

ТЕХНОЛОГІЯ БРОДІННЯ, БІОТЕХНОЛОГІЯ ТА ФАРМАЦІЯ

М. В. Стасевич, В. І. Зварич, В. П. Новіков

Національний університет “Львівська політехніка”,
кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології
maryna.v.stasevych@gmail.comКОМП'ЮТЕРНЕ ПРОГНОЗУВАННЯ ПІД ЧАС ПОШУКУ
НОВИХ АНТИТРОМБОЦИТАРНИХ АГЕНТІВ З АНТИОКСИДАНТНИМ
ЕФЕКТОМ СЕРЕД СУЛЬФУРОВМІСНИХ ПОХІДНИХ
9,10-АНТРАХІНОНУ<https://doi.org/10.23939/ctas2019.02.115>

Проведено комп'ютерне прогнозування щодо ймовірного прояву антитромбоцитарної та антиоксидантної активностей для сульфуровмісних похідних 9,10-антрацендіону з використанням онлайн-програми *PASS Online* платформи *Way2Drug*. Встановлено, що для більшості сполук прогнозується антитромбоцитарна дія, яка доповнюється антиоксидантним ефектом. Здійснено молекулярне моделювання взаємодії з рецепторами-мішенями, які беруть участь у регуляції агрегації тромбоцитів та білками-мішенями, пов'язаними з процесом згортання крові. Визначено, що найвищий рівень зв'язування виявлений до вітаміну К-епоксидредуктази (VKOR), пов'язаної зі згортанням крові, а саме до активної зони білка *3KP9*. Показано, що сульфуропохідна 9,10-антрацендіону 3 відзначається значенням скорингової функції G_{score} на рівні відомого препарату Варфарину, що може свідчити про ймовірний механізм прояву антитромботичної дії.

Ключові слова: сульфуровмісні похідні 9,10-антрацендіону, *in silico* прогнозування, антитромбоцитарна активність, антиоксидантна активність, молекулярний докінг.

Вступ

Проблема артеріальних тромбозів є одним з важливих факторів, що визначають перебіг як захворювань серцево-судинної системи, так і онкозахворювань, які поділяють перше місце серед усіх захворювань – як в Україні, так і у світі [1]. Вони є причиною раптової смертності при інфаркті міокарда, судинних ускладненнях цукрового діабету, хіміотерапії онкозахворювань, а також знижують результативність хірургічного лікування ішемічної хвороби серця тощо. Механізми виникнення тромбозів є найрізноманітнішими: активація тромбоцитарної і коагуляційної ланки гемостазу, порушення синтезу чинників згортання крові II (протромбін), VII (проконвертин), IX (чинник Крістмаса), X (чинник Стюарта–Прауєра), зниження фібринолітичної активності крові, активація перикисного окиснення ліпідів, порушення функціональної

активності ендотелію тощо [2]. Тому серед препаратів з антитромботичною дією є як антиагрегаційні, антикоагулянтні, фібринолітичні, ендотеліотропні, так і антиоксидантні засоби. В останні роки доведено важливу роль перекисного окиснення ліпідів у патогенезі утворення тромбів [2].

Антитромбоцитарні і антикоагулянтні препарати, які використовують сьогодні, впливають на деякі етапи в процесі агрегації тромбоцитів і активації системи згортання крові. Однак їх ефективність часто не задовольняє клініцистів. Крім того, наявність побічних ефектів у цих препаратів з боку шлунково-кишкового тракту обмежують їх застосування у деяких категоріях хворих. Недостатність ефекту відомого антитромбоцитарного засобу Аспіріну може бути пояснена тим, що препарат блокує тільки один із шляхів активації тромбоцитів, механізм якого

пов'язаний з інгібуванням циклооксигенази і утворенням тромбоксану. Інша відома субстанція Клопідогрель, яка є похідною тієнопіридину (препарат для розрідження крові на його основі Плавікс Sanofi- Winthrop Industrie, Франція; Зілт, "KRKA", Словенія; Тромбонет, Фармак; Атрогрел, Борщагівський ХФЗ; Атерокард, Київський вітамінний завод), широко використовується і є обов'язковим для застосування у випадках стентування коронарних артерій. Біодоступність діючої субстанції препарату Плавікс французького виробника є найкращою, проте ціна його є достатньо високою.

