

Т. А. Бухтіарова¹, Л. С. Бобкова¹, С. А. Демченко^{1, 2},
О. Ю. Баглай¹, О. В. Середенко¹, О. Є. Ядловський¹,
А. М. Демченко^{1, 3}

Особливості супрамолекулярної взаємодії 5,6,7,8-тетрагідро-2,2a,8a-тріазациклопента[сd] азуленів із циклооксигеназою-2 та арахідонат- 5-ліпоксигеназою в контексті протизапальної та протираковинної дії

¹Державна установа «Інститут фармакології та токсикології
Національної академії медичних наук України», м. Київ

²Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України, м. Київ

³Ніжинський державний університет імені Миколи Гоголя, м. Ніжин

Ключові слова: азулени, докінг-аналіз,
циклооксигеназа-2, арахідонат-5-
ліпоксигеназа, супрамолекулярна
взаємодія, протизапальна та
протираковинна дія

Останніми десятиліттями значна увага науковців зосереджена на пошуку мішень-орієнтованих лікарських засобів, так званих таргетних препаратів. Загальна концепція включає *in silico* дослідження низькомолекулярних сполук, комплементарних до макромолекули-мішені, зокрема інгібіторів ліпоксигенази для лікування запальних процесів, викликаних прозапальними метаболітами арахідонової кислоти (АА) ліпоксигеназного ланцюга її перетворень.

Ліпоксигеназа (5-LOX) відіграє важливу роль у синтезі лейкотрієнів (LT), які можуть викликати деякі гострі та хронічні запальні захворювання людини, такі як астма, ревматоїдний артрит, запальні захворювання кишечника, псоріаз, дерматит, нефрит, атеросклероз та інші [1–5]. У деяких працях [2–5] підтверджена важлива роль ліпоксигеназ,

зокрема арахідонат-5-ліпоксигенази (ALOX5), на початкових стадіях канцерогенезу простати, молочної залози, товстого кишечника, печінки та підшлункової залози. Тому інгібування ALOX5 може бути потенційним підходом до лікування запальних захворювань і раку [6, 7]. Пошук інгібіторів ALOX5 здійснюють як серед речовин природного походження, так і отриманих шляхом синтезу [8]. Відомі речовини природного походження, які привертають увагу науковців і є важливими для розробки нових ефективних і безпечних інгібіторів ліпоксигеназ, зокрема сполуки циклічної й ациклічної будови різних хемотипів, а саме: босвелієва кислота [9], кверцетин (5-LOX: IC₅₀ 6,6 мкмоль/л) [10], природний декатехол – нордигідрогваяретинова кислота (NDGA) (5-LOX: IC₅₀ 8,8 мкмоль/л) [11], потенційний інгібітор ALOX5 1-О-арахідоніл-3-О-(α-D-глюкопіранозил)гліцерол [2].

Серед речовин природного походження – пентациклічний тритерпеноїд 3-О-ацетил-11-кето-β-босвелієва кислота (утворюється в рослинах роду *Boswellia*), який виявляє

протизапальну дію, пригнічуючи синтез лейкотрієнів, а також цитотоксичний, цитостатичний та апоптотичний ефекти на клітинних лініях лейкемій, колоректального раку та пухлин головного мозку [9]. Вважається, що босвелієва кислота також зменшує симптоми астми. Останнє дослідження показало, що низькі дози екстракту *Boswellia serrata* можуть мати гепатопротекторну дію.

Серед синтетичних сполук натеper відомий селективний інгібітор *ALOX5* – препарат «Зілеутон», який інгібує утворення лейкотрієнів (*LTB4*, *LTC4* та *LTE4*) та використовується для підтримуючого лікування астми, не зважаючи на притаманні йому гепатотоксичні властивості [2]. Відомі й інші інгібітори *5-LOX*, зокрема такі антигістамінні препарати, як цетиризин і лоратадин. Лоратадин (блокатор H_1 -гістамінових рецепторів) пригнічує вивільнення лейкотрієнів і проявляє антиексудативні властивості. Особливістю будови його молекули є наявність семичленного циклу, з'єднаного з *пара*-хлорфенільним і піридинним фрагментами, що утворюють конденсовану трициклічну структуру.

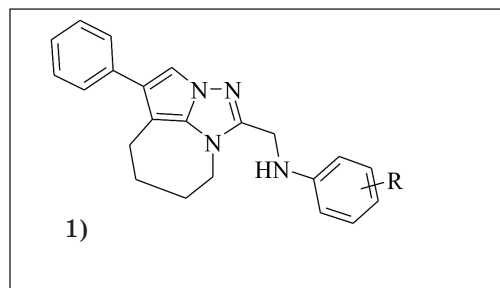
Зважаючи на важливу роль лейкотрієнів у розвитку гострого й хронічного запалення та раку, пошук потенційних інгібіторів ліпоксигенази виконували серед нових трициклічних конденсованих молекулярних структур з азепіновим фрагментом – похідних тріазациклопента[*cd*]азулену.

Мета дослідження – провести докінг-аналіз супрамолекулярних взаємодій похідних тріазациклопента[*cd*]азулену з циклооксигеназою-2 (*COX-2*) та *ALOX5* для визначення їхніх перспектив як потенційних кандидатів у лікарські засоби з мішень-залежним механізмом дії.

Матеріали та методи. *Макромолекули-біомішені.* Для досліджень

супрамолекулярних взаємодій нових лігандів як біомішеней було обрано макромолекули *COX-2* та *ALOX5* (*3LN1.PDB*) та (*3V99.PDB*) відповідно [12].

Нові ліганди. Досліджені віртуальні структури, представлені *N*-[(1-феніл-5,6,7,8-тетрагідро-2,2*a*,8*a*-тріаза-циклопента[*cd*]азулен-4-іл)-метил]-*R*-(або *R,R'*)-заміщеними анілінами загальної формули (1):



де *R* = *H* (ift-385 / 7745), *p*-Me (ift-387 / 7737), *p*-Cl (ift-389 / 1365), *p*-Br (ift-391 / 339), *o*-MeO (ift-393 / 9627), *R,R'* = 2,4-(MeO)₂ (ift-395 / 9459), 2,5-(MeO)₂ (ift-397 / 9460), 2-Me, 5-Cl (ift-399 / 7060).

Похідні тріазациклопента[*cd*]азулену характеризуються наявністю конденсованої трициклічної системи, утвореної азепіновим, тріазольним і пірольним фрагментами. Уведення різних замісників до фенільної групи ариламінometильного фрагмента тріазольного циклу характеризує особливості їхньої структури [13–16].

