *PAIN, JOINTS, SPINE*. 2025. Vol. 14 (4). P. 199–204. <https://doi.org/10.22141/pjs.14.4.2024.438>

15. Anticancer activity of anandamide in human cutaneous melanoma cells / B. Adinolfi et al. *European Journal of Pharmacology*. 2013. Vol. 718 (1-3). P. 154–159. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.08.039>

16. Anti-inflammatory effects of propoxazepam on different models of inflammation. / N. Y. Golovenko et al. *International Journal of Medicine and Medical Research*. 2020. Vol. 5 (2). P. 105–112 <https://doi.org/10.11603/ijmmr.2413-6077.2019.2.10900>

17. Antinociception induced by a novel benzodiazepine receptor agonist and bradykinin receptor antagonist in rodent acute and chronic pain models/ M. Y. Golovenko et al. (2018). *European Journal of Biomedical and Biopharmaceutical Sciences*. 2018. Vol. 5 (12). P. 79-88.
18. Are Voltage-Gated Sodium Channels on the Dorsal Root Ganglion Involved in the Development of Neuropathic Pain? / W. Wang et al. *Molecular Pain*. 2011. Vol. 7. P. 1744–8069–7–16. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-7-16>
19. AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings / J. Eberhardt et al. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2021. Vol. 61 (8). P. 3891–3898. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203>
20. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility / G. M. Morris et al. *Journal of Computational Chemistry*. 2009. Vol. 30 (16). P. 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
21. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform / M. D. Hanwell et al. *Journal of Cheminformatics*. 2012. Vol. 4, (1). <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>
22. Bagasrawala I., Zecevic N., Radonjić N. V. N-Methyl D-Aspartate Receptor Antagonist Kynurenic Acid Affects Human Cortical Development. *Frontiers in Neuroscience*. 2016. Vol. 10. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00435>
23. Baillie G. S., Tejeda G. S., Kelly M. P. Therapeutic targeting of 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases: inhibition and beyond. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2019. Vol. 18 (10). P. 770–796. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0033-4>
24. Berman H. M. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*. 2000. Vol. 28 (1). P. 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
25. Binding Modes and Selectivity of Cannabinoid 1 (CB1) and Cannabinoid 2 (CB2) Receptor Ligands / J.-F. Yang et al. *ACS Chemical*

Neuroscience. 2020. Vol. 11 (2)0. P. 3455–3463.
<https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.0c00551>

26. BIOVIA, Dassault Systèmes, BIOVIA Workbook, Release 2020; BIOVIA Pipeline Pilot, Release 2020, San Diego: Dassault Systèmes, [2021].

27. Caballero J. A new era for the design of TRPV1 antagonists and agonists with the use of structural information and molecular docking of capsaicin-like compounds. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2022. Vol. 37(1). P. 2169–2178.
<https://doi.org/10.1080/14756366.2022.2110089>.

28. Caballero J. Computational Modeling to Explain Why 5,5-Diarylpentadienamides are TRPV1 Antagonists. *Molecules*. 2021. Vol. 26 (6) P. 1765. <https://doi.org/10.3390/molecules26061765>

29. Chincholkar M. Gabapentinoids: pharmacokinetics, pharmacodynamics and considerations for clinical practice. *British Journal of Pain*. 2020. Vol. 14 (2). P. 104–114. URL: <https://doi.org/10.1177/204946372091249>

30. Chronic pain as a symptom or a disease / R.-D. Treede et al. *PAIN*. 2019. Vol. 160 (1). P. 19–27. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001384>

31. Clinical and Molecular Genetics of the Phosphodiesterases (PDEs) / M. F. Azevedo et al. *Endocrine Reviews*. 2013. Vol. 35 (2). P. 195–233.
<https://doi.org/10.1210/er.2013-1053>

32. Cohen S. P., Vase L., Hooten W. M. Chronic pain: an update on burden, best practices, and new advances. *The Lancet*. 2021. Vol. 397 (10289). P. 2082–2097. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)00393-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)00393-7)

33. Computational investigation of the dynamic control of cAMP signaling by PDE4 isoform types / D. Paes et al. *Biophysical Journal*. 2022. Vol 121 (14). P. 2693-2711 <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.06.019>

34. Conn P. M., Prescott S. A., Ratté S. Conn's Translational Neuroscience. Somatosensation and Pain. *Elsevier Science & Technology Books*. 2016. Chapter 23. P. 517-539.

35. Consensus Analyses in Molecular Docking Studies Applied to Medicinal Chemistry / M. dos Santos Maia et al. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2020. Vol. 20 (14). P. 1322–1340. <https://doi.org/10.2174/1389557520666200204121129>
36. Consensus Scoring Criteria for Improving Enrichment in Virtual Screening / J.-M. Yang et al. *J. Chem. Inf. Model.* 2005. V. 45 (4). P.1134–1146.
37. Contributions of Different Modes of TRPV1 Activation to TRPV1 Antagonist-Induced Hyperthermia / A. Garami et al. *Journal of Neuroscience*. 2010. Vol. 30 (4). P. 1435–1440. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.5150-09.2010>
38. Costigan M., Scholz J., Woolf C. J. Neuropathic Pain: A Maladaptive Response of the Nervous System to Damage. *Annual Review of Neuroscience*. 2009. Vol. 32 (1). P. 1–32. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135531>
39. Deciphering nociplastic pain: clinical features, risk factors and potential mechanisms / C. M. Kaplan et al. *Nature Reviews Neurology*. 2024. <https://doi.org/10.1038/s41582-024-00966-8>
40. Deng M., Chen S.-R., Pan H.-L. Presynaptic NMDA receptors control nociceptive transmission at the spinal cord level in neuropathic pain. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019. Vol. 76 (10). P. 1889–1899. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03047-y>
41. Design, synthesis and biological evaluation of novel benzoxaborole derivatives as potent PDE4 inhibitors for topical treatment of atopic dermatitis / Z. Chu et al. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2021. Vol. 213. P. 113171. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113171>
42. Diazepam effects on carrageenan-induced inflammatory paw edema in rats: Role of nitric oxide / R. Lazzarini et al. *Life Sciences*. 2006. Vol. 78, (26). P. 3027–3034. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.11.032>
43. Diazepam is not a direct allosteric modulator of α 1 -adrenoceptors, but modulates receptor signaling by inhibiting phosphodiesterase-4 / L. M. Williams та ін. *Pharmacology Research & Perspectives*. 2018. Vol. 7 (1). C. e00455. <https://doi.org/10.1002/prp2.455>

