

На правах рукописи

РУКОВИЦИНА ВИКТОРИЯ МИХАЙЛОВНА

**СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ СТРУКТУРА-АКТИВНОСТЬ
В РЯДУ 3-ЗАМЕЩЕННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХРОМОНА**

3.4.2 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

ПЯТИГОРСК - 2021

Работа выполнена в Пятигорском медико-фармацевтическом институте – филиале федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор,
заслуженный работник ВШ РФ

Оганесян Эдуард Тоникович

Официальные оппоненты:

Клен Елена Эдмундовна – доктор фармацевтических наук, профессор, и.о. заведующего кафедрой фармацевтической химии с курсом аналитической и токсикологической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Белоусов Михаил Валерьевич – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармацевтического анализа федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__» _____ 202... года в _____ часов на заседании диссертационного совета 21.2.005.05 при ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России (357532, Ставропольский край, г.Пятигорск, пр. Калинина, 11).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России (357532, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11) и на сайте <http://www.pmedpharm.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г

Ученый секретарь
диссертационного совета

Ремезова Ирина Петровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Многочисленная группа природных соединений, объединенных общим названием флавоноиды, по существу, относится к производным хромона (бенз-γ-пирона) и характеризуются широким спектром фармакологической активности.

Характерная особенность хромона – это не только простота химического строения, но и сравнительно легкий путь синтеза, одним из которых является реакция Вильсмайера с использованием различных производных 2-гидроксиацетофенона. Данная реакция позволяет получить высокоактивный в химическом отношении хромон-3-альдегид, который может явиться основой для целенаправленного синтеза различных фармакологически активных целевых структур.

Современная органическая химия позволяет синтезировать самые разнообразные соединения с позиций современной медицинской химии.

Для решения проблем этой относительно молодой науки, следует изучать закономерности взаимосвязи структура - активность как среди новых синтезированных соединений, так и внутри групп родственных молекул. Не целесообразно анализировать ряды с большим числом соединений, а стоит ограничиться 15-20 структурами, чтобы результаты отличались высокой достоверностью.

Наиболее объективные данные можно получить, если свести к минимуму ошибки, связанные с экспериментальным определением тех или иных параметров молекул.

Степень разработанности темы исследования

В литературе опубликовано значительное количество сведений о способах получения, реакционной способности и биологической активности производных хромона, характеризующихся различными видами активностей. Однако ограничены сведения об изучении взаимосвязи структура - активность в ряду производных хромона.

Цель и задачи исследования

Целью наших исследований является синтез производных хромона, замещенных по положению С-3, и изучение взаимосвязи структура - биологическая активность полученных соединений с использованием квантово-химических параметров молекул.

Для реализации поставленной цели необходимо решение следующих задач:

1. На основании логико–структурного подхода определить базовую структуру и заместители, привносящие вклад в соответствующие виды фармакологической активности (ОН, ОСН₃, ОАс, галогены). Осуществить прогноз фармакологической активности виртуальных структур и отобрать соединения, характеризующиеся наибольшей вероятностью проявления конкретного вида действия. С помощью программы Molegro Virtual Docker определить комплементарность активных соединений (лигандов) к центру связывания фермента (рецептора);
2. Осуществить синтез прогнозируемых целевых структур и установить строение полученных соединений методами УФ-, ИК-, ¹Н ЯМР спектроскопии;
3. Совместно со специалистом-фармакологом осуществить обсуждение и интерпретацию результатов фармакологических исследований синтезированных соединений;
4. Выявить зависимости фармакологической активности от природы заместителя в бензаннелированном хромоновом ядре.
5. Изучить возможность использования квантово-химических параметров (Малликеновские заряды на атомах – а.е., связевые числа – N_μ, теоретическая валентность – V_μ, индекс ненасыщенности – IUA, электронная плотность и индекс свободной валентности – F_μ), изучаемых веществ для выявления качественных и количественных соотношений структура - активность с последующим анализом коэффициента корреляции.

Научная новизна

Молекулярным моделированием осуществлен анализ прогнозируемой нейропротекторной активности и на основании полученных данных сделан вывод,

что этот эффект реализуется путем ингибирования фермента цитохром *c*-редуктазы. Методом докинга изучены апоптический/антиапоптический виды активности, и установлено, что они обусловлены ингибированием фермента каспаза-3. Для анализируемых соединений и препаратов сравнения определены наиболее вероятные участки связывания лигандов с ферментами цитохром *c*-редуктазой и каспазой-3 и найдено, что энергии связывания целевых соединений с исследуемыми мишенями гораздо выше по сравнению с препаратами сравнения. Это свидетельствует о высокой степени сродства анализируемых соединений к исследуемым белковым мишеням.

На основании виртуального прогноза впервые осуществлен синтез новых производных – аналогов халкона (6 соединений), содержащих ядро хромона. С целью изучения взаимосвязи структура - активность для экспериментально установленных видов активности нами впервые были использованы такие квантово-химические параметры, как Малликеновские заряды на атомах – $a.e.$, связевые числа – N_{μ} , теоретическая валентность – V_{μ} , индекс ненасыщенности – IUA , электронная плотность и индекс свободной валентности – F_{μ} , с каждым из которых выявлены функциональные зависимости, имеющие линейный характер. Квантово-химические параметры как N_{μ} , V_{μ} и F_{μ} для изучения структура - активность нами предлагаются впервые; параметр F_{μ} рассчитан для изучаемых соединений также впервые.

Теоретическая и практическая значимость заключается в сочетании виртуальных компьютерного прогнозирования и молекулярного моделирования для выявления наиболее активных соединений, обладающих антиоксидантной, нейропротекторной и антиаллергической видами активностей.

