

АНАЛІЗ *in silico* ПОЛІФАРМАКОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ НОВИХ АНКСІОЛІТИЧНИХ КАНДИДАТІВ НА ОСНОВІ 2,3-БЕНЗОДІАЗЕПІНУ ТА β -КАРБОЛІНУ

Зяблицев С.В. <https://orcid.org/0000-0002-5309-372>

Євстіфеев Д.І. <https://orcid.org/0009-0002-4166-6397>

Ліходієвський В.В. <https://orcid.org/0000-0002-7596-1207>

Александренко Н.А. <https://orcid.org/0009-0006-0766-7141>

Федько К.О. <https://orcid.org/0009-0008-2056-9399>

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ, Україна

zsv1965@gmail.com

Актуальність. Пошук анксиолітиків з покращеним профілем безпеки є ключовим завданням сучасної нейропсихофармакології. Перспективними кандидатами є похідні 2,3-бензодіазепіну (MPTD-01, BS34-20) та β -карболіну (Карбацетам), які в доклінічних дослідженнях продемонстрували анксиолітичну активність за відсутності побічних ефектів, властивих класичним 1,4-бензодіазепінам.

Ціль: визначити та порівняти поліфармакологічні профілі структурно відмінних анксиолітичних кандидатів MPTD-01, BS34-20 та Карбацетаму для з'ясування молекулярних механізмів їхньої дії за допомогою методів *in silico*.

Матеріали та методи. За допомогою методу молекулярного докінгу (AutoDock Vina, UCSF ChimeraX) було проаналізовано взаємодію сполук з панеллю ключових мішеней центральної нервової системи, що включала ГАМК-ергічні (ГАМК^A, ГАМК^B, TSPO), глутаматергічні (AMPA), нейропептидні рецептори та іонні канали (Nav1.2). Проводили також ADMET-профілювання для оцінки фармакокінетичних властивостей сполук.

Результати. Карбацетам продемонстрував потужний мультитаргетний профіль з високою прогнозованою афінністю до ГАМК^A (-10,513 ккал/моль), іонного каналу Nav1.2 (-9,420 ккал/моль) та транслокаторного протеїну TSPO (-9,053 ккал/моль), а також значну взаємодію з ГАМК^B- та AMPA-рецепторами. Натомість похідні 2,3-бензодіазепіну (BS34-20 та MPTD-01) виявили більш сфокусовану дію, що полягала у збалансованій модуляції ГАМК^A- (енергія зв'язування до -8,379 ккал/моль для BS34-20) та AMPA-рецепторів. Для всіх сполук спрогнозовано сприятливий профіль безпеки та здатність долати гематоенцефалічний бар'єр.

Висновки. Отримані дані свідчать, що сприятливий терапевтичний профіль досліджених сполук зумовлений не селективністю до однієї мішені, а збалансованою взаємодією з кількома сигнальними шляхами. Розуміння цих поліфармакологічних профілів створювало підґрунтя для подальшої експериментальної валідації та раціонального дизайну безпечніших нейротерапевтичних засобів.

Ключові слова (MeSH): анксиолітики; 2,3-бензодіазепіни; β -карболіни; молекулярний докінг; *in silico* фармакологія; поліфармакологія; рецептори ГАМК-A; рецептори ГАМК-B; рецептори AMPA; орексини; іонний канал Nav1.2.

