

УДК 547.792.1:547.792.6: 15.332

Фізер М.М., к.х.н., викл.; Фізер О.І., м.н.с.; Девіняк О.Т., к.фарм.н., доц.;
Сливка М.В., к.х.н., доц.; Лендел В.Г., д.х.н., проф.

ТЕОРЕТИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ 1,2,4-ТРИАЗОЛІЛ-1-ДИТІОКАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ ЯК АНАЛОГА ДИКЛОФЕНАКУ

ДВНЗ «Ужгородський національний університет», 88000, м. Ужгород, вул. Підгірна, 46
e-mail: mmfizer@rambler.ru

Розробка нових синтетичних речовин, які б проявляли протизапальні властивості є актуальною задачею сьогодення. Широке застосування в медичній практиці знайшли нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП), що обумовлено їхньою вираженою протизапальною та анальгезуючою, жарознижуючою активністю. Дія НПЗП базується на блокуванні циклооксигенази (ЦОГ) – ферменту, який бере участь в утворенні простагландинів із арахідонової кислоти. Саме пригнічення дії ЦОГ обумовлює зменшення гіперемії, набряку, болю та запалення в цілому.

Один з найпоширеніших НПЗП є диклофенак натрію [1]. В літературі описано вдосталь досліджень по взаємодії диклофенаку з ЦОГ [2]. Так, в базі даних білків RCSB PDB [3] під кодом 3N8Y описані результати кристалографічного дослідження комплексу циклооксигенази-1 з диклофенаком. Даний комплекс є зручним об'єктом для теоретичного дослідження потенційних аналогів диклофенаку, як для порівняння структури досліджуваної молекули з геометрією диклофенаку, так і для прогнозування енергії зв'язування досліджуваної молекули з білком-мішенню.

Серед великої кількості раніше синтезованих сполук на кафедрі органічної хімії УжНУ [4], було проаналізовано їх потенційну активність за допомогою програми PASS [5]. Виявлено, що триазол **I** з доволі високим ступенем імовірності проявлятиме протизапальні властивості. При детальнішому дослідженні, було знайдено певну подібність між триазолом **I** і диклофенаком. Саме це теоретичне порівняння й стало об'єктом дослідження даної роботи.

Результати та їх обговорення

Синтез сполуки **I** описаний в попередніх роботах [6, 7]. Структура **I** містить 1,2,4-триазольний цикл, два фенільні кільця в положеннях 4 та 5, а також тіокарбоксіильну групу і тійонну групу (рис. 1). На перший погляд, подібність до диклофенаку не дуже помітна, однак при детальному розгляді структури цих двох сполук було відмічено наявність подібних ланок. Насамперед, це 2,6-дихлорофенільний замісник диклофенаку та фенільне кільце в положенні 4 триазолу **I**. Атом Нітрогену пірольного типу N4 триазолу **I** та атом Нітрогену диклофенаку є слабоосновними ($pK_{a(\text{пірол})} = -4.0$; $pK_{a(\text{дифеніламін})} = 0.9$). На відстані трьох атомів (у диклофенаку позначено 1,2,3, у випадку триазолу **I** – 5,1,2) від Нітрогену знаходиться карбоксіильна/тіокарбоксіильна група. Також в обох молекулах є додаткове фенільне кільце, за рахунок якого може посилюватися взаємодія з білком-мішенню через слабкі взаємодії внаслідок π -стекингу [8].

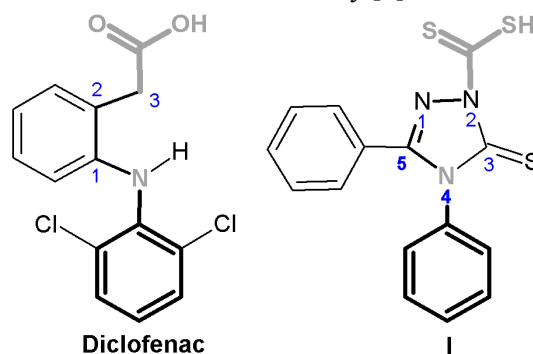


Рис. 1. Структурні фрагменти диклофенаку (зліва) та триазолу **I** (справа).

Для більш наочної презентації подібності цих двох молекул ми порівняли

схожі структурні фрагменти (на рис. 1 позначені жирним). Середньо-квадратичне відхилення виділених фрагментів склало всього 0.383 (рис. 2).