Методология и методы исследования

Основой работы являются исследования в области синтеза и изучения взаимосвязи структура – биологическая активность в ряду производных хромона, замещенных по положению С-3. Проведены скрининговые исследования по молекулярному моделированию фармакологической активности. Структуры целевых соединений подтверждены с помощью УФ-, ИК- спектrophотометрии,

ядерно–магнитно–резонансной (ЯМР) ^1H –спектроскопии.

Изучены антиоксидантная, нейропротекторная, ангиопротекторная, антигипоксическая, апоптоз-регулирующая, вазоактивная и антиаллергическая виды активности. Установлено, что соединение 18 (аналог халкона) по уровню антиоксидантной, нейропротекторной и антиаллергической видов активности превосходит препараты сравнения - этилметилгидроксипиридина сукцинат, L-карнитин и дексаметазон, соответственно.

Мы выражаем искреннюю признательность и глубокую благодарность доценту кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии Позднякову Дмитрию Игоревичу за проведенные фармакологические исследования.

Положения, выносимые на защиту

1. Прогноз биологических свойств и определение степени сродства исследуемых соединений к соответствующему ферменту (рецептору) новых и некоторых уже известных 3-замещенных производных хромона;
2. Синтез новых производных 3-[(E)-3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)-3-оксо-проп-1-енил]-6-метокси-хромен-4-она, 3-[(1E)-3-оксо-3-фенилпроп-1-ен-1-ил]-4Н-1-бензопиран-4-он, 3-[(1E)-3-(3,4-диметилфенил)-3-оксопроп-1-ен-1-ил]-4Н-1-бензопиран-4-он, 3-[(1E)-3-(2-гидрокси-5-метилфенил)-3-оксопроп-1-ен-1-ил]-4Н-1-бензопиран-4-она, 3-[(1E)-3-(5-фторо-2-гидроксифенил)-3-оксопроп-1-ен-1-ил]-4Н-1-бензопиран-4-она, 3-[(1E)-3-(2-гидрокси-3-йодо-5-метилфенил)-3-оксопроп-1-ен-1-ил]-4Н-1-бензопиран-4-она, 3-[(1E)-3-(2-гидрокси-4-метоксифенил)-3-оксопроп-1-ен-1-ил]-4Н-1-бензопиран-4-она.
3. Установление строения полученных соединений методами инфракрасной, ультрафиолетовой, ^1H ЯМР-спектроскопии;
4. Интерпретация данных фармакологического скрининга и выявление качественных и количественных соотношений взаимосвязи структура - активность в исследуемых рядах.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается данными элементного анализа, инфракрасной, ультрафиолетовой, ^1H ЯМР - спектроскопии.

Материалы диссертационного исследования доложены на 74-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 20–23 апреля 2016 года), VI Международной научно-практической конференции «Беликовские чтения» (Пятигорск, 07.12-08.12.2017 г.), 71-й Международной научно-практической конференции «Во имя жизни и здоровья» Пятигорск, (17–18 мая 2018 года), XXVI Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (8.04. – 11.04.2019 г.).

По теме диссертации опубликовано 22 научные работы, из них, 4 в журналах, рекомендованных ВАК, 8 - в журналах SCOPUS, получено положительное решение о выдаче патента РФ на изобретение.

Личный вклад автора

Автором лично осуществлены все этапы экспериментальных исследований и оформления диссертации: постановка цели и задач работы; обсуждение результатов компьютерного прогнозирования фармакологической активности виртуальных соединений, синтез новых 3-замещенных производных хромона, интерпретация данных по фармакологическим исследованиям, а также выявление качественных и количественных соотношений взаимосвязи структура - активность.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы (глава 1), компьютерного моделирования (глава 2), экспериментальной части (глава 3), фармакологических исследований (глава 4), взаимосвязи структура - активность (5 глава), выводов, списка литературы и приложения. Библиография включает 103 ссылки, в том числе 72 зарубежные. Диссертация изложена на 169 страницах текста компьютерного набора, содержит 28 схем, 51 рисунок, 23 таблицы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Прогнозирование активности производных хромона

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В данной главе описывается общее состояние исследований в области синтеза производных хромона, содержащих заместители в положении С-3, а также

характеристика их биологической активности во взаимосвязи с их структурой.

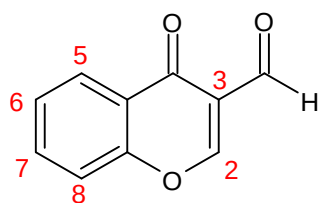
ГЛАВА 2. ОБОСНОВАНИЕ СТРУКТУР ПРОИЗВОДНЫХ ХРОМОНА КАК ЦЕЛЕВЫХ СТРУКТУР

На основании логико–структурного подхода в сочетании с виртуальным фармакологическим скринингом нами были отобраны базовая структура и заместители, соответствующие планируемым видам фармакологической активности. Молекулярное конструирование целевых соединений нами выполнялось в следующей последовательности:

- выбор хромона (бенз γ -пирона) в качестве базовой структуры нами осуществлен на основе данных литературы, логико–структурного подхода, а также проведенного нами предварительного виртуального фармакологического скрининга;
- первичный скрининг биохимических и фармакологических свойств виртуальных целевых соединений с использованием компьютерной программы *Way2Drug PASS Online*;
- выявление соединений – «лидеров» на основе «виртуального» первичного скрининга (испытаний);
- определение наиболее вероятных участков взаимодействия лиганд–белковая мишень и энергии образования комплекса;
- анализ взаимосвязи структура – активность для определения достоверности молекулярного конструирования и планирования эксперимента.

С учетом перечисленного выше обоснования целевых структур были сконструированы и в последствии синтезированы соединения, представленные ниже.