Актуальність. Тривожні розлади є одними з найпоширеніших психічних розладів у світі, створюючи значний тягар для систем охорони здоров'я, економіки та якості життя мільйонів людей [1]. Згідно з даними GBD 2021, тривожні розлади посідають шосте місце серед причин років, прожитих з інвалідністю (YLDs), що становить 42,5 мільйона YLDs у всьому світі [2]. Фармакотерапія цих станів тривалий час залишається полем компромісних рішень між терапевтичною ефективністю та ризиком небажаних реакцій. Класичні 1,4-бензодіазепіни (1,4-BZD), зокрема діазепам, десятиліттями становили основу анксиолітичної терапії завдяки потужній та швидкій дії, що опосередковується позитивною алостеричною модуляцією ГАМК^A-рецепторів [3]. Водночас клінічна цінність цієї групи препаратів суттєво обмежується низкою дозозалежних побічних ефектів, серед яких седатія, когнітивні порушення, амнезія, а також високий потенціал розвитку толерантності, залежності та зловживання [4]. Це зумовлює нагальну потребу в розробці нових лікарських засобів, які б дозволили розмежувати бажаний анксиолітичний ефект та значний спектр побічних явищ задля безпечнішого довгострокового лікування розладів ЦНС.

Сучасна стратегія пошуку нейротерапевтичних засобів наступного покоління дедалі більше відходить від парадигми «одна мішень — один ліганд» на користь концепції поліфармакології. Цей підхід передбачає здатність сполуки взаємодіяти з кількома біологічними мішенями та може зумовлювати вищу ефективність та сприятливіший профіль безпеки [5]. Такий принцип є особливо актуальним для складних розладів ЦНС [6], патогенез яких ґрунтується на дисрегуляції розгалужених сигнальних каскадів. У цьому контексті ключову роль відіграють так звані «привілейовані» молекулярні структури (*privileged scaffolds*), здатні взаємодіяти з кількома типами рецепторів.

До таких структур належать 2,3-бензодіазепіни (2,3-BZD), що за своєю будовою відрізняються від

класичних 1,4-BZD. Історично 2,3-BZD, прототипним представником яких є GYKI 52466, створювалися як неконкурентні антагоністи АМРА-рецепторів, що наділяє їх нейропротекторними та протисудомними властивостями, відмінними від прямої модуляції ГАМК-ергічної системи [7]. Проте новітні дані свідчать про їхню складнішу фармакологію і дозволяють припустити, що анксиолітична дія може бути наслідком взаємодії з ширшим колом мішеней у ЦНС.

Іншим перспективним класом сполук є похідні β -карболіну. Ця універсальна гетероциклічна основа стала підґрунтям для створення лігандів до багатьох мішеней ЦНС, включно з бензодіазепіновим сайтом ГАМК^A-рецептора. Важливо, що окремі похідні β -карболінів продемонстрували потужну ноотропну та нейропротекторну активність. Це робить їх надзвичайно привабливою основою для розробки засобів, здатних не лише усувати тривогу, але й корегувати супутній когнітивний дефіцит, ключовий недолік класичних анксиолітиків [8].

Дане дослідження присвячене порівняльному аналізу трьох нових сполук, синтезованих у відділі хімії гетероциклічних сполук Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л.М. Литвиненка НАН України (керівник — д.хім.н. Богза С.Л.). Досліджувані сполуки належать до різних хімічних класів: МРТD-01 (4-(4'-метоксифеніл)-2,3,4,5-тетрагідро-1H-2,3-бензодіазепін-1-он) та BS34-20 (6-(4-метоксифеніл)-7H-[1,2,4]тріазоло [3,4-a].[2,3]бензодіазепін) є похідними 2,3-BZD, тоді як Карбацетам (2,2,6-триметил-4,7-дигідро-3H-індоло [2,3-c].хінолін-1-он) є похідним β -карболіну.

Результати доклінічних досліджень свідчать, що всі три сполуки виявляють анксиолітичну активність, не спричиняючи при цьому виражених седативних, міорелаксантних та амнестичних ефектів, що є характерними для класичних бензодіазепінів [9, 10]. Окрім того, Карбацетам продемонстрував ноотропні властивості, що суттєво вирізняє його спектр активності на тлі типових анксиолітиків.

Це ставить ключове наукове питання –

яким чином настільки структурно відмінні молекули реалізують подібний сприятливий терапевтичний профіль. Ми висунули гіпотезу, що їхня ефективність та безпека зумовлені не селективним зв'язуванням з єдиною мішенню, а унікальним поліфармакологічним профілем, збалансованою взаємодією з мережею білків-мішеней у ЦНС. Така дія дозволяє відновити нейрональний баланс і досягти терапевтичного ефекту, водночас мінімізуючи побічні реакції.