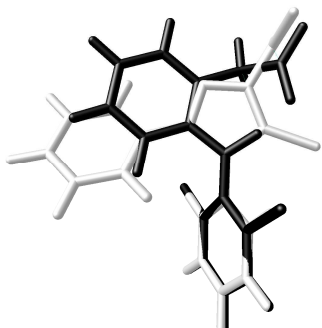


Рис. 2. Порівняння структури диклофенаку (чорний) та сполуки I (білий). RMSD=0.383.

Було проаналізовано часткові заряди по Хіршфельду, для подібних ланок двох молекул. Значення часткових зарядів в межах досліджуваних фармакофорних фрагментів є подібними з високою кореляцією ($R^2=0.7816$, рис. 3), а отже має місце однаковий характер перерозподілу електронної густини, що є додатковим доказом подібності цих структур.

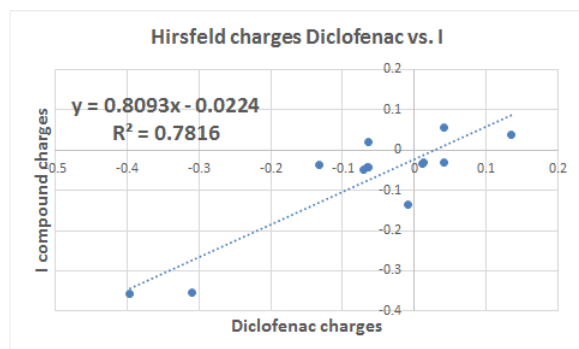


Рис. 3. Кореляція між частковими зарядами на відповідних атомах для молекул диклофенаку та триазолу I.

Окрім порівняння двох структур між собою, важливим насамперед залишається прогнозування можливої взаємодії з білком-мішенню. У даному випадку це можна провести з доволі високою точністю через наявність експериментально встановленої структури ЦОГ-1.

Для моделювання взаємодії триазолу I з мішенню ми використали активний сайт з всіма амінокислотами на відстані 4Å від референтного ліганду (молекули диклофенаку) – 13 амінокислотних фрагментів, а саме тирозин (3 залишки), валін, лейцин (2

залишки), серин (2 залишки), триптофан, метіонін, ізолейцин, гліцин, аланін. Вільні валентності були замінені на Гідрогени. Одержаний активний сайт складався з 232 атомів, з диклофенаком – 261 атом, а з триазолом I – 263.

Враховуючи розміри досліджуваної системи, для моделювання взаємодії з досліджуваним триазолом I та порівняння з диклофенаком було вирішено використати методи молекулярної механіки, з використанням силового поля SP4 [9]. Валідацію отриманих результатів зручно провести порівнянням геометричних параметрів кристалографічних даних з отриманими розрахованими. З рис. 4 видно, що оптимізація геометрії не сильно змінює загальну картину будови активного сайту ЦОГ-1 і середньо-квадратичне відхилення складає 0.913, що для системи такого розміру є абсолютною припустимим.

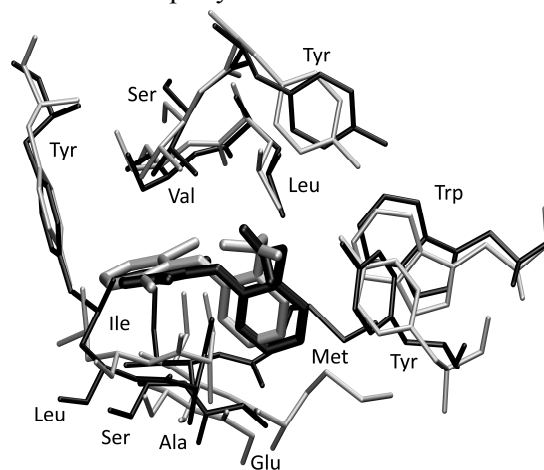


Рис. 4. Порівняння структури комплексу «карман»-диклофенак. Чорний – оптимізований SP4, білий – експериментальний. RMSD=0.913.

Для порівняння енергій взаємодії диклофенаку та триазолу I, було попередньо проведено повну оптимізацію геометрії комплексу активний сайт-ліганд, а також системи при віддаленні ліганду від активного сайту на відстань близько 100Å.

Таблиця 1. Вільна енергія Гіббса взаємодії ліганду з білком ЦОГ-1.