I. Производные формилхромона

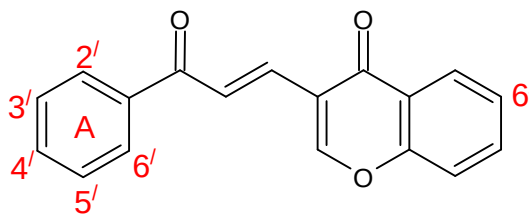


- 1) 3-формилхромон; 2) 7-OCH₃; 3) 6-OAc;
4) 7-OAc; 5) 6-F; 6) 6-Cl;
7) 6-I; 8)

II. Замещенные оксимы 3-формилхромона

- 9) Оксим 3-формилхромона 10) 6-F; 11) 6-Cl.

III. Аналоги халкона



- 12). Незамещенный аналог;
- 13) 3',4'-ди-CH₃; 14) 2'-ОН, 5'-CH₃.
- 15) 2'-ОН, 5'-F;
- 16) 2'-ОН, 3'-I, 5'-CH₃;
- 17) 2'-ОН, 4'-OCH₃;
- 18) 4'-ОН, 3',5'-дитретбутил-6-метокси

При молекулярном конструировании целевых структур для наибольшей достоверности следует использовать такие данные компьютерного прогноза, вероятность проявления которых превышает 50%.

Анализ виртуального скрининга незамещенного хромона свидетельствует о наличии наиболее вероятных антиоксидантной, нейропротекторной, антиапоптотической и антиаллергической активностях. Данные прогноза *in silico*, позволяют предполагать высокую ингибирующую активность анализируемых веществ к суперсемейству цитохрома P-450.

Для веществ 1-8 прогнозируются те же виды активности, что и для незамещенного хромона. Характерно, что вероятность проявления антигипоксической активности для анализируемых производных хромона находится в пределах 51–69%, ингибирования проницаемости мембраны 60-71% а для агониста апоптоза – 53–96%. Вероятность ингибирования гистидинкиназы 66-79%.

Для оксимов 3-формилхромона (соединения 9-11) прогнозируется ингибирование гистидинкиназы, убихинол-цитохром-с-редуктазы, свойства антагониста белка-предшественника бета-амилоида. Соединение 9 характеризуется антиамилоидными свойствами (64,7%).

Для аналогов халкона (соединения 12-18) (таблица 1) прогнозируются антигипоксическая, противоаллергическая, ангиопротекторная активности. Вероятность проявления которых находится в пределах 56–75%. Ингибирование проницаемости мембраны составляет 56-64%, гистидинкиназы – 62-73%, убихинол-цитохром-с-редуктазы – 55-79%.

Таблица 1 – Прогноз биологической активности аналогов халкона

	Соединение						
	12	13	14	15	16	17	18
Вид активности	Незамещенный аналог	3',4'-ди-CH ₃	2'-ОН,5'-CH ₃	3'-F,6'-ОН	2'-ОН,3'-I,5'-CH ₃	2'-ОН,4'-OCH ₃	4'-ОН,3',5'-дитретбутил-6-OCH ₃
Вероятность проявления активности (Pa, %*100)							
Фармакологической активности							
Антигипоксическая	63,9	56,9	65,2	66,9	-	75,1	56,2
Противоаллергическая	69,4	64,6	65,3	65,9	-	68,3	70,1
Агонист апоптоза	65,9	58,6	65,5	58,5	53,7	71,2	60,2
Ангиопротекторная	58,3	55,9	61,6	54,2	-	50,5	-
Ингибитор проницаемости мембраны	64,1	56,1	61,8	57,6	-	61,7	-
Биохимической активности							
Ингибитор гистидинкиназы	71,8	63,4	68,3	-	61,9	72,5	61,7
Ингибитор убинол-цитохром-с-редуктазы	75,3	71,6	75,1	54,8	78,1	78,9	72,7
Стимулятор каспазы 3	62,7	53,1	66,0	46,4	-	81,4	68,5
Ингибитор экспрессии матриксной металлопротеиназы 9	61,5	58,5	63,7		-	73,0	64,3
Субстрат CYP2F1	66,8	62,3	54,8	-	-	-	-
CYP2J субстрат	73,2	71,0	65,5	-	-	-	-
Субстрат CYP2A6	61,4	61,3	-	-	-	54,0	-
Стимулятор цитохрома P450	60,6	55,1	-	-	-	-	55,4

Одним из факторов влияния на фармакологическую активность соединений является энергия связывания лиганда с ферментом: чем ниже глобальный минимум функций свободной энергии, тем прочнее комплекс лиганда с белковой мишенью и тем сильнее эффект (агониста или антагониста). По величине энергии формирования наиболее устойчивого молекулярного комплекса можно судить о сродстве низкомолекулярного соединения к активному центру белковой мишени. Поскольку прогноз в программе *Way2Drug PASS Online* позволил выявить ингибирующую активность полученных веществ в отношении фермента цитохром

с-оксидазы, то мы сочли целесообразным изучить их взаимодействие с белковой молекулой и отобрать наиболее активные соединения.

Для изучения взаимодействия исследуемых соединений с активным центром фермента цитохром с-редуктазы нами была использована пространственная структура комплекса белок-лиганд организма *Bos taurus* с идентификационным кодом 1NTZ. Лигандом в данном комплексе является молекула убихинона, которая реализует индуцирующий эффект на фермент. Данный белково-лигандный комплекс заимствован нами из базы данных *RCSB Protein Data Bank* (rcsb.org).

Результаты молекулярного докинга указывают на то, что соединением-лидером из синтезированных производных хромона по сродству к активному сайту связывания убихинона цитохром с-редуктазы является вещество 18, характеризующееся минимальной энергией связывания с активным центром фермента, равной -142,116 ккал/моль. Оно превосходит препарат сравнения Коэнзим Q₁₀ на 5,5 ккал/моль. Примерно равные энергии в комплексе лиганд-фермент с минимальной энергией наблюдаются у соединений 17, 16, 15, 14 и 8. Наименьшей ингибирующей активностью, исходя из наиболее выгодных конформаций низкомолекулярных соединений, обладает соединение 1.