Ціль: визначити та порівняти поліфармакологічні профілі структурно відмінних анксиолітичних кандидатів MPTD-01, BS34-20 та Карбацетаму для з'ясування молекулярних механізмів їхньої дії за допомогою методів *in silico*.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Підготовка структур лігандів та білків-мішеней

Тривимірні моделі досліджуваних сполук (MPTD-01, BS34-20, Карбацетам) та референтних лігандів (діазепам, алпразолам, баклофен, перампанель та інші) були згенеровані з їхніх канонічних рядків SMILES. Наступним етапом проводили енергетичну мінімізацію структур за допомогою силового поля MMFF94. Для сполук, здатних до іонізації, розраховували найбільш імовірний стан протонування за фізіологічного значення рН 7,4, що дозволило використовувати в подальших розрахунках їхні біологічно релевантні форми.

Експериментальні просторові структури білків-мішеней високої роздільної здатності були отримані з банку даних білків (Protein Data Bank, PDB) [11]. Було використано такі структури: ГАМК^A-рецептор (PDB ID: 6HUO, 6HUP), ГАМК^B-рецептор (4MS4), АМРА-рецептор (5L1F), NMDA-рецептор (7EU7), потенціал-залежний натрієвий канал Nav1.2 (6J8E) та орексиновий рецептор 1-го типу (6TOT). Для транслокаторного протеїну (TSPO), історично відомого під назвою "периферичний бензодіазепіновий рецептор", не було доступної експериментальної структури, що відповідала б задачам

дослідження, тож було побудовано модель методом гомологічного моделювання.

Підготовку всіх структур до молекулярного докінгу проводили в програмному середовищі UCSF ChimeraX [12]. Процедура включала видалення кристалізаційних молекул води, іонів та кокрystalізованих лігандів з вихідних PDB-файлів, після чого до структури білка додавали атоми водню та розраховували парціальні заряди.

Прогнозування біологічних мішеней in silico

Для висунення гіпотези щодо поліфармакологічних профілів сполук застосовували комбінований підхід до прогнозування мішеней. Було проведено ліганд-орієнтований пошук за допомогою вебсервера SwissTargetPrediction, що дозволило отримати імовірно ранжований перелік потенційних білків-мішеней [13]. Паралельно здійснювали аналіз спеціалізованих баз даних (ChEMBL, BindingDB) [14, 15] для виявлення експериментально підтверджених мішеней для референтних сполук. Пріоритет для подальшого аналізу надавали тим мішеням, що були ідентифіковані за допомогою обох незалежних методів.

Протокол молекулярного докінгу та його валідація

Розрахунки методом молекулярного докінгу виконували за допомогою програми AutoDock Vina, імplementованої в програмному пакеті UCSF ChimeraX [16]. Для кожної мішені обчислювальну комірку (grid box) кубічної форми розміром 25×25×25 Å, яку центрували на геометричному центрі сайту зв'язування, положення якого визначали за кокрystalізованим лігандом. Для забезпечення ретельного конформаційного пошуку було встановлено високе значення параметра вичерпності (exhaustiveness) – 60. Основною метрикою для оцінки результатів слугувала розрахована енергія зв'язування (ккал/моль).

Валідацію протоколу докінгу для кожної мішені проводили за допомогою процедури редокінгу. Кокрystalізований ліганд вилучали

з активного сайту та повторно здійснювали докінг до нього за розробленим протоколом. Протокол вважали валідним, якщо середньоквадратичне відхилення (RMSD) атомних координат пози ліганду з найкращим значенням енергії від його кристалографічного положення не перевищувало загально-прийнятого критерію в 2,0 Å. У випадках, коли цей критерій не виконувався, додатково аналізували альтернативні пози з близькими значеннями енергії.