Сполука	Енергія комплексу, ккал/моль	Окремі складові, ккал/моль	ΔG , ккал/моль
Диклофенак	131.60	147.43	-15.83
Триазол I	166.09	179.88	-13.79

Отримані значення енергій зв'язування вказують на можливу близьку анагетичну дію триазолу **I** до диклофенаку, хоча і трохи меншу. Різниця в енергіях для різних лігандів складає всього 2.04 ккал/моль.

Окрім розрахунку вільної енергії Гіббса реакції зв'язування ліганду з білком-мішенню, було вирішено дослідити, які саме типи взаємодій присутні в утвореному комплексі. Для цього було проведено аналіз слабких нековалентних взаємодій в комплексах активний сайт-триазол **I** та активний сайт-диклофенак на рівні теорії DFT PBE/6-31+G* для геометрії SP4 та геометрії з експериментальних рентгено-структурних досліджень. Знову ж таки, враховуючи розміри системи, така задача далеко не є тривіальною.

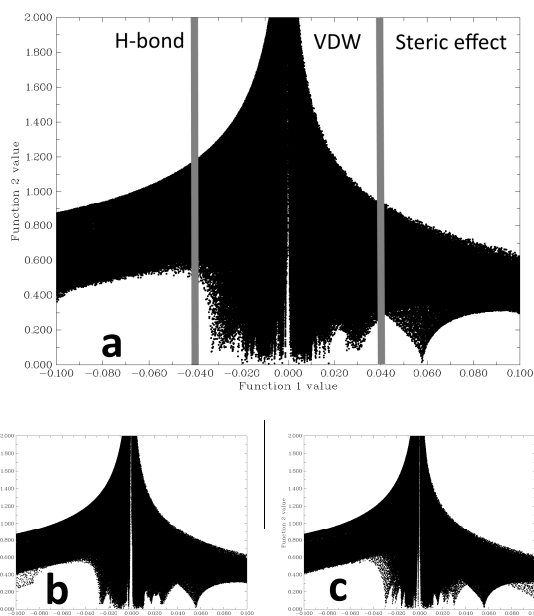


Рис. 5. RDG поверхня:
а – комплекс диклофенак : ЦОГ-1 (експеримент);
б – комплекс диклофенак : ЦОГ-1 (SP4);
с – комплекс триазол **I** : ЦОГ-1 (SP4).

Дослідження слабких взаємодій було проведено методом зменшення градієнту густини (RDG – Reduced Density Gradient) [10], як це реалізовано в програмі Multiwfn [11]. На рис. 5 представлено види взаємодій, які були знайдені у відповідному наближенні. Цікаво відзначити, що у даному комплексі не спостерігається водневих зв'язків між лігандом та протеїном, про це свідчить відсутність зубців у нижній частині області «H-bond». Стеричний ефект описує взаємо-

дію в циклах, і завжди присутній в системах, які, наприклад, містять бензольне чи циклогексанове кільце. Як видно з рис. 5 основним типом взаємодії є слабкі Ван-дер-Ваальсові. У всіх трьох випадках діаграми доволі схожі і це є додатковим доказом схожості між триазолом **I** та диклофенаком.

Експериментальна частина

Триазол **I** та диклофенак моделювали у вигляді аніонів. Початкову геометрію для сполуки **I**, диклофенаку, маніпуляції з геометрією проводили в програмі Avogadro [12]. Розрахунки методами молекулярної механіки проводили пакетом VEGA ZZ [13] з вбудованою програмою AMMP [14]. Для розрахунку початкових часткових зарядів на атомах, для молекулярної механіки, використовували програму MOPAC2016 [15] з напівемпіричним методом AM1 [16]. Для порівняння геометричних параметрів та часткових зарядів лігандів, проводили оптимізацію геометрії та розрахунок хвильових функцій в програмі ORCA [17], в наближенні PBE/6-31+G*. Аналіз хвильових функцій програми Multiwfn [11]. Візуалізуція здійснена в програмах VEGA ZZ [13] та Multiwfn [11].

Публікація містить результати досліджень, проведених за грантом Президента України за конкурсним проектом Ф-63/94-2016 Державного фонду фундаментальних досліджень.