44. Donadio C., Tognotti D., Donadio E. Albumin modification and fragmentation in renal disease. *Clinica Chimica Acta*. 2012. Vol. 413 (3-4). P. 391-395. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.11.009>
45. Drummond P. Neuronal changes resulting in up-regulation of alpha-1 adrenoceptors after peripheral nerve injury. *Neural Regeneration Research*. 2014. Vol. 9 (14). P. 1337. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.137583>
46. Du X., Gamper N. Potassium Channels in Peripheral Pain Pathways: Expression, Function and Therapeutic Potential. *Current Neuropharmacology*. 2013. Vol. 11 (6). P. 621–640. <https://doi.org/10.2174/1570159X113119990042>.
47. Editorial: Inflammatory pain: mechanisms, assessment, and intervention / Y.-H. Zhang et al. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2023. Vol. 16. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1286215>
48. Effect of 3-substituted 1,4-benzodiazepin-2-ones on maximal normalized rate of bradykinin-induced smooth muscle contraction in the presence of calcium channel blockers / P. A. Virych et al. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2017. Vol. 8 (2). P. 224–230. <https://doi.org/10.15421/021735>
49. Efficient Exploration of Chemical Space with Docking and Deep Learning / Y. Yang et al. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2021. Vol. 17 (11). P. 7106–7119. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c00810>
50. Evidence for the involvement of the GABA-ergic pathway in the anticonvulsant and antinociception activity of Propoxazepam in mice and rats / M. Glovenko et al. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*. 2019. Vol. 13, (3). P. 99–105. <https://doi.org/10.26444/jpccr/110430>
51. Experimental study of ulcerogenic action of propoxazepam / N. I. Voloshchuk et al. *Reports of Vinnytsia National Medical University*. 2018. Vol. 22 (1). P. 6–9. [https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2018-22\(1\)-01](https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2018-22(1)-01)
52. Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein–Ligand Complexes / R. A. Friesner et al. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2006. Vol. 49 (21). P. 6177–6196. <https://doi.org/10.1021/jm051256o>

53. ezCADD. Dong "Danny" Xu Biomedical Research Laboratory. URL: <http://dxulab.pharmacy.isu.edu/curry/ezCADD/main.html> (date of access: 22.02.2024).

54. ezCADD: A Rapid 2D/3D Visualization-Enabled Web Modeling Environment for Democratizing Computer-Aided Drug Design / A. Tao et al. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2018. Vol. 59 (1). P. 18–24. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.8b00633>

55. File S. E., Pearce J. B. Benzodiazepines reduce gastric ulcers induced in rats by stress. *British Journal of Pharmacology*. 1981. Vol. 74 (3). P. 593–599. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1981.tb10469.x>

56. Functional Analysis of the Purified Anandamide-generating Phospholipase D as a Member of the Metallo- β -lactamase Family / J. Wang et al. *Journal of Biological Chemistry*. 2006. Vol. 281 (18). P. 12325–12335. <https://doi.org/10.1074/jbc.m512359200>

57. Functional interactions between NMDA receptors and TRPV1 in trigeminal sensory neurons mediate mechanical hyperalgesia in the rat masseter muscle / J. Lee et al. *Pain*. 2012. Vol. 153 (7). P. 1514–1524. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2012.04.015>

58. Garavito R. M., DeWitt D. L. The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1999. Vol. 1441, (2-3). P. 278–287. [https://doi.org/10.1016/s1388-1981\(99\)00147-x](https://doi.org/10.1016/s1388-1981(99)00147-x)

59. García-Gutiérrez M. S., Manzanares J. The cannabinoid CB1 receptor is involved in the anxiolytic, sedative and amnesic actions of benzodiazepines. *Journal of Psychopharmacology*. 2009. Vol. 24 (5). P. 757–765. <https://doi.org/10.1177/0269881109106910>

60. Ghode P., Jain S. K. Structural Requirements for some 3-amino-N-substituted-4-(substituted phenyl) Butanamides as Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitors Using 3D-QSAR and Molecular Docking Approaches. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017. Vol. 79 (6) P.974-986.

<https://doi.org/10.4172/pharmaceutical-sciences.1000315>

61. Groseclose M. R., Castellino S. An Investigation into Retigabine (Ezogabine) Associated Dyspigmentation in Rat Eyes by MALDI Imaging Mass Spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*. 2019. Vol. 32 (2). P. 294–303.

<https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00313>

62. Haddad J. J. Oxygen homeostasis, thiol equilibrium and redox regulation of signalling transcription factors in the alveolar epithelium. *Cellular Signalling*. 2002. Vol. 14 (10). P. 799–810. [https://doi.org/10.1016/s0898-6568\(02\)00022-0](https://doi.org/10.1016/s0898-6568(02)00022-0)

63. HTMD: High-Throughput Molecular Dynamics for Molecular Discovery / S. Doerr et al. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2016. Vol. 12 (4) P. 1845–1852. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.6b00049>

64. Human serum albumin: from bench to bedside / G. Fanali et al. *Molecular Aspects of Medicine*. 2012. Vol. 33 (3). P. 209–290. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.12.002>.

65. Human TRPV1 structure and inhibition by the analgesic SB-366791 / A. Neuberger et al. *Nature Communications*. 2023. Vol. 14 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38162-9>

66. Identification of Selective Inhibitors of the Potassium Channel Kv1.1-1.2(3) by High-Throughput Virtual Screening and Automated Patch Clamp / S. J. Wacker et al. *ChemMedChem*. 2012. Vol. 7 (10). P. 1775–1783. URL: <https://doi.org/10.1002/cmdc.201100600>

67. *In silico* exploration of antinociceptive activity of 1,4-benzodiazepines: Molecular docking on $\alpha 1$ A-adrenoceptor, and phosphodiesterase 4 / A. S. Akisheva та ін. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2024. Vol. 15 (2). C. 327–336. <https://doi.org/10.15421/022447>

68. *In silico* investigation of ACE2 and the main protease of SARS-CoV-2 with phytochemicals from *Myristica fragrans* (Houtt.) for the discovery of a novel COVID-19 drug / T. Ongtanasup et al. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2022. Vol. 28 (9). P. 103389. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103389>

69. Inhibition of 4-aminopyridine-induced seizures in mice by a novel 3-substituted 1,4-benzodiazepine/ Golovenko N.Ya., Larionov V.B., Reder A.S., Valivodz I.P. *Farmatsevtichnyi zhurnal*. 2018. N. 5-6. P. 90–96. <https://doi.org/10.32352/0367-3057.5-6.18.7>

70. Inhibition of heat-induced denaturation of albumin by nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs): pharmacological implications / L. Saso et al. *Archives of Pharmacal Research*. 2001. Vol. 24 (2). P. 150–158. <https://doi.org/10.1007/BF02976483>.

71. Inhibition of phosphodiesterase-4 in the spinal dorsal horn ameliorates neuropathic pain via cAMP-cytokine-Cx43 signaling in mice / F. Zhang et al. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 2022. Vol. 28 (5). P. 749–760. <https://doi.org/10.1111/cns.13807>

72. Inhibition of Protein Denaturation by Fatty Acids, Bile Salts and Other Natural Substances: A New Hypothesis for the Mechanism of Action of Fish Oil in Rheumatic Diseases / S. Luciano et al. *Japanese Journal of Pharmacology*. 1999. Vol. 79 (1). P. 89–99. <https://doi.org/10.1254/jjp.79.89>

73. Inhibition of synaptic transmission by anandamide precursor 20:4-NAPE is mediated by TRPV1 receptors under inflammatory conditions / D. Spicarova et al. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2023. Vol. 16. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1188503>

74. Inoue K. Nociceptive signaling of P2X receptors in chronic pain states. *Purinergic Signalling*. 2021. Vol. 17 (1). P. 41-47. <https://doi.org/10.1007/s11302-020-09743-w>

75. Ketamine. *PubChem*.URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ketamine> (date of access: 16.02.2024).

76. Khan I., Anupama, Singh B. 1,4Benzodiazepine: An overview of biological properties. *Sci Revs Chem Commun*. 2015. Vol. 5(1). P.13-20.