В связи с тем, что по программе *Way2Drug PASS Online* выявлена активирующая активность полученных соединений в отношении фермента каспазы-3, то мы сочли целесообразным изучить их взаимодействие с белковой молекулой и отобрать наиболее перспективные биологически активные соединения. При этом нами учитывался характер взаимодействия низкомолекулярных соединений с сайтом связывания каспазы-3, где обычно используется пространственная структура белок-лигандного комплекса организма *Homo sapiens* с идентификационным кодом 3KJF. Данный белково-лигандный комплекс был представлен в базе данных *RCSB Protein Data Bank* (rcsb.org).

Данные молекулярного докинга свидетельствуют, что соединением-лидером из синтезированных производных хромона по сродству к активному сайту каспазы-3 является аналог халкона – 18 (минимальная энергия взаимодействия составляет - 112,275 ккал/моль), что превосходит природный ингибитор протеолитического

фермента на 8,932 ккал/моль. Примерно равные энергии расположения исследованных соединений в комплексе лиганд-фермент с минимальной энергией у соединений 15, 14 и 17. Наименьшей ингибирующей активностью каспазы-3, исходя из наиболее выгодных конформаций низкомолекулярных соединений, обладает соединение 1.

ГЛАВА 3. СИНТЕЗ ЦЕЛЕВЫХ СОЕДИНЕНИЙ И ДОКАЗАТЕЛЬСТВО ИХ СТРОЕНИЯ

В соответствии с прогнозом целевые соединения представляют собой замещенные

по положению С-3 производные хромона (бенз-γ-пирона). Наиболее удобным исходным соединением для синтеза целевых структур является хромон-3-альдегид, который благодаря формильной группе характеризуется высокой реакционной способностью.

Хромон-3-альдегид

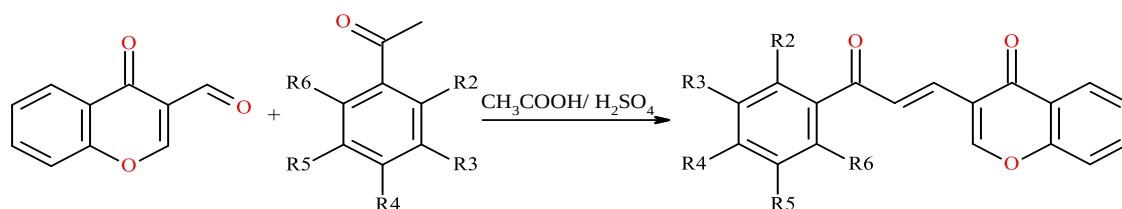
Синтез хромон-3-альдегида осуществляется по общеизвестной методике, а именно взаимодействием о-гидроксиацетофенона с реактивом Вильсмайера.

Таким же способом, используя соответствующие ацетофеноны, нами были получены - 7-метокси-3-формилхромон, 6-ацетокси-3-формилхромон, 7-ацетокси-3-формилхромон, 6-фтор-3-формилхромон, 6-хлор-3-формилхромон, 6-йод-3-формилхромон.

Оксимы хромон-3-альдегида получены по общепринятым методикам взаимодействия хромон-3-альдегида с гидроксиламином. Таким путем были синтезированы три оксима.

Аналоги халкона

Схема 1.



Структуры исследуемых соединений были подтверждены спектрометрическими и физико-химическими методами анализа.

ГЛАВА 4. ОЦЕНКА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СИНТЕЗИРОВАННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

В данной части исследования наше участие выразилось в проведении виртуального скрининга и последующем совместном обсуждении со специалистом-фармакологом полученных экспериментальных данных.

Работа выполнена на 630 крысах-самцах линии Wistar массой 200-220 грамм, возрастом 3 месяца и 520 половозрелых мышах – самцах линии Balb/c массой 20-22 грамма. Оценка токсичности исследуемых веществ при однократном введении показала отсутствие у изучаемых объектов значимого токсического влияния на организм экспериментальных животных. На основании данных литературы для проведения скрининговых исследований фармакологической активности производных хромона и аналогов халкона была выбрана доза равная 1/100 от LD₅₀.

Антиаллергические свойства исследуемых соединений оценивали на модели «цитокинового шторма» у крыс. Препарат сравнения и изучаемые вещества вводили внутрибрюшинно через 1 час после моделирования патологии. Проведенные исследования показали, что наиболее выраженные антиаллергические свойства отмечены у соединения 18, при применении которого концентрация ИЛ-6, ИЛ-1 β и ФНО- α уменьшилась на 54,3% ($p < 0,05$); 63,2% ($p < 0,05$) и 61,1% ($p < 0,05$), при увеличении содержания ИЛ-10 на 211,5% ($p < 0,05$) (показатели приведены в сравнении с группой животных, которым коррекция патологии не проводилась). При этом, введение изучаемых соединений 5, 6 и 7 значимого влияния на изменение уровня цитокинов в крови у крыс с экспериментальным «цитокиновым штормом» не оказало. Важно отметить, что соединения 8-18 по степени выраженности фармакологического эффекта были сопоставимы с референтным препаратом – дексаметазоном.

Антиоксидантную активность изучаемых соединений оценивали в гомогенате головного мозга животных в условия фокальной ишемии головного мозга. При этом, определяли активность супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы, и концентрацию ТБК-активных продуктов. Проведенные исследования показали, что введение изучаемых соединений способствовало

восстановлению про/антиоксидантного баланса в мозговой ткани у ишемизированных крыс. При этом соединения 3 и 18 по уровню фармакологической активности статистически значимо не отличались от препарата сравнения.