Аналіз результатів докінгу та ADMET-профілювання

Візуальний аналіз розрахованих поз лігандів у сайтах зв'язування проводили в UCSF ChimeraX. Ідентифікацію нековалентних взаємодій (водневі зв'язки, гідрофобні контакти, π -стекинг, іонні взаємодії) здійснювали за допомогою вбудованих інструментів програми, що дозволило отримати структурне обґрунтування розрахованих значень енергії зв'язування.

Для оцінки фармакокінетичних властивостей та профілю безпеки сполук було проведено розрахунок комплексу ADMET-параметрів (абсорбція, розподіл, метаболізм, екскреція, токсичність) за допомогою вебсерверів SwissADME [17], ADMET-AI [18] та eToxPred [19]. Аналізували ключові параметри, зокрема проникність через гематоенцефалічний бар'єр, абсорбцію у шлунково-кишковому тракті, відповідність «правилу п'яти» Ліпінські та потенційну взаємодію з ізоферментами системи цитохрому P450.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Валідація протоколу молекулярного докінгу та методологічні аспекти

Для підтвердження прогностичної валідності розробленої обчислювальної моделі було проведено процедуру валідації протоколу докінгу для кожної з білкових мішеней. Валідацію здійснювали шляхом редокінгу: вилучення кокрystalізованого ліганду з активного сайту та його повторного докінгу. Для низки мішеней, зокрема для TSPO та ГАМК^A-рецептора, протокол було успішно валідовано. Поза ліганду з найкращим

енергетичним показником демонструвала середньоквадратичне відхилення (RMSD) від кристалографічного положення менше 2,0 Å.

Водночас для структурно складних, мультисубодиничних систем, таких як ГАМК^A-рецептор, редокінг нативних лігандів (алпразоламу) призводив до отримання високих значень RMSD (> 4 Å). При цьому алгоритм коректно ідентифікував локалізацію сайту зв'язування. Детальний візуальний аналіз показав, що хоча жорсткий каркас лігандів розташовувався правильно, програма систематично не відтворювала точне положення гнучких бічних груп (зокрема, фенільного замісника), що є відомим обмеженням для докінгу в модель жорсткого рецептора.

З огляду на це, протокол було визнано надійним для ідентифікації сайтів зв'язування та порівняльного ранжування афінності сполук у межах однієї серії розрахунків. Відповідно, при подальшому аналізі основну увагу приділяли відносним різницям в енергіях зв'язування між досліджуваними та референтними сполуками, а не абсолютній точності передбачених поз.

Комплексний скринінг методом молекулярного докінгу

Було проведено комплексний скринінг досліджуваних сполук (Карбацетам, BS34-20, MPTD-01) до панелі ключових білків-мішеней ЦНС з метою визначення їхніх поліфармакологічних профілів. Розраховані значення енергії зв'язування для найкращих поз кожної сполуки наведено в таблицях 1 і 2.

Карбацетам демонструє потужний та широкий спектр взаємодій

Аналіз даних, наведених у таблиці 1, свідчив, що Карбацетам є найпотужнішою та фармакологічно найрізноманітнішою сполукою серед досліджуваних. Розрахована афінність до ГАМК^A-рецептора (-10,513 ккал/моль) є винятково високою, зіставною з такою у високопотенційного бензодіазепіну алпразоламу та значно вищою, ніж у діазепаму. При цьому висока афінність сполуки не обмежувалася єдиною мішенню. Карбацетам