77. Kornwasser M. Capsacin and Analgesia. *The Science Journal of the Lander College of Arts and Sciences*. 2019. 12 (2). P. 19-23

78. Kragh-Hansen U. Structure and ligand binding properties of human serum albumin. *Danish medical bulletin*. 1990. Vol. 37 (1). P. 57–84.
79. Kroenke K., Krebs E. E., Bair M. J. Pharmacotherapy of chronic pain: a synthesis of recommendations from systematic reviews. *General Hospital Psychiatry*. 2009. Vol. 31 (3). P. 206–219. <https://doi.org/10.1016/j.genhosppsych.2008.12.006>
80. Kuduk S., Bock M. Bradykinin B1 Receptor Antagonists as Novel Analgesics: A Retrospective of Selected Medicinal Chemistry Developments. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2008. Vol. 8 (16). P. 1420–1430. <https://doi.org/10.2174/156802608786264263>
81. Larionov V.B., Golovenko M. Ya., Akisheva A. S., Valivodz I. P., Borysiuk I. Yu., Molodan Yu. O., Makarenko O. A. Molecular Insights into Propoxazepam Interaction with TRPV1 Receptors: A Docking Analysis. *Вісник ОНУ. Біологія*. 2023. Vol. 28, № 2 (53). С. 99-112. [https://doi.org/10.18524/2077-1746.2023.2\(53\).293324](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2023.2(53).293324)
82. Laskowski R. A., Swindells M. B. LigPlot+: Multiple Ligand–Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2011. Vol. 51 (10). P. 2778–2786. <https://doi.org/10.1021/ci200227u>
83. Li H., Zuo J., Tang W. Phosphodiesterase-4 Inhibitors for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Frontiers in Pharmacology*. 2018. Vol. 9. P.1048. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01048>
84. Lipnik-Stangelj M. Mediators of Inflammation as Targets for Chronic Pain Treatment. *Mediators of Inflammation*. 2013. Vol. 2013. P. 1–3. URL: <https://doi.org/10.1155/2013/783235>
85. Loss of STEP61 couples disinhibition to N-methyl-d-aspartate receptor potentiation in rodent and human spinal pain processing / A. Dedek et al. *Brain*. 2019. Vol. 142 (6). P. 1535–1546. URL: <https://doi.org/10.1093/brain/awz105>
86. M.H., Azzazy E., Christenson R. H. All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. Theodore Peters, Jr. San

Diego, CA: Academic Press, 1996, 432 pp, \$85.00. ISBN 0-12-552110-3. *Clinical Chemistry*. 1997. Vol. 43 (10). P. 2014a–2015. <https://doi.org/10.1093/clinchem/43.10.2014a>

87. Modern approaches to the introduction of science into practice: abstracts of X International Scientific and Practical Conference (San Francisco, USA, 30-31 march 2020)/ International Science Group; 2020. 335-338 p.

88. Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management / P. C. Agu et al. *Scientific Reports*. 2023. Vol. 13 (1). 13398. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40160-2>

89. Myoendothelial gap junctions mediate regulation of angiopoietin-2-induced vascular hyporeactivity after hypoxia through connexin 43-gated cAMP transfer / J. Xu et al. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2017. Vol. 313 (3). P. C262–C273. URL: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00369.2016>

90. National institutes of health. The National Center for Advancing Translational Sciences (NCATS). Inxight Drugs. 17203212. Retrieved August 13, 2023. URL: <https://drugs.ncats.io/substances?q=%22JNJ-17203212%22>

91. National institutes of health. The National Center for Advancing Translational Sciences (NCATS). Inxight Drugs. Capsaicin. In NIH. Retrieved August 13, 2023, URL: <https://drugs.ncats.io/substances?q=%22CAPSAICIN%22&facet=Substance%20Form%2FPrincipal%20Form>

92. National institutes of health. The National Center for Advancing Translational Sciences (NCATS). Inxight Drugs. Resiniferatoxin. In NIH. Retrieved August 13, 2023. URL: <https://drugs.ncats.io/substances?q=%22RESINIFERATOXIN%22&facet=Substance%20Form%2FPrincipal%20Form>.

93. National institutes of health. The National Center for Advancing Translational Sciences (NCATS). Inxight Drugs. Piperine. In NIH. Retrieved August 13, 2023 URL:

<https://drugs.ncats.io/substances?q=%22PIPERINE%22&facet=Substance%20Form%2FPrincipal%20Form>.

94. National institutes of health. The National Center for Advancing Translational Sciences (NCATS). Inxight Drugs. Oleoyldopamine. In *NIH*. Retrieved August 13, 2023. URL: <https://drugs.ncats.io/substances?q=%22N-OLEOYLDOPAMINE%22>.

95. Neuropathic pain / L. Colloca et al. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017. Vol. 3 (1). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.2> .

96. Neuropathic pain / N. B. Finnerup et al. *PAIN*. 2016. Vol. 157 (8). P. 1599–1606. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000492>

97. NMDARs mediate peripheral and central sensitization contributing to chronic orofacial pain / Y.-J. Liu et al. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2022. Vol. 16. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.999509>

98. N-methyl-D-aspartic acid. *PubChem*. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/n-methyl-d-aspartate#section=Pharos-Ligand-ID> (date of access: 16.02.2024).

99. Nociceptor neurons direct goblet cells via a CGRP-RAMP1 axis to drive mucus production and gut barrier protection / D. Yang et al. *Cell*. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.09.024>

100. Oettl K., Stauber R. E. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br. J. Pharmacol.* 2007. Vol. 151 (5). P. 580–590. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707251>.

101. Opie E. L. On the relation of necrosis and inflammation to denaturation of proteins. *Journal of Experimental Medicine*. 1962. Vol. 115, no. 3. P. 597–608. <https://doi.org/10.1084/jem.115.3.597>

102. Pathology of pain and its implications for therapeutic interventions / B. Cao et al. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2024. Vol. 9 (1). URL: <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01845-w>

103. PDE4 Inhibitors: Profiling Hits through the Multitude of Structural

Classes / J. Jin et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24, (14). P. 11518. <https://doi.org/10.3390/ijms241411518>

104. Perez D. M. α 1-Adrenergic Receptors in Neurotransmission, Synaptic Plasticity, and Cognition. *Frontiers in Pharmacology*. 2020. Vol. 11 (581098). <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.581098>

105. Peter A. Smith. K⁺ Channels in Primary Afferents and Their Role in Nerve Injury-Induced Pain. *Front. Cell. Neurosci*. 2020. Vol. 14. № 566418 <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.566418>

106. Peters J. T. All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. Academic Press, 1995. 432 p.

107. Pethö G., Derow A., Reeh P. W. Bradykinin-induced nociceptor sensitization to heat is mediated by cyclooxygenase products in isolated rat skin. *European Journal of Neuroscience*. 2001. Vol. 14, (2). P. 210–218. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01651.x>

108. Pharmacodynamics of Interaction between Propoxazepam and a GABA-Benzodiazepine Receptor-Ionophore Complex / M. Y. Golovenko et al. *Neurophysiology*. 2018. Vol. 50 (1). P. 2–10. <https://doi.org/10.1007/s11062-018-9711-9>

109. Phosphodiesterases and cAMP Pathway in Pituitary Diseases / M. F. Bizzi et al. *Frontiers in Endocrinology*. 2019. Vol. 10. P. 141. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00141>

110. Physiology, NMDA Receptor - StatPearls - NCBI Bookshelf. National Center for Biotechnology Information. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519495/> (date of access: 22.02.2024).