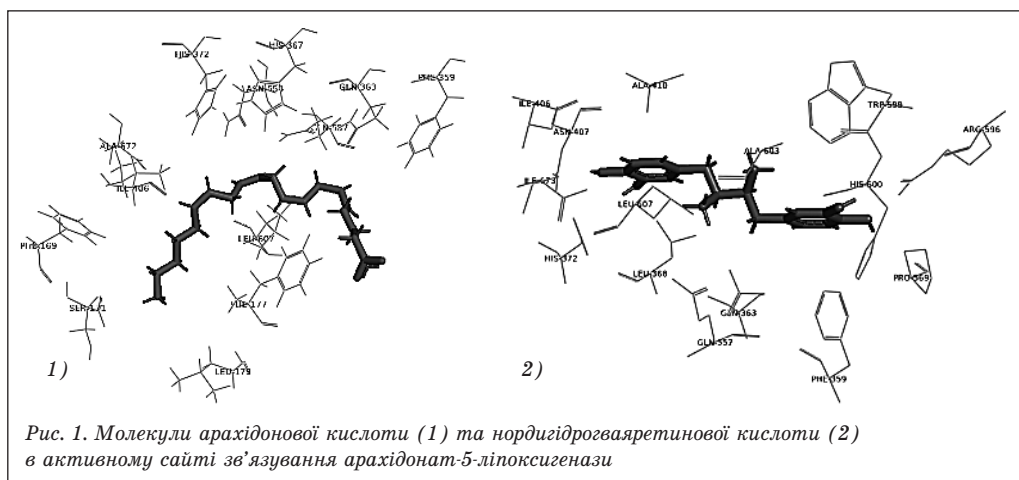
Докінг-дослідження. Докування обраних лігандів у макромолекули проведено за програмою AutodockVina за умови, що передбачала гнучкий ліганд, жорсткий рецептор, врахування всієї поверхні білкової молекули (без просторового обмеження зони зв'язування ліганду) [17–18]. Підготовку файлів для AutodockVina виконано у форматі AutodockTools 1.5.6 [19]. З метою пошуку оптимального розміщення молекули нового ліганду

на білку для кожної молекули відповідно до умов експериментів виконано до 32 досліджень. За результатами докінгу здійснювали 2D- та 3D-візуалізацію, використовуючи програму LigPlot+ (версія 1.4) для дослідження активного сайту зв'язування за схематичним 2D-зображенням [20]. Загальну оцінку положення ліганду в комплексі «ліганд-рецептор» і дослідження сайту зв'язування за амінокислотним оточенням ліганду в радіусі 4 ангстрем виконано за 3D-візуалізацією в програмі PyMol 2.3 [21].

Порівняльний аналіз. Результати докінгових досліджень порівнювали з даними міжмолекулярних комплексів молекули Целекоксибу в активному сайті зв'язування COX-2 (*pdbid: 3LN1*) та кислот AA та NDGA в активному сайті зв'язування ALOX5 (*pdbid: 3V99* та *6N2W* відповідно) за їхніми кристалографічними та докінг-формами [12, 22]. За попередніми дослідженнями аналіз показав, що молекула Целекоксибу (Езв. = -11,9 ккал/моль) в активному сайті зв'язування COX-2 оточена залишками амінокислот *HIS75*, *GLN178*, *VAL335*, *LEU338*, *SER339*, *TYR341*, *TRP373*, *ARG499*, *ALA502*, *ILE503*, *PHE504*, *MET508*, *VAL509*, *GLY512*, *ALA513* (*3LN1*) [22]. Для молекули

AA в активному сайті зв'язування ALOX5 визначили залишки *PHE169*, *SER171*, *PHE177*, *LEU179*, *PHE359*, *GLN363*, *HIS367*, *HIS372*, *ILE406*, *ASN554*, *PHE555*, *GLN557*, *LEU607*, *ALA672*, (*3V99*), а для молекули NDGA – *PHE359*, *GLN363*, *LEU368*, *HIS372*, *ILE406*, *ASN407*, *ALA410*, *GLN557*, *PRO569*, *ARG596*, *TRP599*, *HIS600*, *ALA603*, *LEU607*, *ILE673* (*6N2W*) (рис. 1).

Результати докінгових досліджень цільових лігандів із трициклічним фрагментом також порівнювали з результатами докінгових досліджень споріднених за структурою лігандів із дициклічним фрагментом (6,7,8,9-тетрагідро-5H-[1,2,4]тріазоло[4,3-*a*]азепіновим). Визначено, що ліганд 3-феніл-(6,7,8,9-тетрагідро-5H-[1,2,4]тріазоло[4,3-*a*]азепін (*ift-674*, модель 3) в активному сайті зв'язування ALOX5 (*3V99*) оточений залишками амінокислот: *PHE169*, *SER171*, *PHE177*, *HIS372*, *ILE406*, *LYS409*, *ALA410*, *GLN413*, серед яких залишки *PHE169*, *SER171*, *PHE177*, *HIS372*, *ILE406* є спільними з оточенням фрагмента AA. Проте для ліганду NDGA в активному сайті зв'язування ліпоксигенази характерною є інша зона, спільна з оточенням іншого фрагмента AA.



Синтез похідних тріазациклопента[cd]азулену був здійснений у декілька стадій при використанні відомих синтетичних підходів кандидатом фармацевтичних наук С. А. Демченком [14].

Протизапальна активність. Протизапальну активність похідних тріазациклопента[cd]азулену вивчали в дослідках *in vivo* на моделі карагенінового набряку порівняно з диклофенаком [14].

Протипухлинна активність. Протипухлинну активність вивчено в дослідках *in vitro* на 60 лініях ракових клітин (лейкемія, рак легень, колоректальний рак, злоякісні новоутворення центральної нервової системи, меланома та ін.), що були виконані в Національному інституті раку США (National Cancer Institute of Health, USA) у рамках Development Therapeutic Program за процедурою оцінки мітотичної активності методом флуоресцентного зафарбування [15, 16, 24–29].

Результати та їх обговорення.