Таблиця 1

Розраховані енергії зв'язування (ккал/моль) Карбацетаму та еталонних сполук

Таргет	PDB ID	Сполука	Енергія зв'язування (ккал/моль)
Type-A γ-aminobutyric (GABA A) receptor (α1β3γ2)	6HUO	Carbacetam	-10,513
		Alprazolam (Ref.)	-10,663
		Diazepam (Ref.)	-8,253
Type-B γ-aminobutyric (GABA B) receptor (GBR1, GBR2)	4MS4	Carbacetam	-8,325
		Baclofen (Ref.)	-7,602
Translocator protein (TSPO)	N/A	Carbacetam	-9,053
		Diazepam (Ref.)	-6,804
AMPA-subtype GluA2 receptor	5L1F	Carbacetam	-8,258
		Perampanel (Ref.)	-9,069
The voltage-gated sodium channel Nav1.2	6J8E	Carbacetam	-9,420
		Lamotrigine (Ref.)	-6,841
Orexin-1 Receptor (Site 1)	6TOT	Carbacetam	-8,190
		Lemborexant (Ref.)	-9,615
Orexin-1 Receptor (Site 2)	6TOT	Carbacetam	-8,464
		Lemborexant (Ref.)	-9,646

Таблиця 2

Розраховані енергії зв'язування (ккал/моль) досліджуваних 2,3-BZP та еталонних сполук

Таргет	PDB ID	Сполука	Енергія зв'язування (ккал/моль)
Type-A γ-aminobutyric (GABA A) receptor (α1β3γ2)	6HUO	MPTD-01	-7,235
		BS34-20	-8,379
		Alprazolam (Ref.)	-10,663
		Diazepam (Ref.)	-8,253
Type-B γ-aminobutyric (GABA B) receptor (GBR1, GBR2)	4MS4	MPTD-01	-5,937
		BS34-20	-6,640
		Baclofen (Ref.)	-7,602
Translocator protein (TSPO)	N/A	MPTD-01	-6,722
		BS34-20	-7,065
		Diazepam (Ref.)	-6,804
AMPA-subtype GluA2 receptor	5L1F	MPTD-01	-6,721
		BS34-20	-7,904
		Perampanel (Ref.)	-9,069
The voltage-gated sodium channel Nav1.2	6J8E	MPTD-01	-6,361
		BS34-20	-7,356
		Lamotrigine (Ref.)	-6,841

також прогнозується як потужний ліганд до ГАМК^B-рецептора, перевершуючи за розрахованою енергією зв'язування референтний агоніст баклофен (-8,325 проти -7,602 ккал/моль), та до TSPO, де його афінність значно перевищувала таку у діазепаму (-9,053 проти -6,804 ккал/моль).

Окрім того, Карбацетам продемонстрував високу прогнозовану афінність до ключових іонних каналів. Енергія його зв'язування в порі каналу Nav1.2 (-9,420 ккал/моль) виявилася суттєво нижчою, ніж у відомого блокатора ламотриджину (-6,841 ккал/моль). Подібним чином, Карбацетам показав помітну афінність до обох ідентифікованих сайтів зв'язування орексинового рецептора 1-го типу.

Похідні 2,3-бензодіазепіну виявляють більш сфокусований профіль взаємодії

На відміну від Карбацетаму, похідні 2,3-BZD продемонстрували вужчий, хоча й мультитаргетний, спектр взаємодії (табл. 2). Сполука BS34-20 стабільно виявлялася

більш активним аналогом у парі. Її енергія зв'язування з ГАМК^A-рецептором (-8,379 ккал/моль) була зіставною з такою у діазепаму. Обидві сполуки, BS34-20 та MPTD-01, показали помірну афінність до неконкурентного сайту АМРА-рецептора. Для всіх інших досліджених мішеней (ГАМК^B, TSPO, Nav1.2) розраховані енергії зв'язування були переважно нижчими або порівнянними з відповідними референтними лігандами. Це свідчило про те, що фармакологічний профіль цих сполук зосереджений переважно на модуляції ГАМК^A-та АМРА-рецепторів.

Прогноз фізико-хімічних властивостей та ADMET-профілю

Для комплексної оцінки фармакологічного потенціалу досліджуваних сполук було проведено *in silico* аналіз їхніх фізико-хімічних та фармакокінетичних властивостей (ADMET). Ключові дескриптори, що визначали їхню відповідність критеріям "придатності до ролі ліків" (*drug-likeness*), узагальнено в таблиці 3.