Влияние изучаемых соединений на активность апоптотических систем оценивали на модели перманентной окклюзии средней мозговой артерии, путем определения концентрации апоптоз-индуцирующего фактора и каспазы-3. Было установлено, что введение исследуемых веществ животным без патологии не оказывает значимого влияния на изменение концентрации каспазы-3 и АИФ, что может свидетельствовать об отсутствии у изучаемых веществ способности изменять ход реакций физиологического апоптоза. У крыс с моделированной патологией применение соединений 5, 6, 7, 9-11 существенного влияния на изменение концентрации каспазы-3 и АИФ не оказывает, в то время как на фоне введения L-карнитина, данные показатели уменьшились на 59,6% ($p<0,05$) и 45,5% ($p<0,05$) соответственно. При этом, статистически значимых отличий между группами животных, получавших соединение 18 и L-карнитин установлено не было. Таким образом, наиболее значимые изменения активности систем апоптоза отмечены при введении животным соединения 18.

Влияние исследуемых соединений на активность митохондриального комплекса III оценивали у ишемизированных (модель постоянной окклюзии средней мозговой артерии) и интактных животных. Установлено, что применение исследуемых соединений 2-4 и 10-18 также способствовало повышению активности митохондриального комплекса III на 42,3%; 64,2%; 30,9%; 25,2%; 26%; 31,7%; 43,9%; 67,5%; 53,7%; 41,5%; 46,3%; 60,2% и 85,2% (все показатели $p<0,05$ относительно группы крыс без фармакологической поддержки). При этом, активность убихинол цитохром-с-оксидоредуктазы у животных, которые получали соединения 13 и 18 была выше аналогичной у крыс, которым вводили Коэнзим Q₁₀.

ГЛАВА 5. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЗАИМОСВЯЗИ СТРУКТУРА-АКТИВНОСТЬ В РЯДУ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗ- γ -ПИРОНА.

Синтезируя производные хромона, мы не ставили перед собой задачу получить как можно больше соединений. Наоборот, мы решили ограничиться минимальным числом соединений, в том числе ранее описанных в литературе, для того, чтобы не только на качественном, но и на количественном уровне исследовать закономерности структура-активность с использованием параметров, отражающих квантово-химические характеристики молекул и наиболее объективно свидетельствующих о взаимном влиянии атомов в данной структуре. Для выявления связи между биологической активностью и структурой внутри групп родственных соединений анализ следует проводить не только на качественном уровне, но и количественно. Это позволяет определить функциональные зависимости между уровнем конкретного вида активности и объективными параметрами изучаемых молекул. Используемые при этом корреляционные уравнения позволяют судить о степени достоверности полученных результатов. При определении зависимостей структура-активность синтезированных соединений нами была использована интерпретация коэффициентов корреляции по Спирмену. На наш взгляд, наиболее объективными и достоверными параметрами любой молекулы являются такие ее квантово-химические параметры, как Малликеновские заряды ($a.e.$) на атомах, образующих конкретную структуру, связевые числа (N_{μ}), теоретическая валентность (V_{μ}), индекс ненасыщенности (IUA), электронная плотность. Приведенные выше квантово-химические параметры полученных соединений (всего 18) рассчитаны полуэмпирическим методом *PM7* (программа *WinMoras 2016*) с помощью процессора Intel Xeon ES- 1620 3.5 Гц, 20 Гб оперативной памяти. При изучении функциональных зависимостей между различными видами активностей синтезированных веществ и найденными для них параметрами, мы учитывали, что соединения 1- 4, 12, 13, 14, 17 и 18 отличаются от веществ 5, 6, 7, 10, 11, 15 и 16 отсутствием в их структуре атомов галогенов (F, Cl и I).

Известно, что атомы галогенов, находясь в ароматическом ядре, оказывают сильный отрицательный индуктивный эффект (-I эффект), явно преобладающий над слабым положительным мезомерным эффектом (+M эффект), т.е. $-I \gg +M$.

По-видимому, этим объясняется, что перечисленные выше соединения 5-7, 10, 11, 15 и 16 характеризуются относительно высокой токсичностью (для 5-7 LD₅₀ составляет, примерно, 2067-2030) и более низким фармакологическим эффектом. Соединения 15,16 и 17 хотя и менее токсичны - LD₅₀ 3081, 3467 и 3110 соответственно, но по значениям энергии докинга уступают наиболее активному веществу 18.

Мы оценивали также корреляционную зависимость нейропротекторной и антиапоптотической активности от величины энергии докинга.

Ниже приведены графики функциональных зависимостей между энергией докинга и перечисленными выше видами активностей (рисунки 1 и 2).

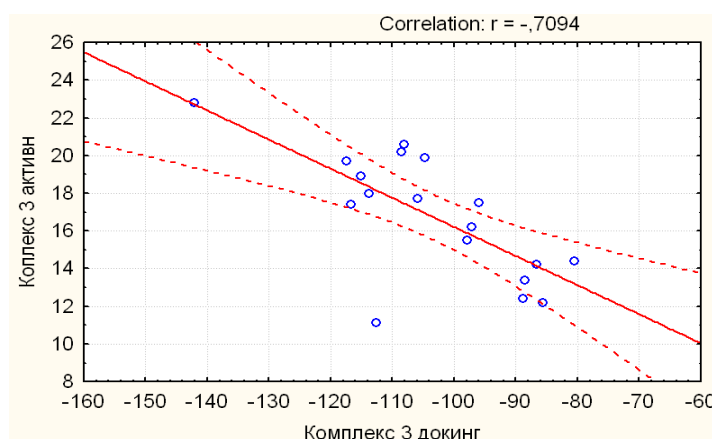


Рисунок 1 – Зависимость нейропротекторной активности синтезированных соединений *in vivo* от энергии докинга убихинол цитохром с-редуктазы