Численні клінічні дослідження показують, що застосування інших сучасних антитромбоцитарних препаратів часто супроводжують такі побічні ефекти, як резистентність до їх дії, підвищений ризик виникнення неконтрольованих кровотеч, а також розвиток серйозних системних ускладнень [3], що поряд з високою вартістю таких лікарських засобів настановлює на необхідність проведення подальших досліджень щодо пошуку нових більш ефективних та безпечних субстанцій та розроблення на їх основі антиагрегаційних препаратів.

Група науковців [4, 5] виявила низку сполук з антиагрегаційною і антикоагулянтною дією серед антрахіноїдних похідних. Данські вчені одержали 1,4- та 1,8-похідні 9,10-антрахінону, які були включені в олігодеоксинуклеотиди для дослідження впливу на час згортання фібриногену в крові, що показало кращі антикоагуляційні властивості 1,8-заміщених антрахінонів [6]. Група американських науковців показала перспективність тимохінону як профілактичного антикоагулянта для використання в антикоагулянтній терапії при лікуванні онкозахворювань [7]. В Україні також проводяться дослідження з пошуку антитромботичних засобів [8].

Використання похідних антрахінонів як сполук з антитромботичними властивостями в основному представлене фітотерапевтичними дослідженнями екстрактів лікарських рослин [4, 5], які містять, крім діючих антрахінонів, суміші інших біологічно активних сполук, що не дозволяє адекватно оцінити вплив того чи іншого компонента на організм людини. В останні роки проводяться роботи з одержання нових 1,4- та 1,8-похідних 9,10-антрахінону та включення їх в

олігодеоксинуклеотиди для дослідження їх впливу на час згортання фібриногену в крові [6], проте ці дослідження є високовартісними і потребують великої кількості спеціального обладнання та умов.

Тому метою даної роботи було провести комп'ютерне прогнозування для сульфуровмісних похідних 9,10-антрацендіону для виявлення перспективних потенційних субстанцій з антитромбоцитарною дією, яка доповнюється антиоксидантною активністю.

Матеріали та методи досліджень

Для проведення *in silico* прогнозування сульфуровмісних похідних 9,10-антрацендіону **1-21** (рис. 1) та субстанцій порівняння як вихідну інформацію було використано структурні формули речовин як MOL або SDF файли програми ChemDraw [9], які вносились за допомогою відповідного меню інтерфейса доступного онлайн сервісу програми PASS Online платформи Way2Drug [10]. Результатом онлайн-прогнозування був список ймовірних фармакологічних ефектів з відповідними значеннями Ра, серед яких було відібрано активності, пов'язані з антитромбоцитарною та антиоксидантною діями.

Молекулярне моделювання взаємодії відповідного ліганда з відповідним білком-мішенню було проведено з використанням тестового доступу до Receptor Grid Generation та Glide Maestro програмного пакета Schrödinger Suite 2018-4 [11], у результаті чого визначено значення скорингової функції G_{score} , яка відображає рівень зв'язування до певного білка. Кристалографічні структури білків-мішеней одержано з Protein Data Bank (PDB) [12]. Для молекулярного докінгу досліджуваних структур обрано одинадцять рецепторів-мішеней, шість з яких беруть участь у регуляції агрегації тромбоцитів: циклооксигеназа-1 (COX-1) – 3N8X, глікопротеїн-IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) – 2VDM, глікопротеїн-VI (GP-VI) – 2G17, пуриновий рецептор P₂Y₁₂ – 4PXZ, простацикліновий рецептор (PG-I₂) – 4F8K і протеїн-активований рецептор-1 (PAR-1) – 3VW7. Як білки-мішені, пов'язані з процесом згортання крові, відібрано антитромбін III (АТІІІ), фактор-X (FX), фактор-II (F-II), фактор-IX (F-IX) і вітамін К-епоксидредуктаза (VKOR) з відповідними PDB-кодами 1NQ9, 1KSN, 5JZY, 1RFN та 3KP9.

