

## НАПРАВЛЕННЫЙ ПОИСК НОВЫХ АНТИОКСИДАНТНЫХ СОЕДИНЕНИЙ МЕТОДАМИ *IN SILICO* И *IN VITRO*

**В.А. Косолапов<sup>1</sup>, Д.В. Сороцкий<sup>1</sup>, П.М. Васильев<sup>1</sup>, О.Н. Жуковская<sup>2</sup>, В.А. Анисимова<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации;

<sup>2</sup>НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, Ростов-на-Дону

Был проведен прогноз антиоксидантной активности 1231 нового соединения. Для дальнейшего скрининга *in vitro* были отобраны 29 ранее не изученных соединений с индексом сходства «2» и «3» и 30 соединений с индексом сходства <1. В результате, были выявлены 3 соединения с высокой АОА.

*Ключевые слова:* антиоксиданты, перекисное окисление липидов, свободные радикалы, *in silico*, компьютерный прогноз.

DOI 10.19163/1994-9480-2018-3(67)-24-27

## THE DIRECTED SEARCH OF THE NOVEL ANTIOXIDANT COMPOUNDS *IN SILICO* AND *IN VITRO*

**V.A. Kosolapov<sup>1</sup>, D.V. Sorotskij<sup>1</sup>, P.M. Vasil'ev<sup>1</sup>, O.N. Zhukovskaya<sup>2</sup>, V.A. Anisimova<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>FSBEI HE «Volgograd State Medical University» of Public Health Ministry of the Russian Federation;

<sup>2</sup>South federal university, Research institute for physical and organic chemistry, Rostov-on-Don

The *in silico* prognosis of antioxidant properties has been made for 1231 novel compounds. For the further experimental screening 29 novel compounds with similarity index «2» & «3» and 30 compound with similarity index <1 have been chosen. As a result, three substances with high antioxidant activity have been found.

*Key words:* antioxidants, lipid peroxidation, free radicals, *in silico*, computer prognosis

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) одно из звеньев патогенеза более чем 200 заболеваний и патологических состояний. Оксидативный стресс имеет большое значение в развитии сердечно-сосудистых патологий, хронических заболеваний печени, нейродегенеративных, инфекционных и ряда других свободно-радикальных патологий [7]. Особо чувствительны к окислительному стрессу ткани головного мозга в силу высокого потребления кислорода и особенностей состава вещества мозга – наиболее высокое содержание фосфолипидов, полиненасыщенных жирных кислот, ионов двухвалентного железа и низкое содержание антиоксидантных витаминов, низкая плотность глутатионпероксидазы и почти полное отсутствие каталазы [4]. Избыточная продукция свободных радикалов кислорода и азота играет ключевую роль при ишемических и поражениях с образованием гидроксильных радикалов, которые преимущественно и вызывают окисление липидов, белков и ДНК с дальнейшим повреждением тканей мозга [4, 8]. Все это делает актуальным поиск новых антиоксидантных соединений с высокой активностью.

Использование методов *in silico* для поиска новых лекарственных веществ позволяет экономить время на поиск новых активных соединений, и существенно снизить затраты на разработку эффективных лекарственных средств [12]. Особо интенсивно развиваются консенсусные подходы к прогнозу [9], основанные на обобщении результатов, полученных с помощью не-

скольких QSAR-зависимостей. Методы компьютерного прогноза широко применяются и при поиске новых антиоксидантных соединений [10].

### ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оптимизация поиска новых антиоксидантных соединений с использованием методов *in silico* и изучением перспективных соединений *in vitro*.