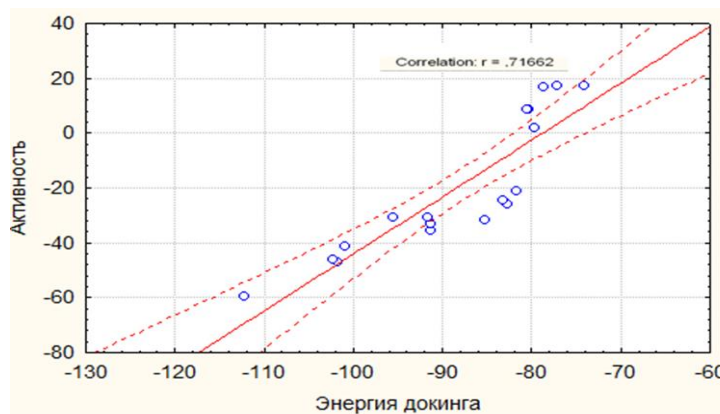


Рисунок 2 – Зависимость антиапоптотической активности синтезированных соединений *in vivo* от энергии докинга каспазы 3

Из представленных графиков видно, что между энергиями докинга и соответствующей активностью имеет место линейная зависимость с коэффициентами корреляции 0,7094 (нейропротекторная) и 0,7166 (антиапоптотическая) активности, которые согласно Спирмену считаются достаточно сильными.

Для изучения функциональных зависимостей между активностью и соответствующими характеристиками молекул, мы сочли более рациональным для каждого соединения использовать суммарные значения квантово-химических параметров.

Таблица 2 – Суммарные значения квантово-химических параметров

	Заряды, (a.e)	Связевые числа (N _μ)	Теоретическая валентность (V _μ)	Индекс ненасыщен- ности (IUA)	Электрон- ная плотность	F _μ
Соединение 1	-0,96	43,662	45,695	2,033	58,9557	9,531
Соединение 2	-1,26	49,269	51,558	2,289	69,2631	10,68
Соединение 3	-1,4	54,773	57,575	2,802	79,4021	11,67
Соединение 4	-1,43	54,592	57,437	2,845	79,4296	11,843
Соединение 5	-0,843	44,591	46,768	2,177	65,8429	5,598
Соединение 6	-0,841	44,62	46,816	2,196	65,8411	9,577
Соединение 7	-0,83	44,649	46,798	2,149	65,8298	9,564
Соединение 8	-2,127	72,609	75,968	3,359	93,1269	16,452
Соединение 9	-1,33	46,663	48,8	2,14	64,3331	9,421
Соединение 10	-1,22	46,588	49,873	3,285	71,2223	9,492
Соединение 11	-1,22	47,632	49,919	2,287	71,2211	9,475
Соединение 12	-2,01	74,135	77,33	3,195	92,0069	16,737
Соединение 13	-2,66	81,896	85,212	3,316	100,656	18,435
Соединение 14	-2,56	79,519	83,11	3,591	94,3222	17,882
Соединение 15	2,0561	78,8170	80,4190	1,6020	105,0559	17,027
Соединение 16	-2,3471	80,7590	84,3970	3,6380	112,3472	17,838
соединение 17	-2,48	81,478	85,155	3,677	108,4686	18,149
Соединение 18	-4,86	112,744	116,857	4,113	142,8623	24,624

Поскольку экспериментально было установлено, что наличие галогенов значительно снижает антиоксидантную, нейропротекторную и антиаллергическую активности, мы сочли целесообразным одновременно выявить корреляционные зависимости перечисленных видов активности от тех же квантово-химических параметров в соединениях, не содержащих галогены.

Таблица 3 – Коэффициенты корреляции антиаллергической активности

Все соединения, в том числе содержащие галогены		Соединения, не содержащие галогены	
параметр	r	параметр	r
а.е.	0,607	а.е.	0,8080
N μ	0,7508	N μ	0,7631
V μ	0,7565	V μ	0,7640
IUA	0,7071	IUA	0,7573
Эл.пл.	0,7407	Эл.пл.	0,7882
F μ	0,7543	F μ	0,8461

Из данных таблицы 3 следует, что коэффициенты корреляций для соединений, не содержащих галогены, значительно выше, чем для галогенсодержащих производных. Особо следует отметить, что максимальные значения коэффициента корреляции (r) наблюдаются при использовании таких параметров, как заряды на атомах (а.е.) и индекс свободной валентности (F μ). Значение r существенно возрастает когда в качестве параметра фигурирует *электронная плотность*.

Далее были изучены корреляционные зависимости антиоксидантной активности.

Таблица 4 – Коэффициенты корреляции антиоксидантной активности

Все соединения, в том числе содержащие галогены		Соединения, не содержащие галогены	
параметр	r	параметр	r
а.е.	0,47816	а.е.	0,66796
N μ	0,7021	N μ	0,6848
V μ	0,7035	V μ	0,6882
IUA	0,5501	IUA	0,7603
Эл.пл.	0,6656	Эл.пл.	0,7395
F μ	0,7381	F μ	0,8193

Из таблицы 4 следует, что коэффициенты корреляций для соединений, не содержащих галогены, значительно выше, чем для галогенсодержащих производных. Максимальные значения r наблюдаются при использовании таких

параметров, как индекс ненасыщенности (*IUA*) и индекс свободной валентности (*F_μ*).

Изучение функциональных зависимостей между нейропротекторной активностью и квантово-химическими (таблица 5) параметрами выявило существенную разницу в значениях *r* соединений, не содержащих галогены по сравнению с таковыми галогенсодержащих производных.

В сводной таблице 5 для сравнения представлены значения коэффициентов корреляции для обеих групп соединений.