111. Pinzi L., Rastelli G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20 (18). P. 4331. <https://doi.org/10.3390/ijms20184331>

112. PlayMolecule Viewer: A Toolkit for the Visualization of Molecules and Other Data / M. Torrens-Fontanals et al. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2024. Vol. 64 (3). P. 584-589 <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.3c01776>

113. Potluri H., Prasanth D. S. N. B. K., Atmakuri L. R. *In vivo* Antinociceptive Effect of Methanolic Extract of *Ipomoea marginata* Desr. in Rodents as well as *In silico* Molecular Docking of Some Phytoconstituents from the Plant. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021. Vol. 83 (4). P.732-741 <https://doi.org/10.36468/pharmaceutical-sciences.824>
114. Preclinical pharmacokinetic studies of [^{14}C]-propoxazepam innovative analgesic with multimodal mechanism of action/ I.P.Valivodz et al. *Sciences of Europe*. 2020. Vol. 2 (49). P.13-24
115. Prevalence of Chronic Pain and High-Impact Chronic Pain Among Adults – United States, 2016 / J. Dahlhamer et al. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2018. Vol. 67 (36). P. 1001–1006. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6736a2>
116. PubChem 2025 update / S. Kim et al. *Nucleic Acids Research*. 2024. Vol. 53 (D1). P. D1516–D1525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1059>
117. Quinlan G. J., Martin G. S., Evans T. W. Albumin: Biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology*. 2005. Vol. 41 (6). P. 1211–1219. URL: <https://doi.org/10.1002/hep.20720>
118. Relationship between lipophilicity and binding to human serum albumin of arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs / L. Deschamps-Labat et al. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1997. Vol. 16 (2). P. 223–229. [https://doi.org/10.1016/s0731-7085\(97\)00017-4](https://doi.org/10.1016/s0731-7085(97)00017-4) (date of access: 01.04.2025).
119. Retigabine, A Novel Anti-Convulsant, Enhances Activation of KCNQ2/Q3 Potassium Channels / A. D. Wickenden et al. *Molecular Pharmacology*. 2000. Vol. 58 (3). P. 591–600. [https://doi.org/10.1016/s0026-895x\(24\)12425-x](https://doi.org/10.1016/s0026-895x(24)12425-x)
120. Rondeau P., Bourdon E. The glycation of albumin: Structural and functional impacts. *Biochimie*. 2011. Vol. 93 (4). P. 645-658. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.12.003>

121. Sebastin S. Complex regional pain syndrome. *Indian Journal of Plastic Surgery*. 2011. Vol. 44 (2). P. 298. <https://doi.org/10.4103/0970-0358.85351>
122. Soldovieri M. V., Miceli F., Taglialatela M. Driving With No Brakes: Molecular Pathophysiology of Kv7 Potassium Channels. *Physiology*. 2011. Vol. 26 (5). P. 365–376. <https://doi.org/10.1152/physiol.00009.2011>
123. Spatial transcriptomics of dorsal root ganglia identifies molecular signatures of human nociceptors / D. Tavares-Ferreira et al. *Science Translational Medicine*. 2022. Vol. 14 (632). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abj8186>
124. Specific antioxidant properties of human serum albumin / M. Taverna, A. L. Marie, J. P. Mira, B. Guidet. *Annals Intensive Care*. 2013. Vol. 3 (1). P. 4. <https://doi.org/10.1186/2110-5820-3-4>.
125. Stafstrom C. E., Grippon S., Kirkpatrick P. Ezogabine (retigabine). *Nature Reviews Drug Discovery*. 2011. Vol. 10 (10). P. 729–730. <https://doi.org/10.1038/nrd3561>
126. Starowicz K., Malek N., Przewlocka B. Cannabinoid receptors and pain. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*. 2013. Vol. 2 (3). P. 121–132. <https://doi.org/10.1002/wmts.83>
127. Steglitz J., Buscemi J., Ferguson M. J. The future of pain research, education, and treatment: a summary of the IOM report “Relieving pain in America: a blueprint for transforming prevention, care, education, and research”. *Translational Behavioral Medicine*. 2012. Vol. 2 (1). P. 6–8. URL: <https://doi.org/10.1007/s13142-012-0110-2>
128. Structural basis and energy landscape for the Ca²⁺ gating and calmodulation of the Kv7.2 K⁺ channel / G. Bernardo-Seisdedos et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018. Vol. 115 (10). P. 2395–2400. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800235115>
129. Structural Basis for the Activity of Drugs that Inhibit Phosphodiesterases / G. L. Card et al. *Structure*. 2004. Vol. 12 (12). P. 2233–2247. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.10.004>

130. Structural basis of ketamine action on human NMDA receptors / Y. Zhang et al. *Nature*. 2021. Vol. 596 (7871). P. 301–305. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03769-9>.
131. Structural insights into binding of therapeutic channel blockers in NMDA receptors / T.-H. Chou et al. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2022. Vol. 29. P. 507–518 <https://doi.org/10.1038/s41594-022-00772-0>
132. Structural plasticity of axon initial segment in spinal cord neurons underlies inflammatory pain / Y. Caspi et al. *Pain*. 2022. Vol. 164 (6). P. 1388–1401. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002829>
133. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy / M.Liao et al. *Nature*. 2013. Vol. 504 (7478). P.107–112. <https://doi.org/10.1038/nature12822>
134. Szelenyi I. Flupirtine, a re-discovered drug, revisited. *Inflammation Research*. 2013. Vol. 62 (3). P. 251–258. <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0592-5>
135. The analgesic effect of rolipram is associated with the inhibition of the activation of the spinal astrocytic JNK/CCL2 pathway in bone cancer pain / C.-H. Guo et al. *International Journal of Molecular Medicine*. 2016. Vol. 38 (5). P. 1433–1442. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2763>
136. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway / M. J. Caterina et al. *Nature*. 1997. Vol. 389 (6653). P. 816–824. <https://doi.org/10.1038/39807>
137. The discovery and development of propoxazepam, a novel anal-gesic and anticonvulsant with multimodal mechanism of action: review of own preclinical data/ M.J. Golovenko, V.B. Larionov, A.S. Reder, Andronati S.A. *EAS Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2020. Vol. 23(3). P. 57–64. <https://doi.org/10.36349/easjpp.2020.v02i03.13>
138. The impact of molecular dynamics on drug design: applications for the characterization of ligand–macromolecule complexes / J. Mortier et al. *Drug Discovery Today*. 2015. Vol. 20 (6). P. 686–702.

<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.01.003>

139. The Patient–Provider Relationship in Chronic Pain Care: Providers' Perspectives / M. S. Matthias et al. *Pain Medicine*. 2010. Vol. 11 (11). P. 1688–1697. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4637.2010.00980.x>

140. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises / S. N. Raja et al. *Pain*. 2020. Vol. 161 (9). P. 1976–1982. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001939>

141. Trevisani M., Gatti R. TRPV1 Antagonists as Analgesic Agents. *The Open Pain Journal*. 2013. Vol. 6 (1). P. 108–118. <https://doi.org/10.2174/1876386301306010108>

142. TRPA1 mediates formalin-induced pain / C. R. McNamara et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007. Vol. 104 (33). P. 13525–13530. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705924104>

143. Tsareva D.A., Ecker, G.F. How Far Could We Go with Open Data – A Case Study for TRPV1 Antagonists. *Mol Inform*. 2013. Vol. 32(5–6). P. 555–562. <https://doi.org/10.1002/minf.201300019>

144. Ugale V. G., Bari S. B. Identification of potential Gly/NMDA receptor antagonists by cheminformatics approach: a combination of pharmacophore modelling, virtual screening and molecular docking studies. *SAR and QSAR in Environmental Research*. 2016. Vol. 27 (2). P. 125–145. <https://doi.org/10.1080/1062936x.2015.1136679>

145. Woolf C. J. Capturing Novel Non-opioid Pain Targets. *Biological Psychiatry*. 2020. Vol. 87 (1). P. 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.06.017>

146. Xiaoxiao Li, Qiansen Zhang, Peipei Guo. Molecular basis for ligand activation of the human KCNQ2 channel. *Cell Research*. 2021. Vol. 31 (1). P. 52–61. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-00410-8>.