Докінг-аналіз міжмолекулярних комплексів тріазациклопента[cd]азуленів з COX-2 (табл. 1). Загалом, міжмолекулярні взаємодії тріазациклопента[cd]азуленів з COX-2 (моделі 2–10) характеризуються вільною енергією зв'язування в межах від (-8,3) ккал/моль до (-9,5) ккал/моль (що складає 70–76 % відносно вільної енергії зв'язування целекоксибу). Ці комплекси мають спільні залишки амінокислот (TYR371, TYR373 та HIS75, ARG499), які також є характерними для активного сайту зв'язування целекоксибу. Проте за даними докінг-аналізу взаємодії «ліганд – COX-2» (щодо моделей 1) характеризуються енергіями зв'язку в межах від (-10,1) ккал/моль до (-10,7) ккал/моль (що відрізняється в 0,84–0,90 разу та 1,14–1,22 разу від енергій целекоксибу та диклофенаку в COX-2 відповід-

но) (табл. 1). Для них характерним є оточення такими спільними залишками, як GLY12, ASN24, ASN28, ARG29, GLY30, CYS32, TYR116, PRO140, ALA142, ARG455 та GLN447, які визначають окремий сайт зв'язування в COX-2. Візуалізацію просторової позиції досліджених лігандів у комплексах з COX-2 порівняно з целекоксибом наведено на рисунках 2–4.

За результатами докінг-аналізу міжмолекулярних комплексів досліджених лігандів визначені три особливості їхніх спільних позицій у COX-2. Найбільш енергетично вигідні комплекси (Езв: -10,1 ~ -10,7; 11 спільних залишків), для яких ліганди розташовуються на периферичній ділянці білка (окремий сайт зв'язування, в якому відсутні залишки, що характерні для комплексу целекоксибу). Інший окремий сайт зв'язування, в якому для лігандів в оточенні спільних для них залишків (від 7 до 11) є ті, що характерні для целекоксибу (суміжний сайт зв'язування щодо активного сайту зв'язування целекоксибу). Найінформативнішим щодо прогнозу інгібіторної активності є активний сайт зв'язування, в якому ліганди оточені характерними залишками амінокислот (7–14), що є спільними з оточенням целекоксибу. За результатами докінг-аналізу цій умові відповідає ліганд ift-387. За величиною середніх значень енергій зв'язування та співвідношенням між ними (а : в : с = 1,25 : 1,08 : 1) вірогідність позитивного прогнозу складає ~ 30–60 %.

Таким чином, особливою ознакою оточення досліджених лігандів є залишки амінокислот, які притаманні оточенню целекоксибу, що зумовлюють певну вірогідність механізму протизапальної дії за участю COX-2. Проте не виключена вірогідність

Таблиця 1

Результати порівняльного аналізу особливостей міжмолекулярної взаємодії циклооксигенази-2 з новими лігандами та з селективним (целекоксиб) і неселективним (диклофенак) інгібіторами циклооксигенази

R -(шифр)	Циклооксигеназа-2 (3LN1): Езв., залишки				Циклооксигеназа-2 (3LN1, m1_1*:Езв.		
	модель_ дослід	Езв., ккал/моль	Езв., відносно целекоксибу	залишки (відносно активного сайту зв'язування)	Езв., ккал/моль	відносно целекоксибу	відносно диклофенаку
H (lft-385 / 7745)	m10_1	-8,3	0,70	TYR371, TRP373	-10,1	0,85	1,15
	m9_1	-8,8	0,74	TYR371, TRP373			
p-Me (lft-387 / 7737)	m6_6	-9,3	0,78	HIS75, TYR341, LEU345, ARG499 ⁺	-10,1	0,85	1,15
	m9_1	-8,8	0,74	TYR371, TRP373			
p-Cl (lft-389 / 1365)	m2_2	-9,5	0,80	TYR371, TRP373	-10,0	0,84	1,14
	m10_1	-8,7	0,73	TYR371, TRP373			
p-Br (lft-391 / 339)	m9_1	-8,8	0,74	TYR371, TRP373	-10,1	0,85	1,15
	m9_3	-8,5	0,71	HIS75ARG499			
	m10_3	-8,5	0,71	відсутні*			

R -(шифр)	Циклооксигеназа-2 (3LN1): Езв., залишки					Циклооксигеназа-2 (3LN1, m1_1*:Езв.		
	модель_ дослід	Езв., ккал/моль	Езв., відносно целекоксибу	залишки (відносно активного сайту зв'язування)	Езв., ккал/моль	відносно целекоксибу	відносно диклофенаку	
o-MeO (lft-393 / 9627)	m7_1	-8,8	0,74	TYR371, TRP373	-10,4	0,87	1,18	
2,4-(MeO) ₂ (lft-395 / 9459)	m10-1	-8,6	0,72	HIS75ARG499	-10,6	0,89	1,20	
2,5-(MeO) ₂ (lft-397 / 9460)	m10_3	-9,0	0,76	TYR371, TRP373	-10,3	0,87	1,17	
2-Me,5-Cl (lft-399 / 7060)	m10_3	-9,0	0,76	TYR371, TRP373	-10,7	0,90	1,22	
Целекоксиб	-	-11,9	1	HIS75, ARG106, GLN178, VAL335, LEU338, SER339, TYR341, LEU345, LEU370, TRP373, ARG499, ALA502, ILE503, PHE504, MET508, VAL509, GLY512, ALA513, SER516, LEU517	-11,9	1,00	1,35	
Диклофенак	-	-8,8	0,74	відсутні*	-8,8	0,74	1,00	

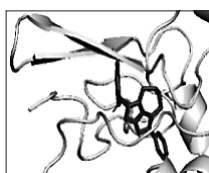
Примітка. *Спільні залишки з целекоксибом у зазначеній моделі відсутні, +додаткові залишки: ARG106, GLN178, VAL335, LEU338, SER339, ALA502, ILE503, PHE504, VAL509, LEU517.



Ift-387, m1_e1 у COX-2



Ift-389, m1_e1 у COX-2

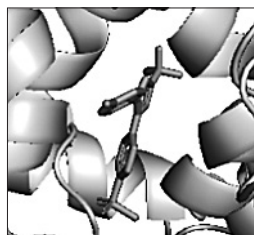


Ift-393, m1_e1 у COX-2

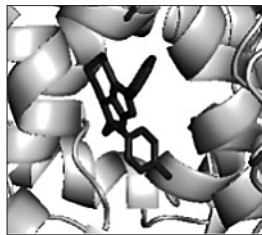


Ift-399, m1_e1 у COX-2

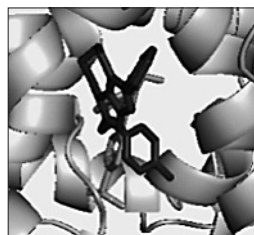
Рис. 2. Візуалізація фрагмента позицій лігандів (m1_e1) в окремому сайті зв'язування циклооксигенази-2



*Целекоксиб
(Езв= - 11.9 ккал/моль)*



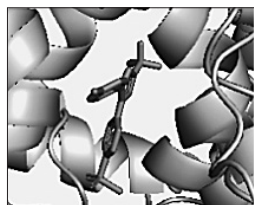
Ift-387 (Езв= - 8.8 ккал/моль)



Ift-387 та целекоксиб

Рис. 3. Візуалізація фрагмента позиції Ift-387 (m9_e1) у суміжному сайті зв'язування циклооксигенази-2 порівняно з целекоксибом

Примітка. Ift-387 (m9_e1), залишки: ALA185, ALA188, PHE196, LYS197, VAL277, LEU376 GLN189, THR192, THR198, TYR371, TRP373 HIS193, HIS200, HIS372, HIS374 ASN368.



