ПОИСК ПЕРСПЕКТИВНЫХ ГАМК-ЕРГИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ СРЕДИ СЕСКВИТЕРПЕНОВЫХ ЛАКТОНОВ ПОЛЫНИ ХОЛОДНОЙ

Погребняк А.В., Коновалов Д.А., Глушко А.А., Погребняк Л.В., Коновалов Ю.Б.

Пятигорская Государственная Фармацевтическая Академия, г.Пятигорск

Приводятся результаты исследований по изучению зависимости ГАМК-ергической активности сесквитерпеновых лактонов от особенностей электронной структуры их молекул, данные компьютерного прогноза и его экспериментальное подтверждение.

Биологическая активность – важнейшая характеристика химических соединений, являющаяся основой для их возможного применения в качестве лекарственных средств. Экспериментальное тестирование биологической активности является дорогостоящим и поэтому отбор перспективных веществ для тестирования имеет особое значение. Такой отбор может быть осуществлен на основе компьютерного прогноза спектра биологической активности веществ по их структурной формуле.

Шансы на успешное завершение работ по созданию нового лекарственного средства ничтожно малы – примерно 1:5000-10000. Необходимо «просеять» примерно 300-600 химических соединений, чтобы отобрать одно средство-кандидат. Примерно 15 таких кандидатов необходимо всесторонне исследовать, чтобы предложить на рынок хотя бы один лекарственный препарат. Процесс разработки и продвижения на рынок нового препарата требует затрат в 2000 человеко-часов и в среднем продолжается 12-15 лет [4].

Направленный синтез химических соединений позволяет значительно сократить стоимость исследований и быстрее пройти путь от ряда структур соединений к целевому лекарственному препарату. Прогнозирование таких свойств как токсичность, биодоступность, фармакологическая активность и т.д., выполняется путем построения количественных моделей зависимости свойств веществ от особенностей структуры их молекул – QSAR (Quantitative «Structure-Activity» Relationships) [5,10]. Понимание связи между химической структурой органических соединений и их биологическим действием является основой в исследованиях по созданию новых лекарств и пестицидов, а также в оценке токсичности окружающих нас химических соединений [13].

С 1994 года коллективом Пятигорской фармацевтической академии разрабатываются и апробируются различные методики анализа взаимосвязи «электронная структура-биологическая активность» [6]. К настоящему времени создан алгоритм прогноза, основанный на использовании максимально возможного числа физико-химических дескрипторов «реальной» трехмерной структуры органических молекул. Для максимального снижения стоимости прогноза использовались дескрипторы, получаемые современными теоретическими методами и, вместе с тем, обеспечивающие достаточную точность результатов.

Логично предположить, что в обучающий набор для прогнозирования биологических свойств новых молекул могут входить только всесторонне изученные и реально используемые в медицинской практике препараты. Тщательный отбор показал, что с достаточным статистическим весом в современной медицине используются немногим более тысячи индивидуальных органических соединений (молекул), остальные препараты являются их комбинацией, либо имеют синонимичные названия (поэтому общее число лекарственных средств по разным оценкам составляет от 8 до 12 тысяч наименований).

Так как для проведения точных расчетов размеры молекул уже не являются препятствием (даже в случае ангиотензинамида – 144 центра), основным этапом построения прогнозирующего алгоритма MATRIX послужил расчет дескрипторов отобранных молекул обучающей выборки современными квантовохимическими и топологическими методами [8].

Вторым этапом явился отбор и формулировка самого принципа (алгоритма) прогнозирования. Общий ход рассуждений при этом выглядел так: каждую молекулу (после соответст-

вующих расчетов) можно представить точкой в *n*-мерном пространстве, где *n* – количество дескрипторов. Зная такие «координаты» для молекул обучающей выборки и рассчитав аналогичный набор дескрипторов для нового соединения можно, на основании оценки расстояния между данным соединением и молекулами тестового массива, сделать заключение о возможной активности испытуемого вещества [6,7].

Объектом исследования была выбрана полынь холодная – Artemisia frigida Willd. (сем. Asteraceae) – многолетнее травянистое растение, широко распространенное в европейской части России, Западной Сибири, Средней Азии, Монголии, Северной Америке [9,12].