147. Yang J.-M., Chen C.-C. GEMDOCK: A generic evolutionary method for molecular docking. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2004. Vol. 55 (2). P. 288–304. <https://doi.org/10.1002/prot.20035>

148. Zeilhofer H. U. The glycinergic control of spinal pain processing. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2005. Vol. 62 (18). P. 2027–2035.
<https://doi.org/10.1007/s00018-005-5107-2>

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Пропоксазепам розглядається як багатообіцяючий препарат і наразі проходить клінічні випробування в Україні. По завершенню всіх етапів клінічних досліджень може бути рекомендованим препаратом, що пригнічує як гострий, так і хронічний біль, а також має протизапальні та протисудомні властивості

ДОДАТОК А СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні результати дисертації

1. Ларіонов В. Б., Акішева А. С., Головенко М. Я., Макаренко О. А., Борисюк І.Ю. Пригнічення термоіндукованої денатурації бичачого сироваткового альбуміну пропоксизепамом і його фармакологічні наслідки. *Доповіді національної академії наук України*. 2022. №3. С. 77-86. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2022.03.077>
2. Ларіонов, В. Б., Акішева, А. С., Головенко, М. Я., Макаренко, О. А., & Борисюк, І. Ю. Prostaglandin and bradykinin mechanisms of analgesic and anti-inflammatory action of propoxazepam: molecular docking data. *Medical and Clinical Chemistry*. 2022. № 1. С. 9–19. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2022.i1.13033>
3. Ларіонов В. Б., Акішева А. С., Головенко М. Я., Макаренко О. А., Валіводзь І. П., Цапенко Ж. М. Докінг-аналіз взаємодії пропоксазепаму з діазепамовим та ібупрофеновим місцями зв'язування людського сироваткового альбуміну. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2022. Т. 16, № 1. С. 46–56 <https://doi.org/10.33250/16.01.045>
4. Larionov V.B., Golovenko M. Ya., Akisheva A. S., Valivodz I. P., Borysiuk I. Yu., Molodan Yu. O., Makarenko O. A. Molecular Insights into Propoxazepam Interaction with TRPV1 Receptors: A Docking Analysis. *Вісник ОНУ. Біологія*. 2023. Т. 28, № 2 (53). С. 99-112. [https://doi.org/10.18524/2077-1746.2023.2\(53\).293324](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2023.2(53).293324)
5. Akisheva, A. S., Larionov, V. B., Golovenko, M. Y., Makarenko, O. A., Valivodz, I. P., Borysiuk, I. Y., & Molodan, Y. O. In silico exploration of antinociceptive activity of 1,4-benzodiazepines: Molecular docking on $\alpha 1$ A-adrenoceptor, and phospho-diesterase 4. *Regul. Mech. Biosyst.* 2024. 15(2). 327–336. <https://doi.org/10.15421/022447>

Наукові праці, що засвідчують апробацію матеріалів дисертації

1. Ларіонов В.Б., Валіводзь І.П., Акішева А.С. Пригнічення термоіндукованої денатурації бичачого сироваткового альбуміну пропоксазепамом та його фармакологічні наслідки. *Еколого-біологічна освіта в концепції «Єдине здоров'я»: матеріали Всеук. наук-практ. конф. з міжнар. уч., м. Тернопіль, 27 - 29 квітня. 2022 р. Тернопіль: ТНМУ, 2022. С. 51-52*
2. Ларіонов В. Б., Макаренко О. А., Валіводзь І. П., Борисюк І. Ю., Акішева А. С. Дія пропоксазепаму та його похідних на пригнічення денатурації бичачого сироваткового альбуміну. Тези Науково-практичної конференції XXI читання ім. В. В. Підвисоцького, м. Одеса, 23-24 червня 2022 р. Одеса: ОНМедУ, 2022. С. 50-53.
3. M. Y. Golovenko, V. B. Larionov, O. A. Makarenko, I.Yu. Borysiuk, I. P. Valivodz, A. S. Akisheva. Docking analysis of the interaction of propoxazepam with diazepam and ibuprofen binding sites of human serum albumin. *Сучасні проблеми фармакології, косметології та ароматології: матеріали X міжнародної науково-практичної конференції присвячена 165-річчю з дня народження Яківа Юлійовича Бардаха, м. Одеса 23 вересня. 2022 р. Одеса: МГУ, 2022. С. 44-48*
4. Валіводзь І. П., Акішева А. С., Ларіонов В. Б., Цапенко Ж. М., Головенко М. Я. Дослідження взаємодій похідних 1,4-бенздіазепіну з людським сироватковим альбуміном методом молекулярного докінгу. *Актуальні питання фармакології, клінічної фармакології та клінічної фармації: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Харків, 27-28 жовтня 2022 р. Харків: НФаУ, 2022. С. 13-15*
5. Акішева А.С., Ларіонов В.Б., Макаренко О.А., Молодан Ю.О., Борисюк І.Ю., Валіводзь І.П. Докінг-аналіз взаємодії пропоксазепаму з напругозалежним калієвим каналом людини Kv3.1. *Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації :*

матеріали V науково-практич. конф. студентів та молодих вчених з міжнародною участю, м. Харків, 18 травня 2023 р. Харків: НФаУ, 2023. С. 57-59.

6. Larionov V. B., Valivodz I. P., Akisheva A. S. In silico investigation of the interaction of ligands with the n-methyl-d-aspartate receptor. *Сучасні тенденції розвитку науки, освіти, технологій та суспільства*: Міжнародна науково-практична конференція, м. Полтава, 12 вересня 2023 р. Полтава : ЦФЕНД, 2023. С.58-60.

7. Борисюк І. Ю., Ларіонов В. Б., Валіводзь І. П., Молодан Ю.О., Акішева А. С. Докінг-аналіз взаємодії пропоксазепаму з напругозалежними калієвими (K⁺) каналами. *Сучасні проблеми фармакології, косметології та ароматології*: матеріали науково-практичної конференції, м. Одеса, 22 вересня. 2023 р. Одеса: Факультет стоматології і фармації, МГУ, 2023. С. 36-41.

8. Валіводзь І. П., Акішева А. С. Molecular insights into propoxazepam interaction with TRPV1 receptors: a docking analysis. *Вектори розвитку науки, освіти, технологій і суспільства в умовах глобалізації*: Міжнародна науково-практична конференція, м. Полтава, 19 жовтня 2023 р. Полтава: ЦФЕНД, 2023. С. 58-60.