*Целекоксиб
(Езв= - 11.9 ккал/моль)*



*Ift-387
(Езв= - 9.4 ккал/моль)*



Ift-387 та целекоксиб

Рис. 4. Візуалізація фрагмента позиції Ift-387 (m6_e6) в активному сайті зв'язування циклооксигенази-2 порівняно з целекоксибом

Примітка. Ift-387 (m6_e6), залишки: VAL102, VAL335, LEU338, LEU345, ALA502, ILE503, PHE504, VAL509, GLY512, ALA513, LEU517 GLN178, SER339, TYR341, SER516 HIS75, ARG106, ARG499.

впливу виявлених особливостей найвигідніших енергетично комплексів досліджених лігандів на очікувану здатність конкурентного інгібування COX-2.

Докінг-аналіз міжмолекулярних комплексів тріазациклопента[сd]азуленів з 5-LOX. За результатами докінг-аналізу визначені особливості позицій досліджених лігандів у міжмолекулярних

комплексах з 5-LOX. Найвигіднішими енергетично є комплекси (моделі 1, Езв. -9,4 ~ -10,2 ккал/моль), в яких ліганди розташовуються в окремому сайті зв'язування зі спільними для них залишками амінокислот – VAL243, ARG370, ASP442, LEU448, PHE450, TYR470, GLN549 (усього 7). Проте вони не мають залишків, які є характерними для AA та NDGA. Найінформативніший сайт для прогнозу інгібіторної активності – це активний сайт зв'язування, в якому ліганди оточені характерними залишками амінокислот, спільними з оточенням лігандів-порівняння (кількість 5: ILE406, PHE555, GLN557, LEU607, ALA672 та кількість 3: ILE406, GLN557, LEU607 відповідно з AA та NDGA). Зазначимо, що в активному сайті зв'язування досліджені ліганди оточені 11–16 залишками (за виключенням ліганду Ift-385), що співставимо з кількістю залишків в оточенні лігандів-порівняння, і певним чином є передумовою для міжмолекулярних взаємодій (кількість залишків: 14 для AA та 15 для NDGA за умови оточення ліганду залишками в радіусі ≤ 4 Å). Вільна енергія зв'язування досліджених лігандів в активному сайті зв'язування 5-LOX лежить у межах від -9,3 до -8,9 ккал/моль, що є енергетично вигіднішим станом, ніж для лігандів порівняння (AA та NDGA) в 1,23–1,17 і 1,29–1,24 рази відповідно (табл. 2). Приклад візуалізації просторової позиції досліджених лігандів у комплексі з 5-LOX порівняно з AA наведено на рисунку 5 та їхнього оточення залишками – на рисунку 6.

Ліганд Ift-399 / 7060 (m5_1), що розглядається як сполука-хіт, в активному сайті зв'язування ALOX5 (3V99) оточений 16 залишками амінокислот: PHE177, HIS367, HIS372, ILE406, ALA410, GLN413, HIS550,

ASN554, PHE555, GLN557, LEU607, PHE610, GLU614, PRO668, SER670, ALA672, серед яких 9 залишків (PHE177, HIS367, HIS372, ILE406, ASN554, PHE555, GLN557, LEU607, ALA672) є спільними з оточенням AA та 5 залишків (HIS372, ILE406, ALA410, GLN557, LEU607) – з оточенням ліганду NDGA.

За величиною середніх енергій зв'язування (для основних варіантів позицій досліджених лігандів – в активному та окремому сайтах) та співвідношенням між ними (1,09 : 1,00), за умови їхнього співставимого внеску в очікуваний результат, вірогідність позитивного прогнозу складає ~ 47,85 %. Для сполуки-хіта Ift-399 як потенційного інгібітора ALOX5 такий позитивний прогноз складає ~ 48,78 %.

Таким чином, досліджені ліганди в активному сайті зв'язування 5-LOX утворюють міжмолекулярні комплекси, що характеризуються вільною енергією зв'язування (у межах від -9,3 до -8,9 ккал/моль), дещо перевищуючи таку для лігандів-порівняння. В оточенні досліджених лігандів є залишки амінокислот, які притаманні оточенню лігандів порівняння (AA та NDGA) та зумовлюють певну вірогідність реалізації дії (протизапальної/антиексудативної, протипухлинної/антиканцерогенної) за участю ALOX5.

Структурні формули лігандів-хітів як потенційних інгібіторів COX-2 та ALOX5 наведено на рисунку 7.

Цікаво, що сполука Ift-387 (рис. 7a) водночас може бути як інгібітором COX-2, так і інгібітором 5-LOX.

Протизапальна (інгібіція карагенінового набряку) та протипухлинна активність. Досліджені тріазациклопента[cd]азулені виявили протизапальну активність (табл. 3), яка для сполук Ift-389, Ift-393 та Ift-395

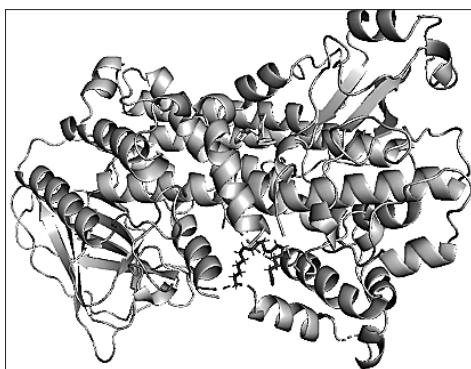
Результати порівняльного аналізу особливостей міжмолекулярної взаємодії ліпоксигенази з новими лігандами, арахідоною кислотою та нордигідрогваяретиною кислотою