Таблица 5 – Коэффициенты корреляции нейропротекторной активности

Все соединения, в том числе содержащие галогены		Соединения, не содержащие галогены	
параметр	<i>r</i>	параметр	<i>r</i>
а.е.	0,3737	а.е.	0,7877
N _μ	0,74010	N _μ	0,78655
V _μ	0,73927	V _μ	0,78952
IUA	0,51634	IUA	0,84437
Эл.пл.	0,77884	Эл.пл.	0,86929
F _μ	0,76814	F _μ	0,93701

Из данных таблицы 5 следует, что коэффициенты корреляций для соединений, не содержащих галогены, значительно выше, чем для галогенсодержащих производных. Максимальные значения *r* наблюдаются при использовании таких параметров, как *индекс свободной валентности (F_μ)*, *электронная плотность* и *индекс ненасыщенности (IUA)*.

Общие выводы

1. На основании логико–структурного подхода нами определена базовая структура (хромон) и заместители, приносящие вклад в соответствующие виды фармакологической активности (ОН, ОСН₃, ОАс, галогены), после чего по программе *Way2Drug PASS Online* был осуществлен виртуальный скрининг, который позволил отобрать соединения, вероятная активность которых превышает 50%.

С помощью программы *Molegro Virtual Docker* осуществлен докинг по отношению к убихинол цитохром с-редуктазе и каспазе 3, которые как

фармакотерапевтические мишени могут характеризовать наличие нейропротекторной и апоптоз-регулирующей активности целевых соединений.

2. Используя 2-гидроксиацетофенон и его галоген-, метокси- и ацетоксипроизводные по реакции Вильсмайера с выходом 70% синтезированы соответствующие хромоны.

На основе хромон-3-альдегида впервые получены аналоги халконов, в которых бензольное ядро циннамоильного фрагмента заменено на остаток хромонила-3.

3. Исследуемые производные хромона и аналоги халкона обладают низкой системной токсичностью и относятся к 5-му классу химической опасности по СГС-классификации с LD₅₀ более 2000 мг/кг при пероральном введении.

Оценка фармакологической активности исследуемых веществ показала, что изучаемые соединения обладают ангиопротекторным, антигипоксическим, антиоксидантным, апоптоз-регулирующим и вазоактивным действием.

В ряду исследуемых веществ наиболее высокая активность была отмечена для аналога халкона, имеющего в своей структуре 4-гидрокси-3,5-дитретбутилфенильный заместитель, который вероятно и определяет повышенную степень взаимодействия данного вещества с биохимическими мишенями.

4. Установлено, что при конструировании целевых структур в данном ряду не желательно вводить атомы галогенов в ароматическое ядро, поскольку они снижают антиаллергическую, нейропротекторную и антиапоптотическую активности, повышая одновременно токсичность.

5. Для выявления закономерностей взаимосвязи структура-активность нами были использованы такие квантово-химические параметры, как Малликеновские заряды на атомах – а.е., связевые числа – N_μ, теоретическая валентность – V_μ, индекс ненасыщенности – IUA, электронная плотность и индекс свободной валентности – F_μ, с каждым из которых выявлены функциональные зависимости, имеющие линейный характер.

Установлено, что:

- коэффициенты корреляции для всех синтезированных соединений, включая галогенсодержащие, в каждом конкретном случае значительно ниже, чем у производных, не содержащих галогены;

- у соединений, не содержащих галогены, при анализе антиаллергической активности коэффициенты корреляций принимают максимальные значения, когда в качестве параметра используется величина Малликеновского заряда – а.е. $r=0,8080$ и индекс свободной валентности – $F_{\mu} r=0,8461$.

- для антиоксидантной активности максимальное значение r наблюдается при использовании таких параметров как индекс ненасыщенности – IUA

$r=0,7603$ и индекс свободной валентности – $F_{\mu} r=0,8193$ для структур, не содержащих галогены;

- для соединений, не содержащих галогены, максимальные значения r наблюдаются в тех случаях, когда в регрессионные уравнения вводятся параметры а.е. (0,7877); IUA (0,84437); электронная плотность (0,86929) и индекс свободной валентности – F_{μ} (0,93701).

Практические рекомендации

1. Продолжить исследования по синтезу новых производных хромона с целью дальнейшего изучения их фармакологических свойств и закономерности структура-активность.

2. Целесообразно осуществить углубленные фармакологические исследования с целью выявления особенностей фармакодинамики и фармакокинетики.

3. Продолжить изучение функциональных зависимостей между фармакологическими свойствами и другими квантово-химическими параметрами.

Перспективы дальнейшей разработки темы

С целью создания инновационных отечественных безопасных лекарственных средств с поливалентным спектром фармакологической активности целесообразно продолжить изучение соединения 18 и родственных ему веществ.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Руковицина, В. М. Новые производные хромона, обладающие антиаллергической активностью / В. М. Руковицина // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины: материалы 74-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием. – Волгоград, 2016. – С. 622.

2. Поздняков, Д. И. Оценка влияния 4-гидрокси-3,5-дитретбутил коричной кислоты на состояние эндотелиальной функции в условиях экспериментальной ишемии головного мозга / Д. И. Поздняков, В. М. Руковицина // Актуальные аспекты экспериментальной и клинической фармакологии: от молекулы к лекарству: материалы III международной научно-практической конференции. – Пятигорск, 2017. – С. 54-56.
3. Влияние новых производных хромон-3-альдегида на развитие мышечной дисфункции в условиях эксперимента / А. В. Воронков, Д. И. Поздняков, В. М. Руковицина [и др.] // Крымский терапевтический журнал. – 2018. – № 4. – С. 67-71.
4. Antioxidant activity of new chromon-3-aldehyde derivatives under conditions of muscular dysfunction / A.V. Voronkov, D.I. Pozdnyakov, V.M. Rukovitsyna [et al.] // Issues of Bio. Med. and Pharm. Chem – 2018. – Vol. 21, № 6. – С. 38.
5. Некоторые аспекты безопасности и фармакологической эффективности (влияние на мышечную дисфункцию) новых производных хромон-3-альдегида / А. В. Воронков, Д. И. Поздняков, В. М. Руковицина [и др.] // Спортивная медицина: наука и практика. – 2018. – Т. 8, № 3. – С. 65-71.
6. Антиоксидантная активность новых производных хромон-3-альдегида в условиях мышечной дисфункции / А. В. Воронков, Д. И. Поздняков, В. М. Руковицина [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2018. – Т. 21, № 6. – С. 38-42.
7. Прогноз и изучение специфической фармакологической активности новых производных 3-формилхромона / В. М. Руковицина, Д. И. Поздняков, Э. Т. Оганесян [и др.] // Во имя жизни и здоровья: материалы 71-й Международной научно-практической конференции. – Пятигорск, 2018. – С. 76-81.
8. Руковицина, В. М. Производные хромон-3-альдегида, обладающие противоишемической активностью / В. М. Руковицина, Д. И. Поздняков // Беликовские чтения: материалы VI Всероссийской научно-практической конференции. – Пятигорск, 2018. – С. 53-56.
9. In silico и in vivo исследование влияния производных хромон-3-альдегида на активность и продукцию цитохром с-оксидазы с целью коррекции