9. Акішева А. С, Ларіонов В.Б., Макаренко О.А., Валіводзь І.П., Борисюк І.Ю., Молодан Ю.О. Молекулярні механізми взаємодії пропоксазепаму з рецепторами, що приймають участь у ноцицепції: докінг-аналіз. *Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція*: тези доповіді VI науково-практична internet-конференція з міжнародною участю, м. Харків, 16 листопада 2023 р. Харків: НФаУ, 2023. С. 75-77

10. Akisheva A. S., Larionov V. B. , Makarenko O. A., Molodan Yu. O., Borysiuk I. Yu. Docking analysis of 1,4-benzodiazepines with alpha-1 adrenergic receptor and phosphodiesterase 4. *Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку*: тези доповіді всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Одеса, 9-12 квітня 2024 р. Одеса:

ОНУ імені І. І. Мечникова, ФХІ імені О. В. Богатського НАН України.
ОНМедУ, ТДВ «ІНТЕРХІМ», 2024. С. 116-119.

11. Akisheva A. S., Larionov V. B., Makarenko O. A., Valivodz I. P., Borysiuk I. Yu., Molodan Yu. O. Exploring non-specific inhibition of phosphodiesterase 4 by 1,4- benzodiazepines using the approach of molecular dynamics simulation. *Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації* : матеріали VI науково-практичної конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю, м. Харків, 16 травня 2024 р. Харків: НФаУ, 2024. С. 13-15

12. Akisheva A. S., Larionov V. B., Makarenko O. A., Valivodz I. P., Borysiuk I. Yu., Molodan Yu. O. Investigation of the analgesic effect of 1,4- benzodiazepines through docking analysis with cannabinoid receptor 1. *XXIII-і читання В. В. Підвисоцького*: Бюлетень матеріалів наукової конференції, м. Одеса, 16-17 травня 2024 р. Одеса: ОНМедУ, Науке товариство патофізіологів України, Українська асоціація медичної науки, 2024. – С.7-9.

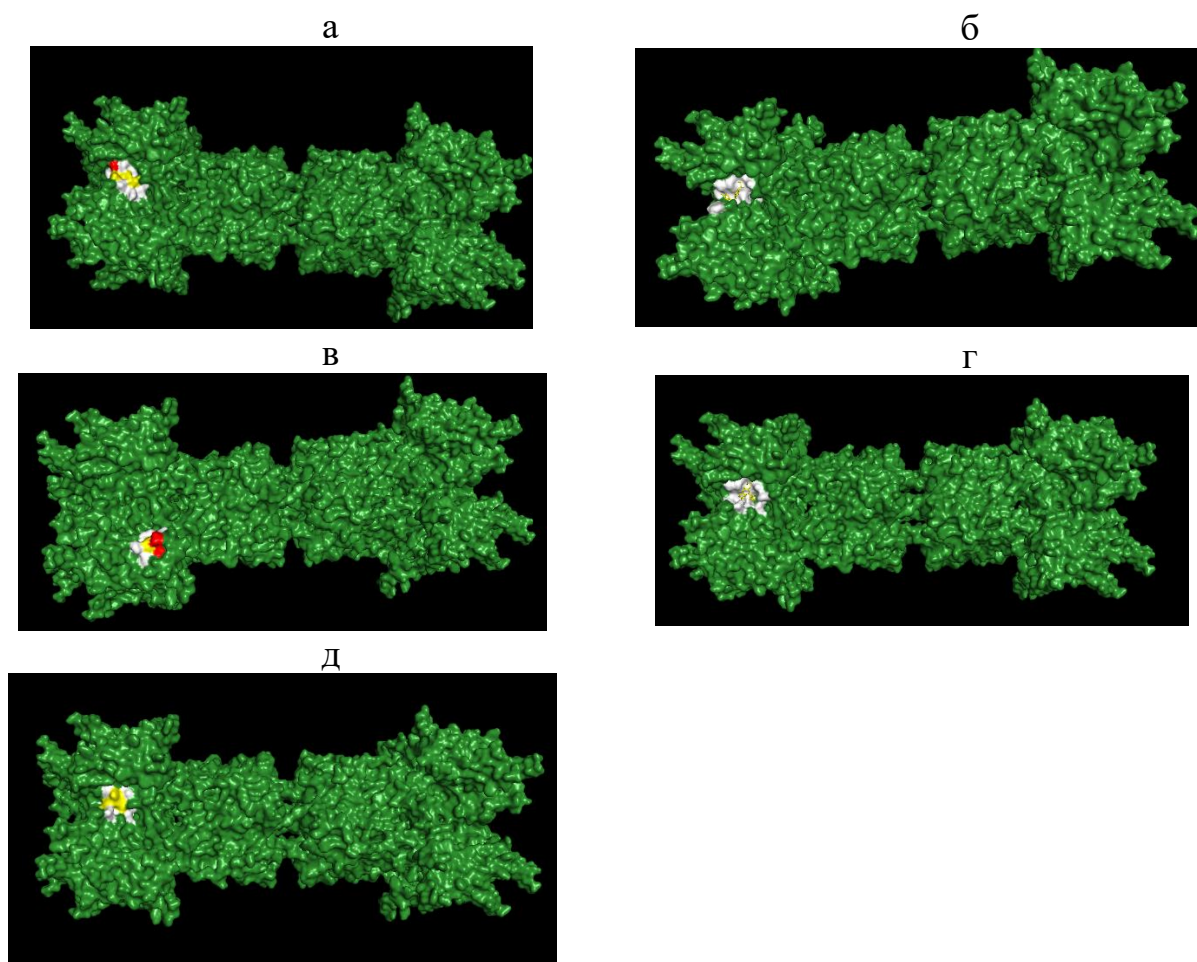
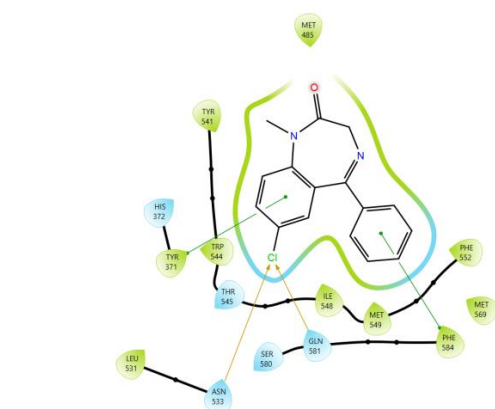
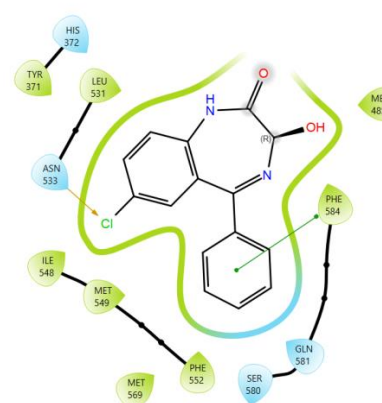


Рис. 1 Візуалізація поверхневого положення ретигабін (а), флупіртин (б), 4-амінопіридин (в), пропоксазепам (г) та оксазепам (д) у специфічних місцях зв'язування з Kv3.1 з використання програми Runtol.

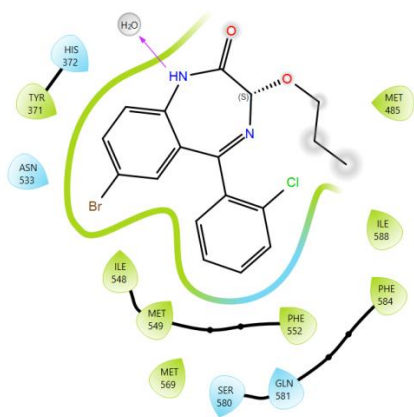
Примітка: Білим позначено гідрофобні взаємодії, червоним- полярні зв'язки та жовтим ліганд.