R (шифр)	Арахідонат-5-ліпоксигеназа (3V99): Езв. (ккал/моль), залишки				Арахідонат-5-ліпоксигеназа (3V99), Езв. (ккал/моль), залишки	
	Езв., m	активний сайт зв'язування, залишки	Езв., відносно арахідонової кислоти	Езв., відносно рдигідрогваяретинової кислоти	Езв., m	окремий сайт зв'язування, залишки
H (If-385 / 7745)	-8,9 m5_3	PHE169, ILE406, PHE555, GLN557, LEU607, ALA672	1,17	1,24	-9,9 m1_3	VAL243, LEU246, ARG370, ALA439, ASP442, SER447, LEU448, PHE450, ARG457, TYR470, THR545, GLN549
p-Me (If-387 / 7737)	-9,2 m6_2	PHE177, HIS367, HIS372, ILE406, ALA410, GLN413, ASN554, HIS550, PHE555, GLN557, LEU607, PHE610, GLU614, PRO668, SER670, ALA672	1,21	1,28	-10,2 m1_2	VAL243, ARG246, LEU288, ILE365, ARG370, ALA439, ASP442, SER447, LEU448, PHE450, ALA453, ARG457, TYR470, PHE544, THR545, GLN549
p-Cl (If-389 / 1365)	-9,0 m7_6	PHE177, HIS367, HIS372, ALA410, GLN413, HIS550, ASN554, PHE555, GLN557, LEU607, PHE610, GLU614, VAL671, ALA672	1,18	1,25	-10,0 m1_6	VAL243, ARG246, LEU288, ILE365, ARG370, ALA439, ASP442, SER447, LEU448, PHE450, ALA453, TYR470, PHE544, THR545, GLN549, ARG457

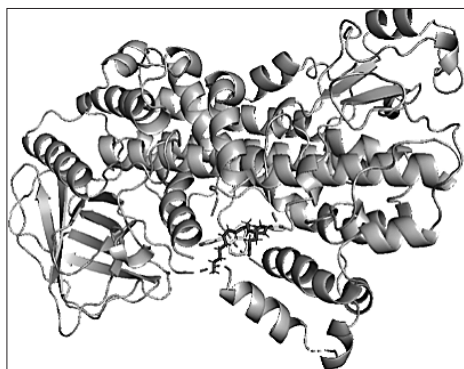
R (шифр)	Арахідонат-5-ліпоксигеназа (ЗВ99): Езв. (ккал/моль), залишки				Арахідонат-5-ліпоксигеназа (ЗВ99), Езв. (ккал/моль), залишки	
	Езв., т	активний сайт зв'язування, залишки	Езв., відносно арахідонової кислоти	Езв., відносно р-гидрогвая- ретинової кислоти	Езв., т	окремий сайт зв'язування, залишки
p-Br (If-391 / 339)	-8,9 m9_1	PHE177, ILE406, LYS409, ALA410, GLN413, ASN554, PHE555, GLN557, LEU607, SER608, PHE610, VAL671, ALA672	1, 17	1, 24	-9,8 m1_1	VAL243, ARG246, LEU288, ILE365, ARG370, ALA439, ASP442, SER447, LEU448, PHE450, ALA453, ARG457, TYR470, PHE544, THR545, GLN549
o-MeO (If- 393 / 9627)	-9,1 m6_2	PHE177, ILE406, ALA410, PHE555, LEU607, PHE610, VAL671, ALA672 GLN413, ASN554, GLN557, HIS367, HIS372, HIS550	1, 20	1, 26	-10,2 m1_2	VAL243, LEU244, LEU288, ILE365, THR366, ARG370, ALA439, ASP442, SER447, LEU448, PHE450, ALA453, PHE544, ARG457, TYR470, THR545, GLN549
2,4-(MeO) ₂ (If-395 / 9459)	-8,9 m7_1	PHE169, PHE177, ILE406, ALA410, PHE555, LEU607, GLN413, ASN554, GLN557, HIS372, LYS409	1, 17	1, 24	-9,4 m1_1	VAL243, LEU244, ASP285, GLU287, VAL361, ILE365, THR366, ARG370, ASP442, LEU448, PHE450, ALA453, PHE544, SER447, TYR470, GLN549
2,5-(MeO) ₂ (If-397 / 9460)	-9,1 m5_1	PHE177, ILE406, ALA410, PHE555, LEU607, PHE610, VAL671, ALA672 GLN413, ASN554, GLN557, HIS367, HIS372, HIS550	1, 20	1, 26	-9,6 m1_1	VAL243, LEU244, ASP285, PHE286, LEU288, VAL361, ILE365, THR366, ARG370, ASP442, SER447, LEU448, PHE450, ALA453, TYR470, PHE544, GLN549

R (шифр)	Арахідонат-5-ліпоксигеназа (3V99) : Езв. (ккал/моль), залишки				Арахідонат-5-ліпоксигеназа (3V99), Езв. (ккал/моль), залишки	
	Езв., т	активний сайт зв'язування, залишки	Езв., відносно арахідонової кислоти	Езв., відносно рдигідрогвая- ретинової кислоти	Езв., т	окреимий сайт зв'язування, залишки
2-Me,5-Cl (1ft-399 / 7060)	-9,3 m5_1	PHE177, HIS367, HIS372, ILE406, ALA410, GLN413, HIS550, ASN554, PHE555, GLN557, LEU607, PHE610, GLU614, PRO668, SER670, ALA672	1,23	1,29	-9,8 m1_1	VAL243, ARG246, LEU288, ILE365, ARG370, ALA439, ASP442, LEU448, PHE450, ALA453, PHE544, VAL553, THR366, SER447, ARG457, TYR470, GLN549
Арахідонова кислота	-7,6	PHE169, SER171, PHE177, LEU179, PHE359, GLN363, HIS367, HIS372, ILE406, ASN554, PHE555, GLN557, LEU607, ALA672	1,00	1,06	-	-
Нордигідро- гваяретинова кислота (6N2W)	-7,2	PHE359, GLN363, LEU368, HIS372, ILE406, ASN407, ALA410, GLN557, PRO569, ARG596, TRP599, HIS600, ALA603, LEU607, ILE673	0,95	1,00	-	-

Примітка. т – модель_дослід.