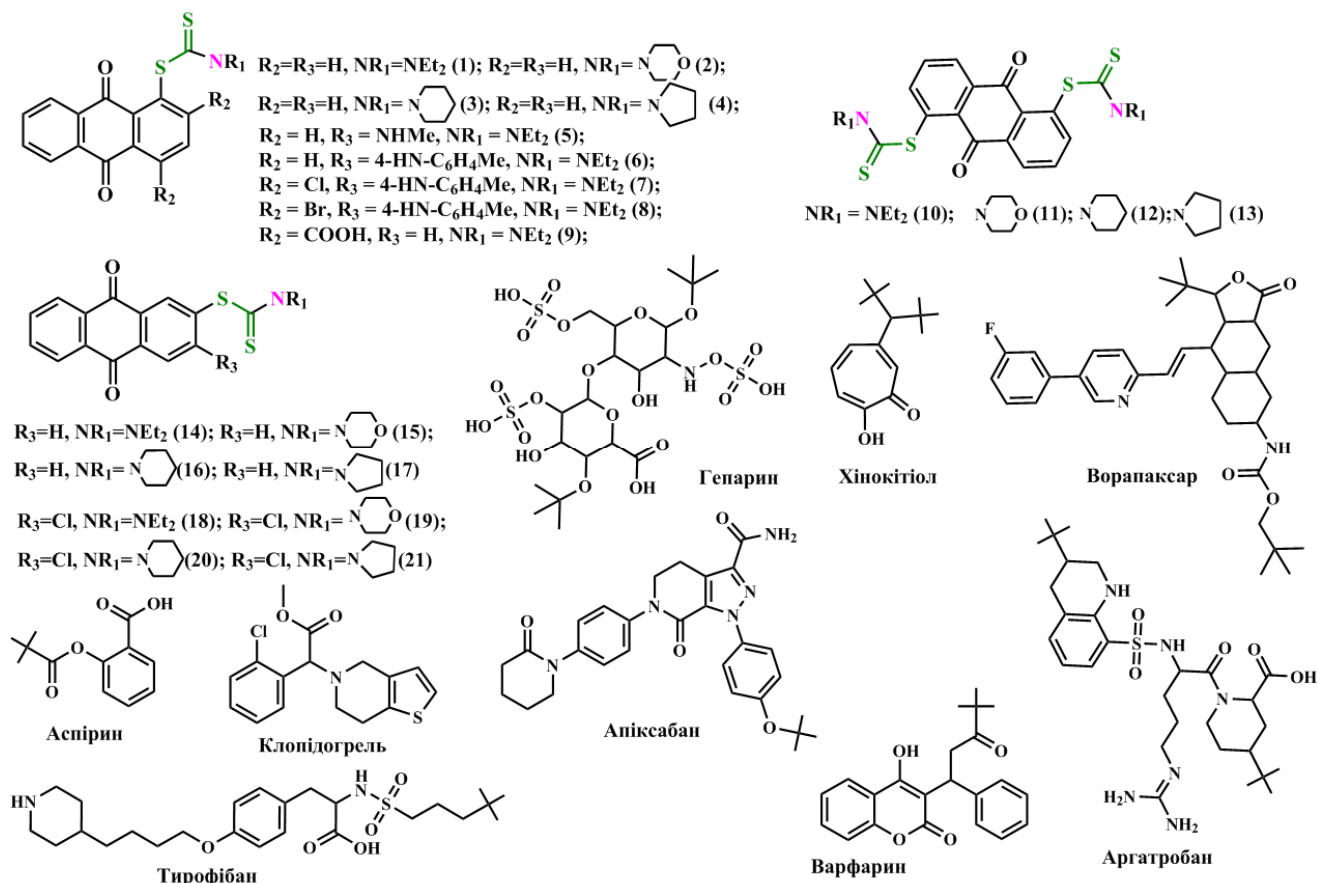


Рис. 1. Об'єкти для *in silico* дослідження

Результати досліджень та їх обговорення

Для пошуку нових субстанцій з анти-тромботичною активністю вибрано 21 сульфуровмісну похідну 9,10-антрацендіону **1-21** [13, 14]. Для порівняння використано відомі лікарські субстанції: рецепторів тромбоцитів – аспірин, тирофібан, хінокітіол, клопідогрель, ворапаксар та рецепторів згортання крові – гепарин, апіксабан, аргатробан, варфарин (рис. 1).

Беручи до уваги наш попередній позитивний досвід підтвердження в експерименті передбаченої за допомогою *PASS Online* біологічної активності [15–18], ми продовжили дослідження з виявлення на основі прогнозу сполук із плейотропним ефектом. Комп'ютерне прогнозування біологічної активності, проведене в режимі онлайн-доступу програмою *PASS Online* [10], і отримані результати (табл. 1) проаналізовано щодо ймовірності прояву анти-

тромбоцитарної дії (*Antithrombotic, Platelet aggregation inhibitor, Platelet antagonist, Anticoagulant*) та антиоксидантного ефекту (*Antihypoxic, Oxygen Scavenger, Peroxidase inhibitor, Superoxide dismutase inhibitor, Radical Formation Agonist, Catalase stimulant*).