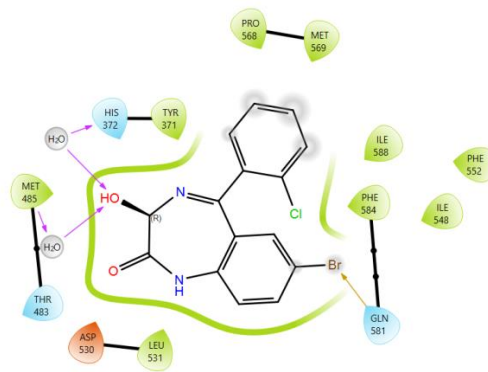
Діазепам



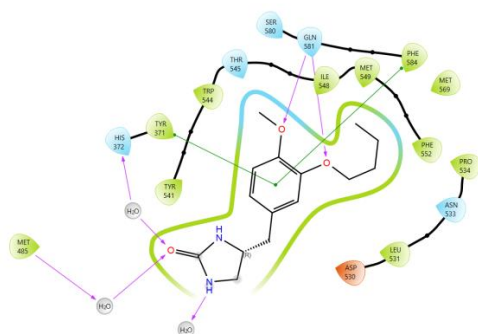
Оксазепам



Пропоксазепам

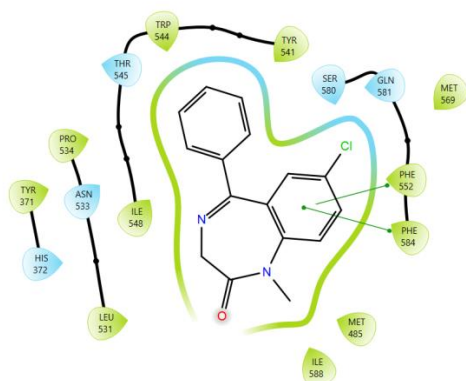


3-гідроксопропоксазепам

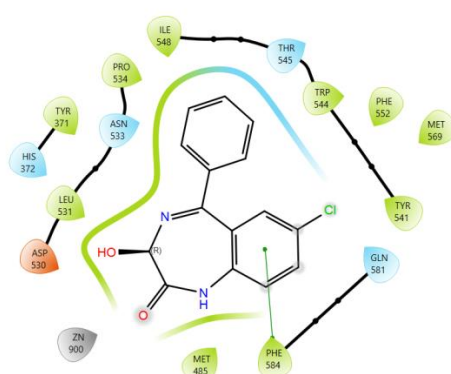


Референтний ліганд ОМО

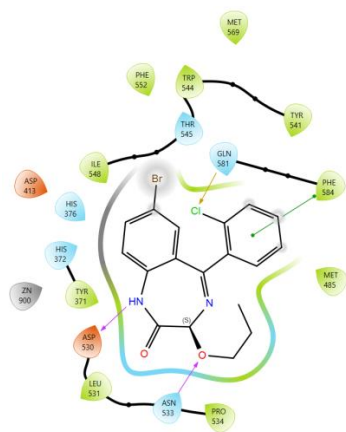
Рис. 2 Візуалізація взаємодії досліджуваних сполук з фосфодіестеразою 4A (3I8V)



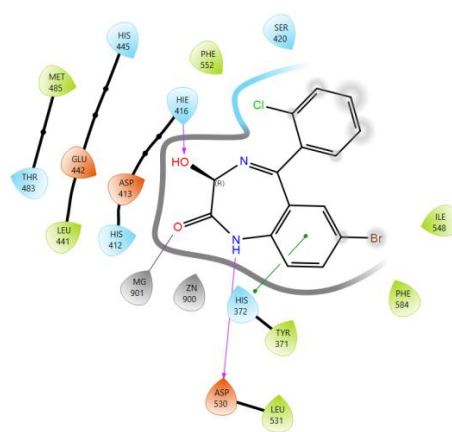
Діазепам



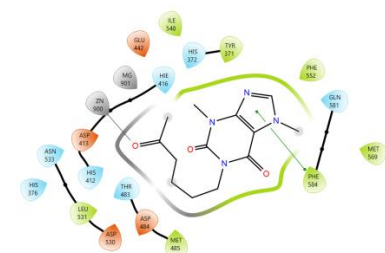
Оксазепам



Пропоксазепам

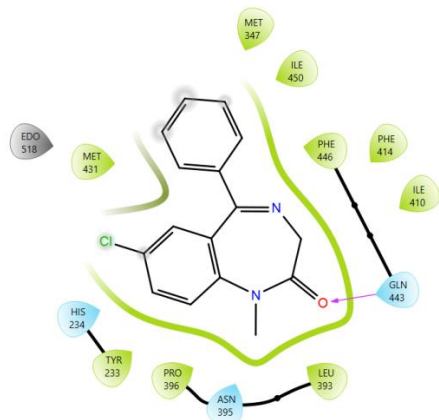


3-гідроксопропоксазепам

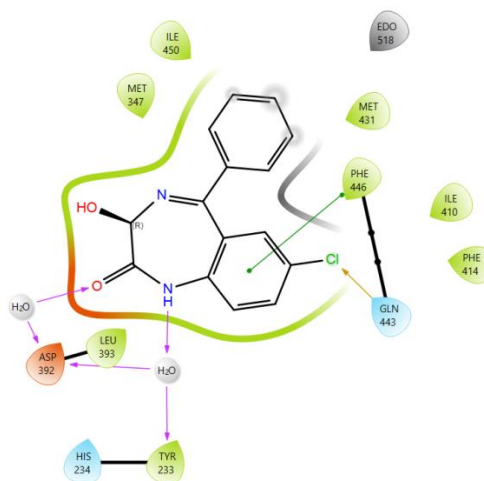


Референтний ліганд PNХ

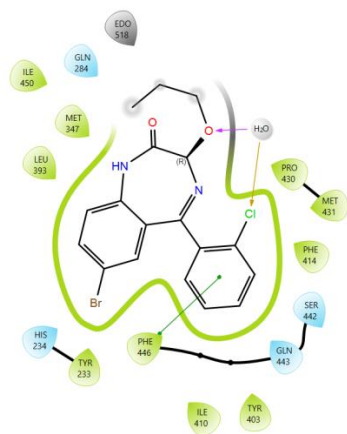
Рис. 3 Візуалізація взаємодії досліджуваних сполук з фосфодіестеразою 4А (3TVX)