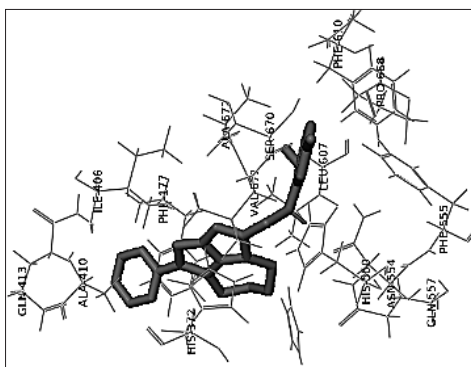


Ift-385 / 7745 (m1e3, зверху) в окремому сайті зв'язування ліпоксигенази та арахідонової кислоти (знизу) в активному сайті зв'язування ліпоксигенази



Співставлення позицій ліганду Ift-385 / 7745 (m5e3) та арахідонової кислоти в активному сайті зв'язування ліпоксигенази

Рис. 5. Візуалізація позицій лігандів в сайтах зв'язування арахідонат-5-ліпоксигенази

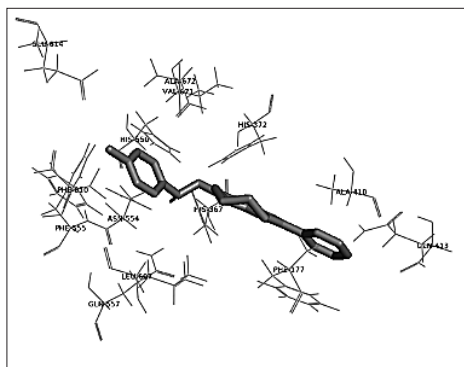


Ift-399 / 7060 (m5e1); Езв. -9,3 ккал/моль

Спільні залишки з арахідоною кислотою:

Спільні залишки з нордигідрогваретиною кислотою:

Рис. 6. Оточення лігандів залишками амінокислот в активному сайті зв'язування арахідонат-5-ліпоксигенази



Ift-387 / 7737 (m5e3); Езв. -9,2 ккал/моль

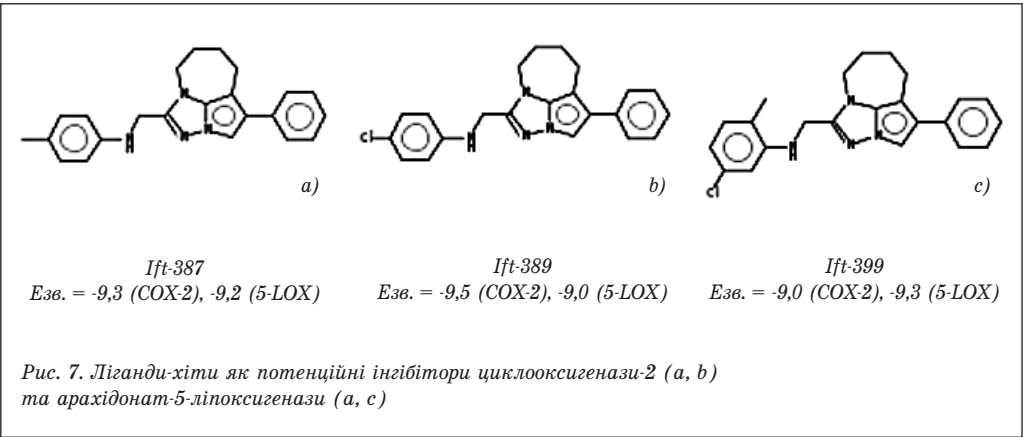
PHE177, HIS367, HIS372, ILE406, ASN554, PHE555, GLN557, LEU607, ALA672

HIS372, ILE406, ALA410, GLN557, LEU607

перевищує таку препарату порівняння (диклофенаку натрію, інгібіція набряку -36,07 %, $p < 0,01$) у (1,21-1,39) разу.

У таблиці 4 наведені результати оцінки протипухлинної активності похідних тріазациклопента[сd]азулену, які свідчать про наявність у них здатності пригнічувати ріст та сприяти загибелі ракових клітин. Найширший

спектр протипухлинної дії має потенційний інгібітор COX-2 – сполука Ift-389 (рис. 7, b), яка майже на 100 % пригнічувала ріст клітин колоректального раку (лінія COLO 205), лейкемії (лінія CCRF-CEM), меланоми (лінія LOX IMVI) та раку молочної залози (лінія MDA-MB-231/ATCC). Певну цитотоксичну дію чинить і



Таблиця 3

Протизапальна активність нових похідних тріазациклопента[cd]азулена порівняно з диклофенаком (карагеніновий набряк, миші)

Шифр	Інгібіція набряку порівняно з диклофенаком	Шифр	Інгібіція набряку порівняно з диклофенаком
IFT-385	0,30	IFT-397	0,43
IFT-387	0,64	IFT-395	1,21
IFT-389	1,39	IFT-399	0,72
IFT-393	1,25	Диклофенак натрію	1,0

Таблиця 4

Протипухлинна активність тріазациклопента[cd]азуленів у дослідax in vitro на лініях клітин раку (концентрація речовин 10⁻⁵ моль/л)

Лінія ракових клітин →	Лейкемія	Рак товстого кишківника	Меланома	Рак молочної залози
	CCRF-CEM	COLO 205	LOX IMVI	MDA-MB-231/ATCC
Шифр ↓	Пригнічення росту ракових клітин, %			
IFT-385	36,45	56,98	77,74	79,64
IFT-387	11,08	47,03	22,83	52,47
IFT-389	79,98	104,1	99,45	105,3
IFT-391/339	42,33	103,3	90,61	88,40

потенційний інгібітор *COX-2/ALOX5* – сполука Ift-387 (рис. 7, а).

Отримані дані свідчать про перспективність подальших досліджень похідних 1-феніл-4-ариламіно-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-тріазациклопента[сd]азулену як потенційних протизапальних і протипухлинних засобів з мішень-залежним (*COX-2* та *ALOX5*) механізмом дії.

Висновки

1. Досліджено особливості комплексоутворення макромолекул *COX-2* та *ALOX5* з лігандами – новими трициклічними конденсованими молекулярними структурами з азепіновим фрагментом – тріазациклопента[сd]азуленами.
2. Визначено характеристики комплексів досліджених лігандів з білками: у окремому, суміжному та активному сайтах зв'язування, а саме: енер-
3. За результатами докінг-аналізу міжмолекулярних комплексів визначено потенційні інгібітори *COX-2* та *ALOX5* (сполуки-хіти Ift-387, Ift-389 та Ift-399), які в скринінгових дослідженнях виявили протизапальну або протипухлинну дію за вірогідною участю білків *COX-2* та *ALOX5*.