Як видно з даних прогнозу (табл. 1), серед відомих антитромботичних субстанцій лише для семи з них характерний ймовірний прояв антиоксидантної активності, який є експериментально підтверджений для аспірину [19], хінокітіол [20], клопідогрель [21], гепарин [22], апіксабан [23], варфарин [24]. Серед досліджених сульфуровмісних похідних 9,10-антрацендіону для 17 з 21 сполуки прогнозується анти-тромбоцитарна дія, яка доповнюється анти-оксидантним ефектом, що вказує на необхідність експериментальних досліджень цих сполук на дані види активностей.

Таблиця 1

Дані прогнозування антитромбоцитарної та антиоксидантної активності за програмою PASS Online при $P_a > 0.2$

Прогнозована активність Структура	Антитромбоцитарна активність					Антиоксидантна активність					
	Antithrombotic	Platelet aggregation inhibitor	Platelet antagonist	Anticoagulant	Platelet adhesion inhibitor	Catalase inhibitor	Oxygen scavenger	Radical formation agonist	Peroxidase inhibitor	Superoxide dismutase inhibitor	Antihypoxic
Клопідогрель	0,723	0,712	0,385	0,332							
Апіксабан	0,365			0,244	0,335						0,262
Аргатробан	0,721			0,300							
Аспірин	0,611	0,281			0,735	0,489	0,545		0,615	0,847	0,611
Гепарин	0,494	0,249		0,356			0,269	0,238			
Хінокітіол	0,383	0,598			0,555	0,318	0,573		0,742	0,432	0,719
Тирофібан	0,651		0,584	0,506	0,346		0,275				
Варфарин				0,568	0,476	0,263	0,543		0,377		
1		0,549			0,368		0,318		0,716	0,878	0,489
2		0,422								0,318	
3		0,411			0,431						0,360
4		0,440			0,425						0,378
5		0,398								0,586	0,311
6										0,460	0,394
7								0,120	0,147	0,293	0,411
8								0,117		0,320	0,333
9		0,497	0,416		0,325	0,480			0,689	0,924	0,432
10			0,368			0,370	0,318	0,162	0,716	0,878	0,489
11		0,422	0,295					0,141		0,318	0,246
12		0,411	0,431				0,270	0,150		0,431	0,360
13		0,440	0,425				0,295		0,160	0,410	0,378
14		0,549	0,368			0,370	0,318	0,162	0,716	0,878	
15		0,422	0,295					0,141		0,318	
16		0,411	0,431					0,150		0,431	0,360
17		0,440	0,425				0,295			0,410	0,378
18		0,448				0,236		0,133	0,544	0,742	0,467
19			0,297							0,216	
20		0,285								0,298	0,343
21		0,317								0,283	0,360

З метою визначення ймовірного механізму дії перспективних сполук **1-21** та напрямку експериментальних тестувань було проведено молекулярний докінг. Результати *in silico* моделювання взаємодії досліджуваних структур **1-21** з білками-мішенями 3N8X, 2VDM, 2G17, 4PXZ, 4F8K, 3VW7, 1NQ9, 1KSN, 5JZY, 1RFN та 3KP9 показали, що 14 сполук у ряду сульфуропохідних 9,10-антрацендіону **1-21** виявляють доволі високий рівень зв'язування

(G_{score} від -10,39 до -8,24) до вітамін К-епоксидредуктази, пов'язаної зі згортанням крові, а саме до 3KP9 (табл. 2). Для інших білків досліджені структури **1-21** показали рівень зв'язування на середньому та нижче середнього рівня. Найвищий аффінітет до цього білка спостерігається для структури **3** зі значенням скорингової функції $G_{\text{score}} = -10.39$ і є на рівні аффінітету препарату порівняння Варфарину ($G_{\text{score}} = -10.45$).