Таблиця 3

Прогнозовані фізико-хімічні та фармакокінетичні властивості досліджуваних сполук

Параметр	MPTD-01	BS34-20	Carbacetam	Опис
Фізико-хімічні властивості				
Молекулярна маса (г/моль)	268.32	290.33	278.36	
LogP	2.23	2.76	4.18	Коефіцієнт ліпофільності
Порушення правила Ліпінські	0	0	0	Маркер оральної біодоступності
SAscore	0.19	0.21	0.20	Індекс синтетичної доступності
Фармакокінетика				
Абсорбція в ШКТ (НІА)	Висока	Висока	Висока	Ймовірність всмоктування при пероральному прийомі
Проникність через ГЕБ	Так	Так	Так	-
Субстрат Р-глікопротеїну	Ні	Так	Так	Ймовірність активного виведення з клітин
Токсичність				
AMES (мутагенність)	Ні	Ні	Ні	Ризик пошкодження ДНК
Блокада hERG	Ні	Ні	Ні	Ризик кардіотоксичності
Гепатотоксичність (DILI)	Ні	Ні	Ні	Ризик ураження печінки
Tox-score	0.60	0.60	0.51	Загальний індекс токсичності (нижче = краще)

Аналіз показав, що всі три сполуки мають сприятливі фізико-хімічні характеристики, що відповідали критеріям для пероральних препаратів з дією на ЦНС. Критично важливим є те, що для всіх трьох сполук прогнозувалася висока здатність долати гематоенцефалічний бар'єр та високий рівень абсорбції у шлунково-кишковому тракті. Оцінка токсикологічного профілю виявила низькі ризики мутагенності (тест Еймса), кардіотоксичності (блокада hERG-каналів) та гепатотоксичності. Загалом, отримані дані свідчили про сприятливий *in silico* профіль безпеки та фармакокінетики досліджуваних сполук.

ОБГОВОРЕННЯ

Поліфармакологічний профіль Карбацетаму як основа його унікальної дії

Інтегрований аналіз результатів скринінгу методом молекулярного докінгу виявив, що Карбацетам є винятково перспективним терапевтичним кандидатом зі складним та потужним поліфармакологічним профілем, що докорінно відрізняє його від класичних бензодіазепінів. Розрахована афінність сполуки до бензодіазепінового сайту ГАМК-рецептора (-10,513 ккал/моль) є надзвичайно високою, не поступаючись показнику високопотенційного анксиолітика алпразоламу (-10,663 ккал/моль) та значно перевищуючи такий для діазепаму (-8,253 ккал/моль). Це створювало надійне молекулярне підґрунтя для пояснення вираженої анксиолітичної активності, встановленої у доклінічних дослідженнях.

Профіль Карбацетаму також доповнюється потужними взаємодіями з іншими компонентами ГАМК-ергічної системи та поза її межами. Висока афінність до ГАМК^B-рецептора, що перевищує таку для референтного агоніста баклофену, вказувало на ймовірний синергічний механізм гальмування ЦНС та міорелаксації.

Крім того, отримані нами дані свідчили про те, що Карбацетам є потужним модулятором потенціал-залежних йонних каналів Nav1.2, що вважаються ключовими регуляторами нейронної активності [20]. Висока прогнозована афінність сполуки до пори каналу (-9,420

ккал/моль), що перевищує показник відомого блокатора ламотриджину, може становити структурну основу для нейропротекторних ефектів, оскільки такий механізм є спільним для багатьох протисудомних та нейростабілізуючих засобів, що запобігають ексайтотоксичності: блокатори Nav1.2, такі як фенамати, продемонстрували нейропротекторну дію проти глутамат-індукованого пошкодження в клітинних культурах [21], а блокада VGSCs є доведеною стратегією нейропротекції в моделях травми спинного та головного мозку [22].