1. 5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease. O. Rådmark, O. Werz, D. Steinhilber, B. Samuelsson. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2015. V. 1851 (4). P. 331–339. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.08.012>. PMID 25152163.
2. Potential anticancer lipoxygenase inhibitors from the red sea-derived brown algae *Sargassum cinereum*: an in-silico-supported in-vitro study. Sami I. Alzarea, Abeer H. Elmaidomy, Hani Saber et al. *Antibiotics (Basel)*. 2021. V. 10 (4). P. 416. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040416>.
3. 15-Lipoxygenase-1/15-hydroxyeicosatetraenoic acid promotes hepatocellular cancer cells growth through protein kinase B and heat shock protein complex activation. J. Ma, L. Zhang, J. Zhang et al. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2013. V. 45. P. 1031–1041. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.02.018>.
4. Lipoxygenase inhibitors as potential cancer chemopreventives. V. E. Steele, C. A. Holmes, E. T. Hawk et al. *Cancer Epidemiol. Prev. Biomark.* 1999. V. 8. P. 467–483.
5. Orafaie A., Matin M. M., Sadeghian H. The importance of 15-lipoxygenase inhibitors in cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev.* 2018. V. 37. P. 397–408. <https://doi.org/10.1007/s10555-018-9738-9>.
6. Haeggström J. Z., Funk C. D. Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. *Chemical reviews*. 2011. V. 111 (10). P. 5866–5898. <https://doi.org/10.1021/cr200246d/>.
7. 5-lipoxygenase: a promising drug target against inflammatory diseases – biochemical and pharmacological regulation. Y. Anwar, J. S. Sabir, M. I. Qureshi, K. S. Saini. *Current Drug Targets*. 2014. V. 15 (4). P. 410–422. <https://doi.org/10.2174/1389450114666131209110745>. PMID 24313690.
8. Das N. R., Achary P. G. R. Prediction of pEC 50(M) and molecular docking study for the selective inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase. *Ukr. Biochem. J.* 2021. V. 93, No. 6. C. 101–118. <https://doi.org/10.15407/ubj93.06.101>.
9. Янченко В. О., Вороніна-Тузовських Ю. В., Полетай В. М. Хімія природних сполук (Ізопреноїди та стероїди). Навчальний посібник. Чернівці : НУЧК імені Т. Г. Шевченка, 2023. С. 73.
10. Inhibition of 5-lipoxygenase and skin inflammation by the aerial parts of *Artemisia capillaris* and its constituents. O. S. Kwon, J. S. Choi, M. N. Islam et al. *Arch. Pharm. Res.* 2011. V. 34 (9). P. 1561–1569. <https://doi.org/10.1007/s12272-011-0919-0>.
11. Newcomer M. E. Structural and mechanistic insights into 5-lipoxygenase inhibition by natural products. N. C. Gilbert, J. Gerstmeier, E. E. Schexnaydre et al. *Nat. Chem. Biol.* 2020. V. 16. P. 783–79.
12. Proteins Data Bank (PDB) (онлайн-песчпс). URL: <https://www.rcsb.org/>.
13. The synthesis and the study of the antitumor activity of 1,4-diaryl-5,6,7,8-tetrahydro-2,2а,8а-triazacycloпента[сd]азулену derivatives. S. A. Demchenko, Yu. A. Fedchenkova, L. S. Bobkova, L. P. Artemchuk, A. M. Demchenko. *Журнал органічної та фармацевтичної хімії*. 2019. V. 17. № 1 (65). С. 3–12.

14. Патент на корисну модель № 121780 Україна. 1-Ариламінометил-4-феніл-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулені, що проявляють анагетичну активність. Демченко С. А., Серединська Н. М., Бухтіарова Т. А., Бобкова Л. С., Демченко А. М. № у 2017 07646. Заявл. 19.07.2017. Опубл. 11.12.2017. Бюл. № 23.
15. Патент на корисну модель № 117545 Україна, МПК (2017.01) C07D 487/00, A61P 35/00. 1-Феніл-4-арил-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопента[с,сd]азулені, що мають протипухлинну активність. Демченко С. А., Колесніков О. В., Демченко А. М., Бобкова Л. С. № у 2017 01123. Заявл. 07.02.2017. Опубл. 26.06.2017. Бюл. № 12.
16. Патент на корисну модель № 121779 Україна. 1-(2'-Метоксіфеніл)- 4-феніл-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулен, що має протипухлинну активність. Демченко С. А., Бобкова Л. С., Бухтіарова Т. А., Демченко А. М. № у 2017 07644. Заявл. 19.07.2017. Опубл. 11.12.2017. Бюл. № 23.
17. Trott O., Olson A. J. AutoDockVina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*. 2010. V. 31. P. 455–461.
18. Autodock Vina current version is 1.1.2. URL: <http://vina.scripps.edu/>.
19. AutodockTools 1.5.6. URL: <http://autodock.scripps.edu>.
20. LigPlot+ v.1.4 - multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. URL: <https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/>.
21. PyMol 2.3 (PyMOL by Schrödinger) (без активації ліцензії, обмежений інтерфейс). URL: <https://pymol.org/2/buy.html?#academic>.
22. Особливості супрамолекулярної взаємодії 6,7,8,9-тетрагідро-5Н-[1,2,4]тріазоло[4,3-а]азепінів з ізоформами циклооксигенази. О. Є. Ядловський, Л. С. Бобкова, О. Ю. Баглай, А. М. Демченко, Т. А. Бухтіарова. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2024. V. 18. № 1. С. 60–71. <https://doi.org/10.33250/18.01.060>.
23. Synthesis of derivatives of 5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta[cd]azulenes and their effect on platelets aggregation. S. A. Demchenko, L. S. Bobkova, O. E. Yadlovskiy, T. A. Bukhtiarova, A. M. Demchenko. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2019. № 1 (13). С. 28–34.
24. Синтез та протипухлинні властивості похідних [4-(4'-хлорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопента[с,сd]азулен-1-ілметил]-пара-толіламіну. С. А. Демченко, В. В. Суховєєв, О. В. Москаленко, Ю. А. Федченкова, Г. П. Потєбня, А. М. Демченко. *Фармацевтичний журнал*. 2020. Т. 4 (75). С. 69–77.
25. Синтез та протипухлинні властивості похідних 1-(2-ізо-пропіл-5-метилфеноксиметил)-3R-4-арил-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопен-та[сd]азулену. С. А. Демченко, А. Є. Дудник, Т. А. Бухтіарова, А. М. Демченко, Л. С. Бобкова. *Фармацевтичний журнал*. 2018. № 1–2. С. 51–59.
26. Патент на винахід №115750 Україна. 1-Феніл-4-арил-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопента[с,сd]азулені, що мають протипухлинну активність. Демченко С. А., Колесніков О. В., Демченко А. М., Бобкова Л. С. № а 2017 01124. Заявл. 07.02.2017. Опубл. 11.12.2017. Бюл. № 23.
27. Патент на корисну модель № 123896 Україна. 1-(4'-Бромфеніл)-4-арил-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулені, що проявляють протипухлинну активність. Демченко С. А., Артемчук Л. П., Демченко А. М., Бобкова Л. С. № у 2017 09889. Заявл. 12.10.2017. Опубл. 12.03.2018. Бюл. № 5.
28. Патент на винахід № 119468 Україна, МПК (2006) C07D255/04, A61P 35/00, A61K 31/33, A61K 31/423, C07D249/16. Застосування 1-(2-ізопропіл-5-метилфеноксиметил)-3R-4-арил-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азуленів як сполук, що мають протипухлинну активність. Демченко С. А., Дудник А. Є., Бухтіарова Т. А., Демченко А. М., Бобкова Л. С. № а 2017 02037. Заявл. 02.03.2017. Опубл. 25.06.2019. Бюл. № 12.
29. Патент на винахід № 123601 Україна, МПК (2006) C07D 487/16, A61P 35/00, A61K 31/55. Застосування [4-(4'-хлорфеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулен-1-ілметил]-пара-толіламіну як діючої речовини, що виявляє селективну протипухлинну активність щодо ракових клітинних ліній лейкемії CCRF-CEM. Демченко С. А., Суховєєв В. В., Швидко О. В., Демченко А. М. № а 2019 01413. Заявл. 12.02.2019. Опубл. 28.04.2021. Бюл. № 17/2021.