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

В ходе работы была создана оригинальная верифицированная база данных по химической структуре и уровню активности антиоксидантных веществ ингибиторов свободно-радикальных процессов среди производных конденсированных азолов, изученных в лаборатории фармакологии антиоксидантных средств НИИ фармакологии ВолгГМУ до 2014 г. [1, 2, 5]. Формирование базы данных было выполнено с помощью СУБД ИТ «Микрокосм» [3]. Для прогноза *in silico* антиоксидантной активности были выбраны 1231 соединение из ряда конденсированных азолов из банка субстанций кафедры фармакологии ВолгГМУ, синтезированных в НИИ физической и органической химии ЮФУ, г. Ростов-на-Дону, ранее не изучавшихся на антиоксидантную активность. Прогноз антиоксидантной активности у новых соединений *in silico* был выполнен с помощью модуля TestSim программного комплекса ИТ «Микрокосм» [3] методом сходства к 11 активным референсным антиоксидантным соединениям из созданного банка хи-

мических структур с изученной антиоксидантной активностью.

Для каждого нового соединения рассчитывалось среднее значение модифицированного коэффициента 2D-структурного сходства Танимото (общий коэффициент сходства (ОКС)) [11] к 11 референсным соединениям (эталонам), отобранным из верифицированной базы данных по химической структуре и уровню активности антиоксидантных веществ ингибиторов свободно-радикальных процессов.

О возможном наличии антиоксидантной активности у новых соединений судили по степени сходства к референсным соединениям. При прогнозе рассчитывались средние значения общего коэффициента сходства по 11 типам QL-дескрипторов и разделялись на 3 основные группы:

Max.Σ = 0,4100 (максимальное среднее);

Med.Σ = 0,3632 (общее среднее);

Min.Σ = 0,3248 (минимальное среднее).

Далее, соединениям условно присваивался индекс принадлежности в зависимости от значений ОКС, если значение ОКС > Max.Σ, то присваивался индекс 3; если Max.Σ > ОКС > Med.Σ присваивался индекс 2; если Med.Σ > ОКС > Min.Σ присваивался индекс 1; если ОКС < Min.Σ то присваивался индекс 0. Чем выше индекс принадлежности, тем соединение имеет большее сходство к эталонным соединениям.

Антиоксидантную активность *in vitro* новых веществ изучали на модели аскорбат-зависимого перекисного окисления липидов (ПОЛ) [6]. В качестве субстрата использовали 4%-й гомогенат печени крыс. Гомогенат получали в гомогенизаторе Поттера стеклянном с электрическим приводом МШ-2 (Россия) в 0,1 моль/л трис-НСI-буфере рН 7,4. Реакцию инициировали 50 мМ аскорбиновой кислоты (Сметарол, Чехия), и пробы инкубировались в течение 15 мин в бане серологической СБ-СЛ-01М (Россия) при t 37 °С. Реакцию останавливали 50%-м раствором трихлоруксусной кислоты (Россия), и пробы центрифугировали 15 мин при 3000 об./мин на центрифуге Elmi CM-6MT (Латвия). К надосадочной жидкости добавляли 0,8%-й раствор 2-тиобарбитуровой кислоты (Диа-М, Россия), и пробы кипятились 10 мин на водяной бане. Скорость ПОЛ определяли по накоплению малонового диальдегида в реакции с тиобарбитуровой кислотой. Оптическую плотность окрашенного продукта измеряли при длине волны 532 нм на спектрофотометре PD-303 UV (APEL, Япония) в кювете с длиной оптического пути 10 мм. Активность веществ рассчитывали по формуле  $x = 100 \cdot (E_{\text{оп}} / E_{\text{контр}} \cdot 100)$ . Вещества изучались в концентрации  $1 \times 10^{-6}$  моль/л. Вещества, проявившие высокий уровень активности, изучались в широком диапазоне молярных концентраций, и для них рассчитывали величину ИК<sub>50</sub> (концентрация, ингибирующая реакцию на 50 %) методом линейного уравнения регрессии.

В качестве препаратов сравнения использовали субстанции водорастворимого антиоксиданта тролокса

(6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота, CAS 53188-07-1) (Fluka, Швейцария), и церебропротектора с антиоксидантными свойствами мексидола (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат) (ООО «НПК «ФАРМАСОФТ», Россия).