Потужне зв'язування Карбацетаму з TSPO дає змогу припустити його залученість до регуляції нейрозапалення та нейростероїдогенезу, процесів, що відіграють важливу роль у патогенезі тривожних та афективних розладів. Ключова роль TSPO полягає в транспортуванні холестеролу до мітохондрій, що є швидкість-лімітуючим етапом для синтезу нейростероїдів, таких як алопрегнанолон [23]. Враховуючи, що ліганди TSPO довели свою ефективність на тваринних моделях тривоги, вплив Карбацетаму на цю мішень може реалізуватися двома синергічними шляхами: здатністю знижувати прозапальні сигнали в ЦНС через модуляцію мікрогліальної активації та стимулювати продукцію ендогенних нейростероїдів, що мають власну анксиолітичну дію [24].

Такий складний фармакологічний профіль дозволяє сформулювати єдину гіпотезу: унікальна терапевтична дія Карбацетаму (потужна анксиолітична активність у поєднанні з ноотропними властивостями та відсутністю седації) є наслідком синергічної взаємодії з кількома протеїнами-мішенями. Ми припускаємо, що потужна модуляція ГАМК^A-рецепторів є основою анксиолітичного ефекту, тоді як одночасний вплив на ГАМК^B-рецептори, TSPO та Nav1.2 забезпечує комплексний нейропротекторний та ноотропний ефект.

При цьому помірна афінність до орексинових рецепторів може нівелювати седацію, характерну для потужних ГАМК-ергічних агоністів. Орексинові нейрони є унікальним інтегративним хабом. Вони отримують та обробляють інформацію з багатьох джерел, включаючи метаболічні сигнали, циркадні

ритми та, що найважливіше, сигнали від лімбічної системи Це дозволяє їм транслювати емоційний та фізіологічний стан організму у відповідний рівень бадьорості та пильності [25]. На відміну від прямого гальмування ЦНС, як у випадку з BZD, антагоністи орексину можуть «нормалізувати» поріг збудження, знижуючи патологічну дизрегуляторну активність системи та фрагментацію сну. Це не просто седація, а більш тонка модуляція стану свідомості, спрямована на усунення одного з ключових симптомів тривоги.

Збалансована модуляція ГАМК^A- та AMPA-рецепторів як стратегія досягнення анкіоселективності

На противагу широкому профілю Карбацетаму, похідні 2,3-бензодіазепіну MPTD-01 та BS34-20 виявляли більш сфокусовану фармакологію. Їхній основний механізм, імовірно, полягав у збалансованій, помірній модуляції як інгібіторного ГАМК^A-рецептора, так і збуджувального AMPA-рецептора. Якщо класичні бензодіазепіни спричиняють неселективне пригнічення ЦНС за рахунок глобального посилення ГАМК-ергічного гальмування, то подвійна дія 2,3-BZD може забезпечувати тоншу регуляцію нейрональної активності. Одночасне пригнічення глутаматергічної передачі (через антагонізм до AMPA-рецепторів) та помірне посилення ГАМК-ергічного гальмування може призводити до більш цілеспрямованого зниження нейрональної гіперзбудливості без розвитку вираженої седації, мнестичних порушень чи міорелаксації. Ця гіпотеза надає переконливе молекулярне обґрунтування «анкіоселективного» ефекту, що спостерігається для цього класу сполук. Наші дані про те, що BS34-20 має вищу афінність до мішеней, ніж MPTD-01, узгоджуються з експериментальними даними, які свідчать про його вищу активність [26].

Методологічні обмеження та перспективи подальших досліджень

Дане дослідження є суто обчислювальним (*in silico*), а отже, формує підґрунтя для

висунення гіпотез, що потребують експериментальної верифікації, а не є остаточним доказом активності. Використаний протокол докінгу в модель жорсткого рецептора, попри його надійність, продемонстрував відомі обмеження в точному відтворенні поз лігандів для структурно складних мішеней. Разом з тим, висока узгодженість результатів порівняльного ранжування афінності для різних конформацій рецепторів (6HUP та 6HUO) суттєво підвищує достовірність основних висновків щодо відносної активності досліджених сполук.