Т. А. Бухтіарова, Л. С. Бобкова, С. А. Демченко, О.Ю. Баглай, О. В. Середенко, О. Є. Ядловський, А. М. Демченко

Особливості супрамолекулярної взаємодії 5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-тріазациклопента[сd]азуленів із циклооксигеназою-2 та арахідонат-5-ліпоксигеназою в контексті протизапальної та протипухлинної дії

Мета дослідження – провести докінг-аналіз супрамолекулярних взаємодій похідних тріазациклопента[сd]азулену з циклооксигеназою-2 (COX-2) та арахідонат-5-ліпоксигеназою (ALOX5) для визначення їхніх перспектив як потенційних кандидатів у лікарські засоби з мішень-залежним механізмом дії.

Особливості комплексоутворення макромолекул COX-2 та ALOX5 з лігандами – тріазациклопента[cd]азуленами досліджували та порівнювали з характеристиками комплексів лігандів-порівняння (целекоксибу, арахідонової кислоти, нордигідрогваяретинової кислоти) в активному сайті зв'язування.

Визначено вільну енергію зв'язування та оточення досліджених лігандів залишками амінокислот у сайтах зв'язування білків (COX-2 та 5-LOX відповідно), а саме: активному, суміжному з активним та окремому (віддаленому від активного).

Показано, що досліджені ліганди в активному сайті зв'язування розташовані в оточенні залишків амінокислот, що є характерними для відповідних лігандів-порівняння в COX-2 та ALOX5, а комплекси досліджених лігандів і лігандів-порівняння за вільною енергією зв'язування є зіставними.

За результатами *in vivo* досліджень (карагеніновий набряк) тріазациклопента[cd]-азулені виявили протизапальну дію, яка є зіставною або перевищує дію препарату-порівняння (диклофенаку натрію).

У дослідях *in vitro* азулені в концентрації 10^{-5} моль/л виявили високий рівень протипухлинної дії, про що свідчить пригнічення росту ракових клітин різних ліній.

Таким чином, сукупність результатів докінг-аналізу, *in vitro* та *in vivo* досліджень визначає перспективи похідних тріазациклопента[cd]азулену як потенційних інгібіторів COX-2 та ALOX5 і кандидатів у лікарські засоби з протизапальною та протипухлинною дією.

Ключові слова: азулені, докінг-аналіз, циклооксигеназа-2, арахідонат-5-ліпоксигеназа, супрамолекулярна взаємодія, протизапальна та протипухлинна дія

**T. A. Bukhtiarova, L. S. Bobkova, S. A. Demchenko, O. Yu. Baglay,
O. B. Seredenko, O. E. Yadlovskiy, A. M. Demchenko**

Peculiarities of the supramolecular interaction of 5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a-triazacyclopenta[cd]azulene derivatives with cyclooxygenase-2 and arachidonat-5-lipoxygenase in the context of anti-inflammatory and antitumor effects

The purpose of the study was to research the features of supramolecular interactions of triazacyclopenta[cd]azulene derivatives with COX-2 and ALOX5 by docking analysis and to determine the prospects of these compound as potential drugs with a target-dependent mechanism of action.

The peculiarities of complexation of macromolecules with ligands were studied and the results were compared with the characteristics of comparison ligand complexes. There were determined the free binding energy and repulsion of the ligands with amino acid residues in protein binding sites: active, adjacent and separate.

It was found that the active binding sites of the studied compounds are surrounded by amino acid residues characteristic of the corresponding reference ligands. So, the complexes of the studied and comparison ligands were comparable.

According to the results of *in vivo* studies (carrageenan edema), triazacyclopenta[cd]azulenes showed an anti-inflammatory effect that is comparable to or exceeds the effect of the comparison drug (diclofenac natrium).

Azulenes at a concentration of 10^{-5} M showed a high level of antitumor activity *in vitro*, in particular, by inhibiting growth of cancer cells of different lines.

Thus, the results of docking analysis, *in vitro* and *in vivo* studies determined the prospects of triazacyclopenta[cd]azulene derivatives as potential inhibitors of COX-2 and ALOX5, candidates for drugs with anti-inflammatory and antitumor effects.

Key words: azulenes, docking analysis, cyclooxygenase-2, arachidonat-5-lipoxygenase, supramolecular interaction, anti-inflammatory and antitumor effects

Дослідження виконано за напрямом «Фармако-математичний аналіз результатів скринінгу анагетичної та протизапальної дії похідних моно-, ди- та трициклічних нітрогеновмісних гетероциклів для спрямованого пошуку нових БАП», номер державної реєстрації 0117U006445 (ІФТ НАМН України).

Надійшла: 15 липня 2024 р.

Прийнята до друку: 19 лютого 2025 р.

Контактна особа: Бобкова Людмила Станіславівна, доктор фармацевтичних наук, головний науковий співробітник, відділ медичної хімії, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Антона Цедіка, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 44 456 94 18.