Обработка результатов выполнялась в программе Microsoft Excel (Microsoft, США) с расчетом базовых статистических показателей: среднего арифметического M, стандартной ошибки среднего арифметического m. ИК<sub>50</sub> (концентрация, ингибирующая реакцию на 50 %) рассчитывался в программе Microsoft Excel (Microsoft, США) методом уравнения линейной регрессии и парного коэффициента корреляции (R<sup>2</sup>) по трем парам значений (LgC; D%). Статистическая обработка проводилась с применением парного t-критерия Стьюдента в программе Statistica 10.0 (StatSoft, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью СУБД ИТ «Микрокосм» [3] была сформирована и верифицирована база данных оригинальных веществ производных конденсированных азолов, и был проведен прогноз по сходству к эталонам. По результатам прогноза антиоксидантной активности 1231 соединений была сформирована выборка из 240 соединений с высоким коэффициентом сходства с эталонными антиоксидантными веществами. Среди них было выявлено 97 соединений с индексом ОКС «3» и 142 соединения с индексом ОКС «2». Из них для экспериментального изучения были выбраны 29 соединений (табл. 1).

Таблица 1

### Антиоксидантная активность соединений в концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л, %инг. (M ± m)

№	Шифр	Активность, % инг.
1.	RU-210	42,03 ± 4,89**
2.	RU-179	32,87 ± 3,54**
3.	RU-31	28,41 ± 3,67**
4.	RU-704	24,58 ± 2,46**
5.	RU-64	22,89 ± 3,21**
6.	RU-636	21,36 ± 1,49**
7.	RDMA-5	19,15 ± 3,67**
8.	RDMA-1	13,22 ± 2,65*
9.	RU-708	9,87 ± 3,56
10.	RU-630	9,00 ± 4,87
11.	RU-870x	8,98 ± 2,48
12.	RU-709	7,62 ± 3,65
13.	RU-696	7,38 ± 2,35
14.	RU-694	6,78 ± 1,89
15.	RU-700	4,32 ± 1,39
16.	RU-631	4,05 ± 2,62
17.	RU-30	4,01 ± 1,57
18.	RU-638	3,80 ± 2,45
19.	RU-692	3,57 ± 0,98
20.	RU-629	3,43 ± 1,24
21.	RU-707	2,69 ± 1,32

Окончание таблицы 1

№	Шифр	Активность, % инг.
22.	RU-693	2,52 ± 0,98
23.	RU-639	2,24 ± 01,45
24.	RU-691	0,30 ± 0,12
25.	RU-701	0
26.	RU-1202	0
27.	RU-711	0
28.	RU-1192	0
29.	RU-1195	0
30.	Тролокс	0
31.	Мексидол	7,5 ± 2,34

\*Данные статистически значимы по отношению к контролю ( $p < 0,05$ ); \*данные статистически значимы по отношению к мексидолу ( $p < 0,05$ ).

Было установлено, что наибольшую активность в концентрации 1 мкмоль/л проявило соединение РУ-210, которое лишь незначительно уступало по активности эталонному веществу тролокс и статистически значимо превосходило по активности мексидол. Соединения РУ-179, РУ-31, РУ-704, РУ-64, РУ-636 и РДМА-5 также были более активны, чем мексидол, но уступали тролоксу.

При изучении наиболее активных соединений в широком диапазоне концентраций было установлено, что по уровню ИК<sub>50</sub> (табл. 2) наибольшей активностью обладали вещества под шифрами РУ-210 и РУ-636.

Таблица 2

### ИК<sub>50</sub> антиоксидантных соединений, моль/л

Шифр	ИК <sub>50</sub> , моль/л (R <sup>2</sup> )
РУ-210	2,54 × 10 <sup>-6</sup> (0,93)
RU-636	2,58 × 10 <sup>-6</sup> (0,91)
RU-704	3,92 × 10 <sup>-6</sup> (0,99)
RDMA-1	4,55 × 10 <sup>-6</sup> (0,99)
RDMA-5	4,45 × 10 <sup>-6</sup> (0,98)
Тролокс	2,19 × 10 <sup>-5</sup> (0,86)
Мексидол	4,80 × 10 <sup>-4</sup> (0,85)