Висновки

Розглянута 3,4-дифеніл-5-тіо-4,5-дигідро-1H-1,2,4-триазоліл-1-дитіокарбонова кислота (**I**) має структурну та електронну схожість з протизапальним засобом диклофенак, що було нами підтверджено за допомогою цілого ряду теоретичних методів. Очевидно, що подальша робота в дослідженні активності сполуки **I** є необхідною і перспективною, адже відомо, що похідні триазолу є мало токсичними і доволі легко переносяться хворими. Враховуючи велику кількість лікарських засобів, які містять фрагмент триазолу, синтез похідних та структурно схожих до триазолу **I** молекул, є в перспективі наших подальших досліджень.

Список використаних джерел

1. Шварц Г.Я. Фармакологические свойства и результаты клинического изучения нестероидного противовоспалительного препарата ортофена. *Химико-фармацевтический журнал*. 1997, 11, 1395–1398.
2. Sidhu R.S., Lee J.Y., Yuan Ch., Smith W.L. Comparison of cyclooxygenase-1 crystal structures: cross-talk between monomers comprising cyclooxygenase-1 homodimers. *Biochemistry* 2010, 49, 7069–7079.
3. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>.
4. Лендел В.Г., Онисько М.Ю., Сливка М.В., Балог І.М., Король Н.І., Кривов'яз А.О., Кут М.М., Луцьо С.А., Русин І.Ф., Фаринюк Ю.І., Фізер М.М., Хрипак Н.П. Наукова школа кафедри органічної хімії. Електрофільна гетероциклізація як універсальний метод створення гетероциклічних систем. *Науковий вісник Ужгородського університету. Серія «Хімія»*. 2016, 1(35), 16–21.
5. <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/index.php>.
6. Sukharev S.N., Chundak S.Yu., Sukhareva O.Yu., Slivka M.V. Extraction-Photometric Determination of Cadmium and Mercury in Waters. *Journal of Water Chemistry and Technology*. 1997, 19(5), 474–480.
7. Chundak S.Yu., Sukhareva O.Yu., Sukharev S.N., Khripak S.M., Slivka M.V. The Complexation and Extraction of Ion-Association of Cadmium, Mercury(II) and Lead(II) with Sulphurcontaining Triazoles and Basic Dyes. *Ukr. Khim. Zh.* 1997, 63(3), 37–41.
8. Wheeler S.E. Local Nature of Substituent Effects in Stacking Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 10262–10274.
9. Pencheva T., Lagorce D., Pajeva I., Villoutreix B.O., Miteva M.A. Ammos: automated molecular mechanics optimization tool for in silico screening. *BMC Bioinformatics*. 2008, 9, 438–452.
10. Johnson E.R., Keinan S., Mori-Sanchez P., Contreras-Garcia J., Cohen A.J., Yang W. Revealing Noncovalent Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 6498–6506.
11. Lu T., Chen F. Multiwfn: A multifunctional wavefunction analyzer. *J. Comp. Chem.* 2012, 33, 580–592.
12. Avogadro: an open-source molecular builder and visualization tool. Version 1.XX. <http://avogadro.openmolecules.net/>
13. Pedretti A., Villa L., Vistoli G. Vega – an open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming. *J.C.A.M.D.* 2004, 18, 167–173.
14. Harrison R.W. Stiffness and Energy Conservation in Molecular Dynamics: an Improved Integrator. *J. Comp. Chem.* 1993, 14, 1112–1122.
15. MOPAC2016, Version: 16.175W, James J.P. Stewart.
16. Dewar M.J.S., Zoebisch E.G., Healy E.F., Stewart J.J.P. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.* 1985, 107, 3902–3909.
17. Neese F. The ORCA program system. *WIREs Comput. Mol. Sci.* 2012, 2(1), 73–78.

Стаття надійшла до редакції: 09.11.2016.

THEORETICAL STUDY OF 1,2,4-TRIAZOL-1-YLDITHIOCARBONIC ACID AS AN ANALOGUE OF DICLOFENAC

Fizer M.M., Fizer O.I., Devinyak O.T., Slivka M.V., Lendel V.G.

3,4-Diphenyl-5-thio-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazolyl-1-dithiocarbonic acid **I** was theoretically studied for its similarity to a well known drug diclofenac. Similar geometries and fragment partial atomic charges between these two molecules were established. We calculated the binding energy of **I** to COX-1 and compared it with diclofenac value, which happens to be quite close. The analysis of intermolecular weak noncovalent interaction in complex triazole-COX-1 revealed that there are no Hydrogen bonds in the studied complex and all molecular interaction is based upon Van der Waals forces.