Из полыни холодной нами выделены четыре сесквитерпеновых лактона: фригины A, B, C и гроссмизин, ранее описанные в литературе [3,14]. Для представленных соединений предсказано 8 видов активностей, которые приведены с дозами в таблице. Указанные дозы – количества данного вещества в граммах, которые необходимо ввести в организм на каждый килограмм его веса для достижения эффекта.

Биологическая активность сесквитерпеновых лактонов полыни холодной

Прогнозируемый эффект	*Frigin A*	*Frigin B*	*Frigin C*	*Grossmisin*
Агонист бензодиазепиновых рецепторов	3.29118	-	-	-
Агонист М-холинорецепторов	3.36393	-	-	-
Ингибитор АКФ	2.84545	-	3.46770	-
Ингибитор ГМГ-КоА-редуктазы	3.00946	-	3.37622	-
Ингибитор ЦОГ-2	2.02391	-	-	-
Гестагенная активность	-	3.01833	3.24763	2.78575
Агонист ГАМК-рецепторов	-	-	-	0.08157
Агонист опиатных рецепторов	-	-	2.58563	-

Обращают внимание большие величины прогнозируемых доз. Следует отметить, что речь идет не об абсолютных величинах, а о ранжировании с использованием данной размерности. Параметризация алгоритма с целью получения более «реальных» величин не окажет влияния на взаиморасположение молекул и прогнозируемые виды активности.

Понятно, что чем меньше цифра, данная прогнозом, тем меньшее количество вещества требуется для достижения эффекта, т.е. выше активность. Как соединение с наибольшей биологической активностью обращает на себя внимание лактон гроссмизин (8-оксиахиллин) и спрогнозированная для него ГАМК-ергическая активность (агонист ГАМК-рецепторов, проявляющий свое действие в дозе порядка 0.08 граммов на килограмм массы тела).

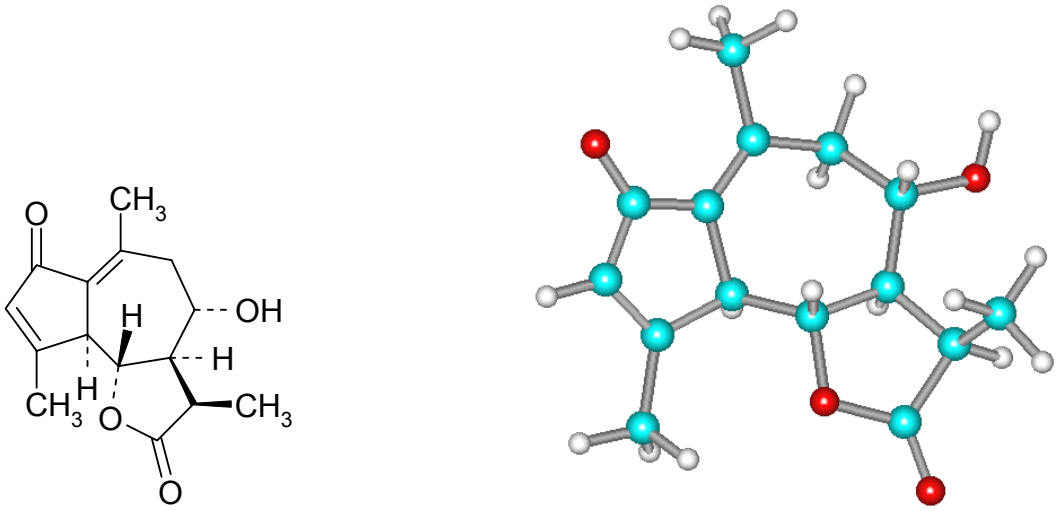


Рис.1. Формула и пространственная конфигурация гроссмизина

ГАМК-ергические вещества – соединения разной химической структуры. Под этим названием могут быть объединены вещества, способные имитировать эффекты самой ГАМК, изменять ее содержание в мозговой ткани, усиливать или ингибировать высвобождение медиатора из нервных окончаний, угнетать обратный захват ГАМК, препятствовать взаимодействию аминокислоты с пре- и постсинаптическими рецепторами, наконец, повышать чувствительность к ГАМК. Данные научной литературы свидетельствуют об участии системы гамма-аминомасляной кислоты мозга в патогенезе многих психо- и нейропатологических состояний, с одной стороны, и перспективности терапевтического использования самой аминокислоты и некоторых родственных соединений, с другой [11].