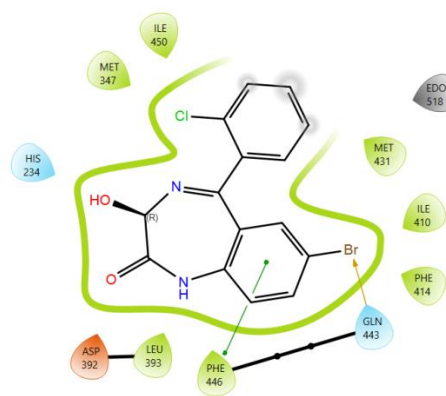
Діазепам



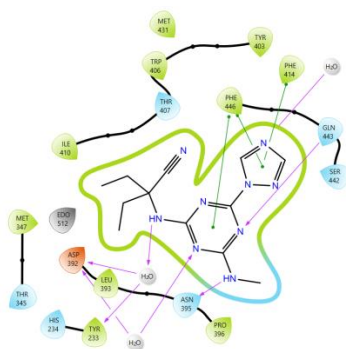
Оксазепам



Пропоксазепам

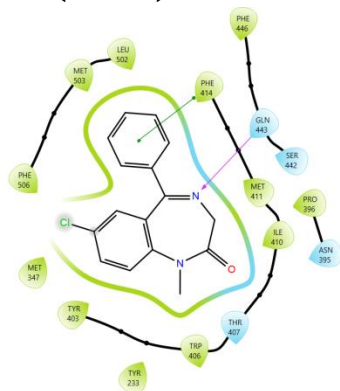


3-гідроксопропоксазепам

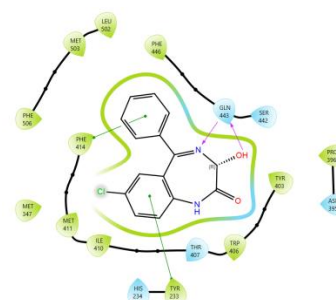


Референтний ліганд 1S1

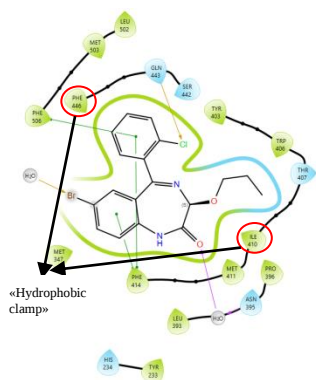
Рис. 4 Візуалізація взаємодії досліджуваних сполук з фосфодіестеразою 4В (4KRP6)



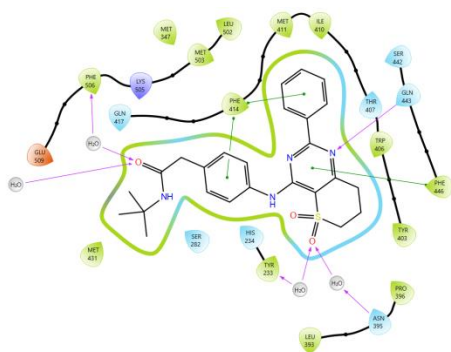
Діазепам



Оксазепам

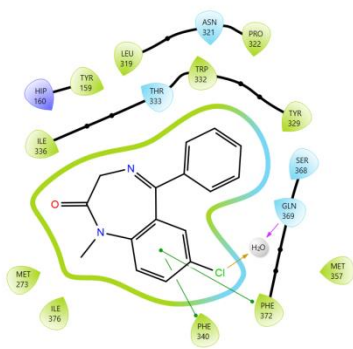


Пропоксазепам

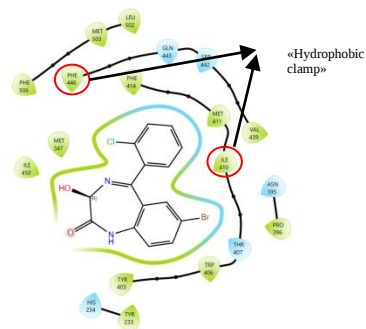


Референтний ліганд NVW

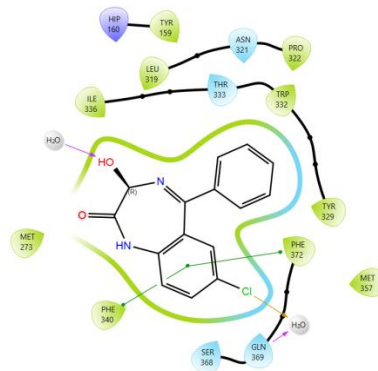
Рис. 5 Візуалізація взаємодії досліджуваних сполук з фосфодіестеразою 4В (3W5E)



Діазепам

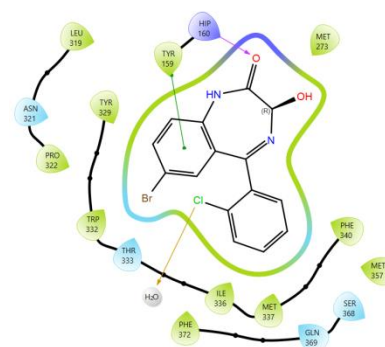
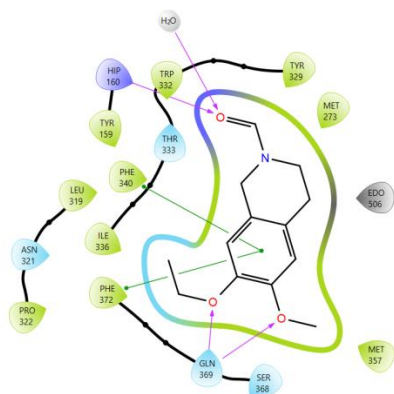


3-гідроксипропоксазепам



Оксазепам

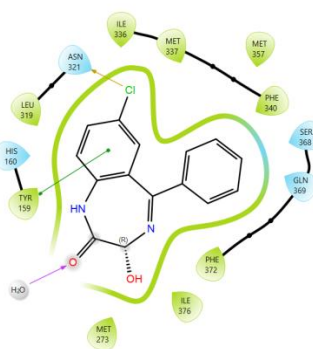
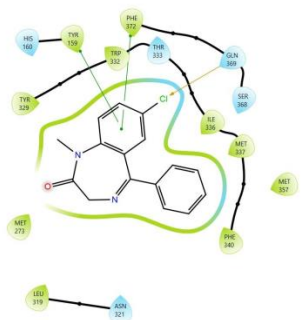
Пропоксазепам



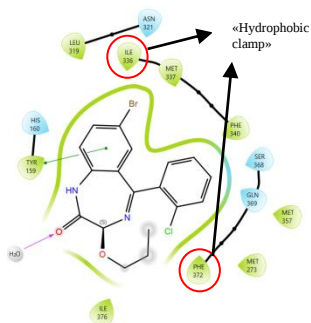
3-гідроксопропоксазепам

Референтний ліганд АНЗ

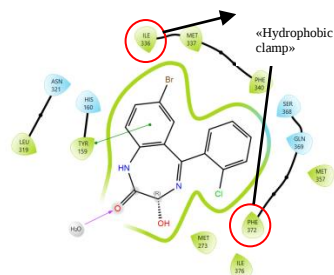
Рис. 6 Візуалізація взаємодії досліджуваних сполук з фосфодіестеразою 4D (6IM6)



Діазепам

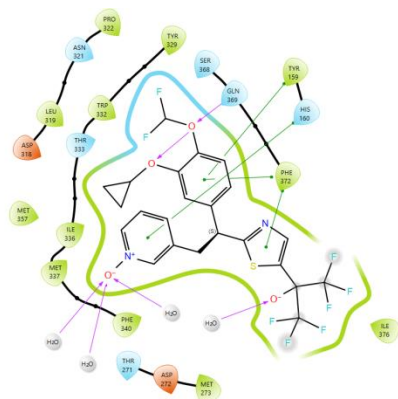


Оксазепам



Пропоксазепам

3-гідроксипропоксазепам



Референтний ліганд M98

Рис. 7 Візуалізація взаємодії досліджуваних сполук з фосфодіестеразою 4D (2FMO)