С целью проверки эффективности прогноза были рассчитаны ошибки первого и второго рода. По результатам скрининга было выявлено, что из 29 веществ с индексом ОКС «2» и «3» у 24 соединений (82,8 %) имелась антиоксидантная активность. Таким образом, ошибка первого рода составила 17,2 %. Для расчета ошибки второго рода были рандомизированно отобраны и исследованы 30 соединений разных химических рядов с индексом ОКС < 1 в концентрации 1\*10<sup>-6</sup> моль/л. Было установлено, что из 30 веществ у 8 соединений проявлялась антиоксидантная активность в интервале от 17 до 68 %. Таким образом, ошибка второго рода составила 26,6 %. Среди 8 соединений выделено соединение РУС-197, активность которого в данной концентрации составила 68,7 %, и ИК<sub>50</sub> был 8,58 × 10<sup>-7</sup> моль/л (R<sup>2</sup> 0,9), что позволяет также отнести его к высоко активным.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенный *in silico* прогноз наличия антиоксидантной активности у 1231 нового производного азолов позволил выявить 240 потенциально активных антиоксидантных веществ. Экспериментальное изучение *in vitro* АО активности 29 новых веществ с высоким уровнем сходства к эталонным АО соединениям, выбранным по результатам прогноза, и 30 веществ с низким индексом ОКС, позволило выделить 3 вещества с высокой антиоксидантной активностью, перспективных для дальнейшего углубленного изучения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Анисимова В.А., Спасов А.А., Островский О.В. и др. Синтез и фармакологическая активность 3-(ароил) и 3-(гетароил)имидазо[1,2-а]бензимидазолов // Хим.-фарм. журнал. – 2002. – Т. 36, № 12. – С. 3–8.
2. Анисимова В.А., Толпыгин И.Е., Спасов А.А. и др. Синтез и биологическая активность п-ацилметил-замещенных 9Н-2,3-дигидроимидазо 10Н-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазолов и продуктов их восстановления // Хим.-фарм. журнал. – 2006. – Т. 40, № 5. – С. 27–33.
3. Васильев П.М., Кочетков А.Н. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2011618547. ИТ «Микрокосм». – № 201616643; заявл. 02.09.2011; зарег. 31.10.2011.
4. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Нейропротективная терапия ишемического инсульта // Журн. неврологии и психиатрии. Инсульт: прилож. к журн. – 2002. – № 5. – С. 3–16.
5. Косолапов В.А., Спасов А.А., Анисимова В.А. Изучение антирадикальной активности новых соединений методами хемилюминесценций // Биомедицинская химия. – 2005. – Т. 51, № 3. – С. 287–294.
6. Ланкин В.З., Гуревич С.М., Булакова Е.Б. Изучение аскорбат-зависимого перекисного окисления липидов тканей при помощи теста с 2-тиобарбитуровой кислотой // Труды московского общества испытателей природы. – 1975. – Т. 52. – С. 73–78.
7. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. и др. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. – Новосибирск: АРТА, 2008. – 284 с.
8. Giasson B.I., Ischiropoulos H., Lee V.M. et al. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases // Free Radic. Biol. Med. – 2002. – Vol. 32. – P. 1264–1275.
9. Izenman A.J. Modern Multivariate Statistical Techniques Regression, Classification, and Manifold Learning // Springer Texts in Statistics, 2008.
10. Mitra I., Sahay A., Roy K. Chemometric QSAR modeling and in silico design of antioxidant no donor phenols // Sci. Pharm. – 2011. – Vol. 79. – P. 31–57 [Electronic resource]. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3097501/>.
11. Molecular Similarity in Drug Design / Ed. P.M. Dean. – Dordrecht: Springer-Science + Business Media B.V., 2012. – 342 p.
12. Verma J., Khedkar V.M., Coutinho E.C. 3D-QSAR in drug design – a review // Current Topics in Medicinal Chemistry. – 2010. – Vol. 10. – P. 95–115.