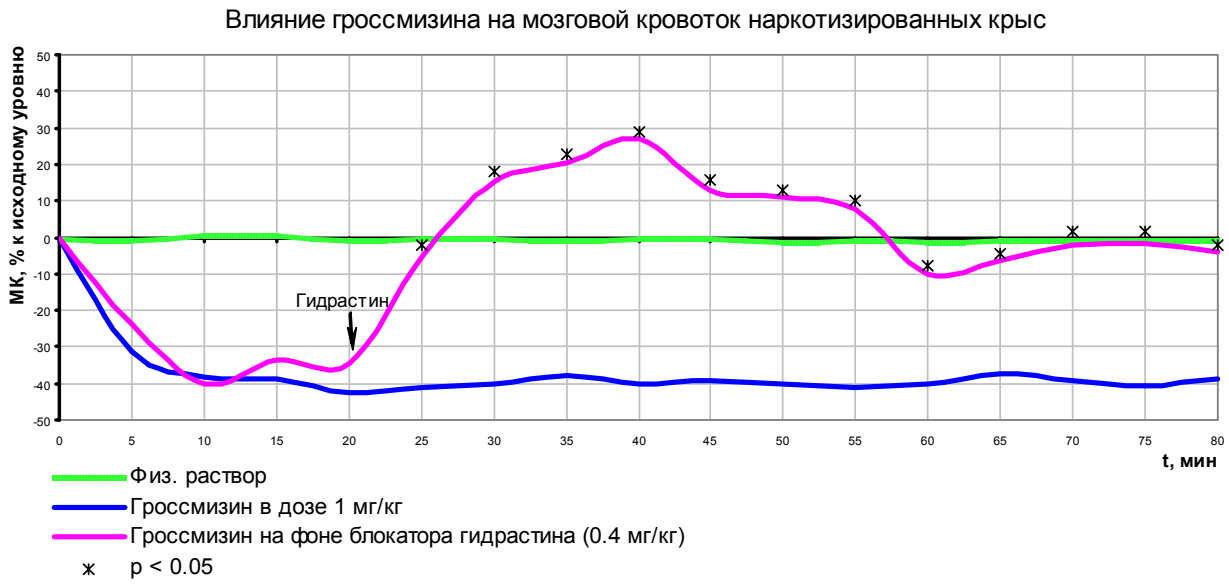
Обнаруженная в 1950 г. в мозге млекопитающих (Roberts, Frankel) ГАМК привлекла к себе внимание как один из природных метаболитов нервной ткани с предполагаемой медиаторной функцией. Уже на первом, преимущественно физиологическом, этапе изучения ГАМК ее стали рассматривать как своеобразное модельное соединение, которое может найти собственной терапевтическое применение и послужить основой для получения структурно родственных веществ, хорошо проникающих через гематоэнцефалический барьер. Данные о противосудорожном эффекте ГАМК, который был выявлен при введении аминокислоты, минуя гематоэнцефалический барьер, послужили поводом для ее использования в терапии судорожных расстройств. Имеются сообщения об успешном применении ГАМК и ее производных для лечения остаточных явлений перенесенного инсульта, снижения артериального давления, улучшения мозгового кровотока. Появились коммерческие препараты ГАМК и ее производных – гаммалон (аминалон), гамибетал, натрия оксибутират, фенибут [11].

Следующим этапом работы было подтверждение компьютерного прогноза. Эксперимент проводили на крысах-самцах линии Wystar (всего в опытах участвовало 24 крысы), выращенных в питомнике Пятигорской государственной фармацевтической академии. Изменения мозгового кровотока изучали методом водородного клиренса. Метод со времени его разработки получил широкое распространение для измерения локального кровотока в различных органах и тканях. Данный способ измерения органного кровотока базируется на общем принципе клиренса инертных газов из тканей и состоит в следующем. Если какой-нибудь орган насытить водородом до полного уравновешивания газа между кровью и тканями, то после прекращения ингаляции содержание водорода в артериальной крови понизится до нуля и с этого момента начнется его вымывание из органа с последующим выведением из организма через легкие [1,2]. Вычисление кровотока состоит в определении площади под кривой клиренса и начального значения кривой с последующим вычислением по формуле, в которой учитывается также развертка процесса:

$$f = 100 \cdot \lambda \frac{H \cdot K}{S} \, мл / 100г / мин.,$$ где

H - начальное (максимальное) значение кривой клиренса, мм; K - скорость развертки процесса, мм/мин; S - площадь под кривой клиренса, мм; λ - коэффициент диффузии ткань/кровь, для водорода значение во всех органах равно 1.