Таблиця 2

Показники аффінітету з зоною білка 3KP9 для 14 структур та препарату Варфарину

Структура	Варфарин	3	4	2	5	15	23	14	16	18	17	19	11	9	6
G _{score}	-10,45	-10,39	-10,37	-10,19	-9,9	-9,81	-9,81	-9,63	-9,56	-9,42	-9,24	-9,19	-9,04	-8,92	-8,24

На рис. 2, 3 представлено візуалізацію зв'язування сульфуропохідної **3** з активною зоною 3KP9 білкової мішені вітамін К-епоксидредуктази.

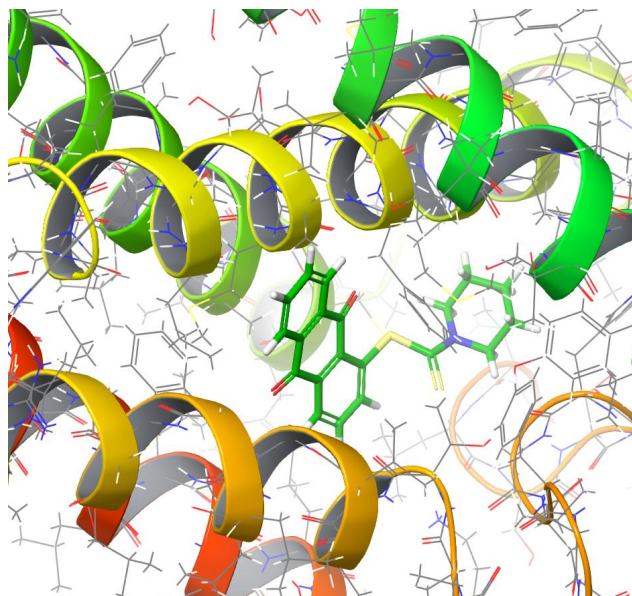


Рис. 2. Візуалізація зв'язування сполуки **3** з активною зоною білка 3KP9

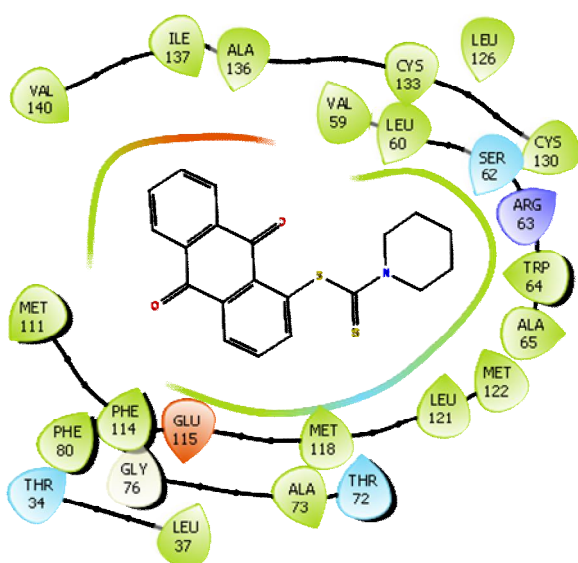


Рис. 3. Візуалізація взаємодій сполуки **3** у ділянці зв'язування з білковою мішенню 3KP9

Молекула сульфуропохідної 9,10-антрацендіону **3** (рис. 3) розташована у гідрофобній кишені, які утворюються амінокислотними залишками основного пептидного ланцюга: лейцину (LEU:60, LEU:121), ізолейцину (ILE:137), валіну (VAL:140, VAL:59), аланіну (ALA:136, ALA:65), метіоніну (MET:118, MET:122, MET:111), фенілаланіну (PHE:114) та триптофану (TRP:64), негативно зарядженими залишками глутамінової кислоти (GLU:115) та позитивно зарядженим фрагментом аргініну (ARG:63).

Висновки

Поєднання в одній молекулі біофорних фрагментів 9,10-антрахінонової та дитіокарбамоатної природи згідно з результатами прогнозування похідних 9,10-антрацендіону **1-21** з використанням онлайн-ресурсу *PASS Online* дозволило визначити потенційні анти-тромботичні субстанції з антиоксидантним ефектом для проведення їх експериментальних досліджень. Результати молекулярного моделювання за допомогою *Receptor Grid Generation* та *Glide Maestro* програмного пакета *Schrödinger Suite 2018-4* показали, що досліджені структури мають найкращий рівень зв'язування до білка-мішені, пов'язаного з процесом згортання крові, а саме до активної зони 3KP9 вітамін К-епоксидредуктази. Найвищий аффінітет до цього білка показала похідна **3**, для якої показник скорингової функції є на рівні препарату порівняння Варфарину. Це може вказувати на ймовірний механізм анти-тромбоцитарної дії даних сполук за рахунок зв'язування з активною зоною білка 3KP9 і утримування молекули у гідрофобній ділянці завдяки поєднанню у її структурі 9,10-антрахінонового та дитіокарбамоатного біофорних фрагментів.