## REFERENCES

1. Anisimova V.A., Spasov A.A., Ostrovskij O.V. i dr. Sintez i farmako-logicheskaya aktivnost' 3-(aroyl) i 3-(getaroyl)imidazo[1,2-a]benzimidazolov [Synthesis and pharmacological activity of 3- (aroyl) and 3- (hetaroyl) imidazo [1,2-a] benzimidazoles]. *Him.-farm. zhurnal*. [Chemical-farm. journal], 2002, Vol. 36, no. 12., pp. 3–8. (In Russ.; abstr. in Engl.).
2. Anisimova V.A., Tolpygin I.E., Spasov A.A. i dr. Sintez i biologicheskaya aktivnost' n-acilmetil-zameshchennyh 9N-2,3-digidroimidazoi 10N-2,3,4,10-tetra-gidropirimido[1,2-a]benzimidazolov i produktov ih vossta-novleniya [Synthesis and biological activity of 10-N-2,3,4,10-tetrahydropyrimido [1,2-a] benzimidazoles and their reduction products]. *Him.-farm. zhurnal*. [Chemical-farm. journal], 2006, Vol. 40, no. 5, pp. 27–33. (In Russ.; abstr. in Engl.).
3. Vasil'ev P.M., Kochetkov A.N. Svidetel'stvo o gosudarstvennoj regi-stracii programmy dlya EHVM № 2011618547 [Certificate of state registration of the computer program no. 2011618547]. IT «Mikrokosm». № 201616643; zayavl. 02.09.2011; zareg. 31.10.2011.
4. Gusev E.I., Skvorcova V.I. Nejroprotektivnaya terapiya ishemičeskogo insul'ta [Neuroprotective therapy of ischemic stroke]. *ZHurn. nevrologii i psixiatrii. Insul't: prilozh. k zhurn.* [Jour. neurology and psychiatry. Stroke: Appl. to the journal], 2002, no. 5, pp. 3–16. (In Russ.; abstr. in Engl.).
5. Kosolapov V.A., Spasov A.A., Anisimova V.A. Izuchenie antiradikal'noj aktivnosti novyh soedinenij metodami hemilyuminescencij [The study of the anti-radical activity of new compounds by chemiluminescence]. *Biomedicinskaya himiya* [Biomedical Chemistry], 2005, Vol. 51, no. 3, pp. 287–294. (In Russ.; abstr. in Engl.).
6. Lankin V.Z., Gurevich S.M., Burlakova E.B. Izuchenie askorbat-zavisimogo perekisnogo okisleniya lipidov tkanej pri pomoshchi testa s 2-tiobarbiturovoj kislotoj [The study of ascorbate-dependent peroxidation of tissue lipids by a test with 2-thiobarbituric acid]. *Trudy moskovskogo obshchestva ispytatelej pri-rody* [Proceedings of the Moscow Society of Naturalists], 1975, Vol. 52, pp. 73–78. (In Russ.; abstr. in Engl.).
7. Men'shikova E.B., Zenkov N.K., Lankin V.Z. i dr. Okislitel'nyj stress: Patologicheskie sostoyaniya i zabolevaniya [Oxidative stress: Pathological conditions and diseases]. Novosibirsk: ARTA, 2008. 284 p.
8. Giasson B.I., Ischiropoulos H., Lee V.M. et al. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, Vol. 32, pp. 1264–1275.
9. Izenman A.J. Modern Multivariate Statistical Techniques Regression, Classification, and Manifold Learning. Springer Texts in Statistics, 2008.
10. Mitra I., Sahay A., Roy K. Chemometric QSAR modeling and in silico design of antioxidant no donor phenols. *Sci. Pharm.*, 2011, Vol. 79, pp. 31–57 [Electronic resource]. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3097501/>.
11. Molecular Similarity in Drug Design. Ed. P.M. Dean. Dordrecht: Springer-Science + Business Media B.V., 2012. 342p.
12. Verma J., Khedkar V.M., Coutinho E.C. 3D-QSAR in drug design, a review. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2010, Vol. 10, pp. 95–115.

## Контактная информация

**Косолапов Вадим Анатольевич** – д. м. н., профессор кафедры фармакологии и биоинформатики, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: vad-ak@mail.ru