При введении вещества регистрировали значительное (на 30-40%) снижение мозгового кровотока через 15-20 минут после введения с сохранением показателей до конца эксперимента. Полученные данные обрабатывали статистически с помощью компьютерной программы «Excel». Результаты представлены в виде графика «Влияние гроссмизина на мозговой кровоток наркотизированных крыс». Зеленая линия – мозговой кровоток крыс при введении физиологического раствора (0.9% раствор натрия хлорида), практически не отличается от исходного уровня. Синем цветом отмечена кривая, полученная в результате введения исследуемого вещества гроссмизина – мозговой кровоток начал понижаться сразу же после введения вещества и достиг своего минимума на двадцатой минуте.



Для доказательства прогнозируемых свойств агониста γ-аминомасляной кислоты представляется возможным использовать блокатор ГАМК$_A$-рецепторов гидрастин [15]. Гидрастин вводили на максимуме эффекта, который приходился на двадцатую минуту. Через 10 минут после введения гидрастина (розовая кривая), мозговой кровоток у наркотизированных животных достоверно отличался от группы животных, которым вводили только гроссмизин.

В результате проведенных исследований можно сделать заключение о свойствах ГАМК-агониста у изученного соединения, так как эффект вещества (снижение мозгового кровотока) под влиянием блокатора гидрастина извратился – сменился на повышение мозгового кровотока.

Литература

1. *Демченко И.Т.* Измерение органного кровотока с помощью водородного клиренса // Физиол. журн. СССР им. Сеченова - LXVII, №1, 1981 – С.178-183
2. *Демченко И.Т., Буров С.В.* Непрерывная количественная регистрация локального мозгового кровотока с помощью водородного электрода и ЭПГ. Физиол. журн. СССР. - 1971. - Т.57, №10, - С.1553-1555
3. *Коновалова О.А., Шейченко В.И.* О химическом составе Artemisia frigida // Химия природ. соединений - 1991. - №1. С.143-145
4. Методология проведения клинических исследований // Український медичний часопис - №4 (24) - VII/VIII, 2001
5. *Погребняк А.В., Глушко А.А.* Основные направления практического использования результатов многомерного анализа молекулярных дескрипторов лекарственных веществ // IX российский национальный конгресс «Человек и лекарство»: тезисы докладов - Москва, 2002
6. *Погребняк А.В.* Применение полуэмпирических квантово-механических методов в анализе количественных соотношений структура - биологическая активность (обзор) // Журнал общей химии.- 1996.- Т.66, Вып.2.- С.277-285.
7. *Погребняк А.В., Василенко Ю.К., Оганесян Э.Т.* и др. Компьютерный прогноз и направленный синтез нового производного бетулина, обладающего противотуберкулезным действием // Хим.-фармац.журн. - 2002.- Т.36, №10.- С.18-20.
8. *Погребняк А.В.* Matrix - новый алгоритм прогнозирования биологического действия органических молекул основанный на многомерном анализе физико-химических дескрипторов современных лекарственных препаратов. I. Общие принципы. / А.В. Погребняк, Э.Т. Оганесян // Журнал органической химии.- 2002.- Т.38, Вып.11.- С.1618-1629.

9. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, из химический состав, использование; Семейство Asteraceae (Compositae). - СПб.: Наука, 1993 - 352 с.
10. *Раевский О.А.* Дескрипторы молекулярной структуры в компьютерном дизайне биологически активных веществ // Успехи химии. 1999, Т. 68, №6, С.555-575
11. *Раевский К.С.* Нейрохимические аспекты фармакологии ГАМК-ергических веществ // Фармакол. и токсикол. №5, 1981 – С.517-528
12. Флора СССР / Под гл. ред. акад. Комарова В.Л. - М.: Изд. Академии наук СССР,1961. - Т.XXVI – С.494-498
13. *Хэнч К.* Об использовании количественных соотношений структура-активность при конструировании лекарств // Хим.-фармац. журн., 1980, №10, С.15-30
14. *Bachelor F.W., Paralikar A.B., Ito S.* // Can. J. Chem. 1972. V.50. №3. P.333-335
15. *Huang J.H., Johnston G.A.* (+)-Hydrastine, a potent competitive antagonist at mammalian $GABA_A$ receptors.// Br. J. Pharmacol. - 1990. - N.99(4).- P.727-730