ишемических состояний / В. М. Руковицина [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. – 2019. – Т. 26, № 3. – С. 99-102.

10. Оценка дозозависимого действия 3-формил-замещенного производного хромона в условиях мышечной дисфункции / А. В. Воронков, Д. И. Поздняков, О. Ф. Веселова [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2019. – № 2(70). – С. 62-66.

11. Антирадикальные и хелатирующие свойства производных хромон-3-альдегида / А. В. Воронков, Д. И. Поздняков, В. М. Руковицина [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2019. – Т. 82, № 12. – С. 32-35.

12. Производные хромон-3-альдегида - ингибиторы сиртуина 2 в коррекции мышечной дисфункции. In silico и in vivo исследование / В. М. Руковицина [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2019. – Т. 22, № 2. – С. 43-48.

13. Влияние нового 3-формилзамещенного хромона на концентрацию миоглобина в сыворотке крови мышей в условиях длительных истощающих нагрузок / Д. И. Поздняков, А. В. Воронков, Е. А. Олохова, В. М. Руковицина // Человек и лекарство: сборник материалов XXVI Российского национального конгресса «Человек и лекарство». Тезисы докладов. М., 2019. – С. 130.

14. Chromone-3-Aldehyde derivatives improve muscle function by suppressing the formation of Apoptosis-Inducing factor [Электронный ресурс] / A. V. Voronkov, D. I. Pozdnyakov, V. M. Rukovitsyna [et al.] // Pharmacologyonline. – 2019. – Vol. 1. – Режим доступа: https://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2019/vol1/PhOL_201

15. Chromone-3-aldehyde derivatives – sirtuin 2 inhibitors for correction of muscular dysfunction [Электронный ресурс] / D. I. Pozdnyakov, A. V. Voronkov, A. E. Rybalko [et al.] // Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences. – 2019. – Vol. 32, № 1. – Режим доступа: <https://www.sciendo.com/article/10.2478/cipms-2019-0010>

16. Cardiotropic properties of chromone-3-aldehyde derivatives under an experimental cardiac infarction complicated with hypercholesterolemia [Электронный ресурс] / A. V. Voronkov, D. I. Pozdnyakov, V. M. Rukovitsyna [et al.] // Health Risk Analysis. – 2019. – № 3. – Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/336727955>

Cardiotropic_properties_of_chromone-3_aldehyde_derivatives_under_an_experimental_cardiac_infarction_complicated_with_hypercholesterolemia

17. Производные 3-формилхромона как модуляторы активности митохондриального комплекса III / В. М. Руковицина [и др.] // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2020. – № 4. – С. 114-121.

18. Pozdnyakov, D. I. Chromon-3-aldehyde derivatives restore mitochondrial function in rat cerebral ischemia [Электронный ресурс] / D. I. Pozdnyakov, A. V. Voronkov, V. M. Rukovitsyna // Iranian Journal of Basic Medical Sciences. – 2020. – Vol. 23, № 9. – Режим доступа: https://ijbms.mums.ac.ir/article_16105.html

19. Анти-апоптотическое действие производных 3-формилхромона в условиях экспериментальной ишемии головного мозга / А. В. Воронков, Д. И. Поздняков, Э. Т. Оганесян [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2021. – Т. 84, № 7. С. 6-10.

20. Влияние 3-[(е)-3-(3,5-дитрет-бутил-4-гидроксифенил)-3-оксопроп-1-енил]-6-метокси-хромен-4-она на окислительный статус головного мозга крыс в условиях церебральной ишемии / Д. И. Поздняков, В. М. Руковицина, В. Т. Абаев [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2021. – Т. 84, № 3. – С. 3-7.

21. Поздняков, Д. И. Влияние производных 3-формилхромона *in vitro* на агрегацию частиц β -амилоида и активность тирозиназы / Д. И. Поздняков, В. М. Руковицина, М. В. Ларский // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2021. – Т. 24, № 1. – С. 11-15.

22. Антицитокиновые эффекты аналогов халкона при экспериментальном "цитокиновом шторме" у крыс / М. В. Черников, Д. И. Поздняков, В. М. Руковицина [и др.] // Медицинский академический журнал. – 2021. – Т. 21, № 1. – С. 31-38.

РУКОВИЦИНА ВИКТОРИЯ МИХАЙЛОВНА

**СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ СТРУКТУРА-АКТИВНОСТЬ В
РЯДУ 3-ЗАМЕЩЕННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХРОМОНА**

3.4.2 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Подписано к печати « » _ г., формат 60 x 84 1/16

Бумага книжно-журнальная. Печать – ротاپринтная. Усл. печат. л. 1,0 Тираж 100
экз. Заказ № _

Отпечатано в Пятигорском медико-фармацевтическом институте – филиале
ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерство здравоохранения Российской Федерации
357532, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11.