Література

1. Gregson, J., Kaptoge, S., Bolton, T., Pennells, L., Willeit, P., Burgess, S., Meade, T. (2019). Cardiovascular Risk Factors Associated With Venous Thromboembolism. *JAMA Cardiology*, 4(2), 163–173. doi:10.1001/jamacardio.2018.4537
2. Jerjes-Sánchez, C. (2015). Mechanisms of Thrombosis. In: Jerjes-Sánchez, C. *Thrombolysis in Pulmonary Embolism* (pp. 1-17). Springer, Cham
3. Shoichiro, D. (2019). Adverse Effect of Antithrombotic Medications on Bleeding Events and Comparison of Antithrombotic Agents in Hemodialysis Patients. *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, 23(1), 32-37. doi: 10.1111/1744-9987.12744
4. Kaur, A., Kaur, S., Kaur, M., Mahajan, A., & Bose, S. (2014). Rheum emodi: a review on pharmacology and phytochemistry. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4(1), 1892-1902. Retrieved from http://www.wjpr.net/dashboard/abstract_id/2069
5. Memariani, Z., Moeini, R., Hamed, S.S., Narjes, G., & Mozaffarpur, S.A. (2018). Medicinal plants with antithrombotic property in Persian medicine: a mechanistic review. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 45(1), 158–179. doi: 10.1007/s11239-017-1580-3
6. Gouda, A. S., Amine, M. S., & Pedersen, E. B. (2016). Synthesis of New DNA G-Quadruplex Constructs with Anthraquinone Insertions and Their Anticoagulant Activity. *Helvetica Chimica Acta*, 99, 116-124. doi: 10.1002/hlca.201500207
7. Muralidharan-Chari, V., Kim, J., Abuawad, A., Naeem, M., Cui, H., & Mousa, S.A. (2016). Thymoquinone modulates blood coagulation in vitro via its effects on inflammatory and coagulation pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4), Article number 474. doi: 10.3390/ijms17040474
8. Halenova, T., Nikolaeva, I., Nakonechna, A., & Lubenets, V. (2017). Inhibition of human platelet aggregation by some newly synthesized S-esters of thiosulfonic acid. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, 1(1), 1276-1277. doi: 10.1002/rth2.12012
9. Chemaxon (2018). Retrieved from <http://www.chemaxon.com>
10. PASS Online (2019). Retrieved from <http://www.way2drug.com/PASSOnline/index.php>
11. Friesner, R. A., Murphy, R. B., Repasky, M. P., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Halgren, T. A., Sanschagrin, P. C., & Mainz, D. T. (2006). Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49, 6177-6196. doi: 10.1021/jm051256o
12. Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235-242. doi: 10.1093/nar/28.1.235
13. Zvarych, V., Stasevych, M., Lunin, V., Deniz, N. G., Sayil, C., Ozyurek, M., Guclu, K., Vovk, M., & Novikov V. (2016). Synthesis and investigation of antioxidant activity of the dithiocarbamates derivatives of 9,10-anthracenedione. *Monatshefte für Chemie*, 147(12), 2093-2101. doi: 10.1007/s00706-016-1839-y
14. Zvarych, V. I., Stasevych, M. V., Lunin, V. V., Vovk, M. V., & Novikov V. P. (2016). Synthesis of 9,10-anthracenedione diethyldithiocarbamates. *Russian Journal of General Chemistry*, 86(12), 2699–2701. doi: 10.1134/S1070363216120227
15. Zvarych, V. I., Stasevych, M. V., Stanko, O. V., Komarovskaya-Porokhnyavets, E.Z., Poroikov, V. V., Rudik, A. V., ... Novikov, V. P. (2014). Computerized prediction, synthesis, and antimicrobial activity of new amino-acid derivatives of 2-chloro-N-(9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-1-yl)acetamide. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 48(9), 584-588. doi: 10.1007/s11094-014-1154-z
16. Stasevych, M., Zvarych, V., Lunin, V., Deniz, N. G., Gokmen, Z., Akgun, O., ... Novikov V. (2017). Computer-aided prediction and cytotoxicity evaluation of some dithiocarbamates of 9,10-anthracenedione as new anticancer agents // *SAR and QSAR in Environmental Research*, 28(5), 355-366. doi: 10.1080/1062936X.2017.1323796
17. Stasevych, M., Zvarych, V., Lunin, V., Vovk, M., & Novikov V. (2017). The new 1,2,3-triazolylantracene-9,10-diones: synthesis and computer bioactivity screening. *Chemistry and Chemical technology*, 11(1), 1-9. doi: 10.23939/chcht11.01.001
18. Zvarych, V., Stasevych, M., Stanko, O., Novikov, V., Vovk, M., Poroikov, V., & Solovyov, O. (2013). Computer prediction and synthesis of new azoles based on N-benzoyl-N'-(9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-1-yl)thioureas. *Cheminé Technologija*, 61(2), 5–13. doi: 10.5755/j01.ct.64.2.6018
19. Shi, X., Ding, M., Dong, Z., Chen, F., Ye, J., Wang, S. ... Vallyathan V. (1999). Antioxidant properties of aspirin: Characterization of the ability of aspirin to inhibit silica-induced lipid peroxidation, DNA damage, NF-κB activation, and TNF-α production. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 199(1), 93-102. doi: 10.1023/A:100693461
20. Xu, Y., Wang, S., Miao, Q., Jin, K., Lou, L., Ye, X., Xi, Y., & Ye, J. (2017). Protective Role of Hinokitiol Against H2O2-Induced Injury in Human Corneal Epithelium. *Current Eye Research*, 42(1), 47-53. doi: 10.3109/02713683.2016.1151530

21. Taher, M. A. & Nassir, E. S. (2011). Beneficial effects of clopidogrel on glycemic indices and oxidative stress in patients with type 2 diabetes. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 19(2), 107-113. doi: 10.1016/j.jsps.2011.01.006
22. Nassiri, A. A., Hakemi, M. S., Soulati, M., Marashian, M., Rahbar, K., & Azizi, F. (2009). Effects of heparin and dalteparin on oxidative stress during hemodialysis in patients with end-stage renal disease. *Iranian journal of kidney diseases*, 3(3), 162-167. Retrieved from <http://www.ijkd.org/index.php/ijkd/article/view/178/122>
23. Cases, A., Vera, M., Palomo, M., Torramade S., Escolar G., & Diaz-Ricart, M. (2017). TO021 direct factor Xa inhibitor apixaban prevents endothelial activation and damage associated with chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 32(3), iii87. doi: 10.1093/ndt/gfx131
24. Winship, I., Ross, G., Nicoll, A., Hogan, C., Leong, Y., & Varigos, G. (2009). Antioxidant effect of warfarin therapy: a possible symptomatic treatment for erythropoietic protoporphyria. *Archives of Dermatology*, 145(8), 960-961. doi: 10.1001/archdermatol.2009.165.

M. V. Stasevych, V. I. Zvarych, V. P. Novikov

Lviv Polytechnic National University,

Department of Technology of Biologically Active Substances, Pharmacy and Biotechnology

**COMPUTER-AIDED PREDICTION IN SEARCH OF NEW ANTIPLATELET AGENTS
WITH ANTIOXIDANT EFFECT AMONG SULFUR-CONTAINING DERIVATIVES
OF 9,10-ANTHRAQUINONE**

A computer-aided prediction of the probable presence of anti-platelet and antioxidant activities for sulfur-containing derivatives of 9,10-anthracenedione using the online program *PASS Online* of the *Way2Drug* platform was carried out. It has been established that the antiplatelet effect is characteristic for the majority of compounds and supplemented with the antioxidant action. Molecular modeling of interaction with target receptors that are involved in the regulation of platelet aggregation and target proteins associated with the blood coagulation process was performed. It was determined that a high level of affinity was found for the active zone of the protein *3KP9* of vitamin K-epoxy-reductase (VKOR) associated with blood clotting. It was shown that the sulfur-containing derivative 9,10-anthracenedione 3 shows the value of the scoring function of G_{score} at the level of the well-known drug Warfarin, which may indicate the likely mechanism of antithrombotic action.

Key words: sulfur-containing derivatives of 9,10-anthracenedione, *in silico* prediction, antiplatelet activity, antioxidant activity, molecular docking.