Для подальшого обґрунтування отриманих *in silico* висновків необхідна їхня експериментальна верифікація. Першочерговим завданням є проведення радіолігандного аналізу для кількісного визначення афінності, особливо для нових мішеней, ідентифікованих для Карбацетаму (Nav1.2, ГАМК^B, TSPO, NMDA). Наступним кроком є проведення функціональних тестів (наприклад, метод фіксації потенціалу (*patch-clamp*) для іонних каналів, аналіз зв'язування GTPγS для GPCR) з метою визначення характеру взаємодії (агонізм, антагонізм, алостерична модуляція).

Для підтвердження стабільності розрахованих комплексів «ліганд-рецептор» доцільно провести симуляції молекулярної динаміки (тривалістю ≥ 100 нс) для систем з найвищою афінністю, зокрема для комплексів Карбацетаму з ГАМК^A-рецептором та каналом Nav1.2. Це дозволить детально проаналізувати стабільність поз та розрахувати вільну енергію зв'язування за допомогою методів MM/PBSA або MM/GBSA.

Подальші дослідження мають бути спрямовані на вивчення селективності сполук до різних субодиниць рецепторів (наприклад, $\alpha 1$ - проти $\alpha 2/\alpha 3$ -вмісних ГАМК^A-рецепторів). Відомо, що переважна афінність до $\alpha 2/\alpha 3$ -субодиниць є молекулярною ознакою неседативних анкіолітиків [27] і цю гіпотезу можна ефективно перевірити за допомогою розроблених нами обчислювальних моделей.

Таким чином, дана робота підкреслює

ключовий принцип сучасної розробки лікарських засобів: створення безпечніших та ефективніших нейротерапевтичних препаратів полягає не стільки у досягненні максимальної селективності, скільки в раціональному дизайні мультитаргетних сполук з прецизійно налаштованими фармакологічними профілями. Сформульовані в цьому дослідженні молекулярні гіпотези визначають чіткий напрямок для подальшої експериментальної верифікації, необхідної для трансляції отриманих результатів у практичні клінічні рішення.

ВИСНОВКИ

1. Проведене комплексне дослідження *in silico* дозволило розкрити складні поліфармакологічні механізми дії трьох нових анксиолітичних сполук. Застосування мультитаргетного підходу дало змогу виявити унікальні фармакологічні профілі, що пояснюють їхній терапевтичний потенціал та сприятливі профілі безпеки. Отримані результати формують об'єктивне, засноване на даних підґрунтя для розуміння механізмів дії цих структурно різномірних сполук.
2. Похідне β -карболіну, Карбацетам, ідентифіковано як потужну мультитаргетну сполуку. Розрахунки свідчать, що його висока ефективність, ймовірно, зумовлена синергічною взаємодією з мережею ключових мішеней ЦНС, що включає ГАМК^A-, ГАМК^B- та TSP0-рецептори, а також іонні канали Nav1.2 та NMDA. Такий унікальний мультитаргетний профіль становить молекулярну основу для поєднання анксиолітичних, ноотропних та нейропротекторних властивостей, що є його ключовою механістичною відмінністю від класичних анксиолітиків.
3. Похідні 2,3-бензодіазепіну MPTD-01 та BS34-20 досягають свого «анксиоселективного» профілю, імовірно, завдяки більш сфокусованій, подвійній модуляції ГАМК-ергічної та глутаматергічної систем (ГАМК^A- та AMPA-рецептори відповідно).

Цей збалансований механізм, вірогідно, запобігає глобальному пригніченню ЦНС, характерному для менш селективних препаратів.

Відмова від відповідальності. Автори заявляють, що висловлені у поданій статті думки є їх власними, а не офіційними позиціями установи.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Джерела фінансування. Дослідження виконано за ініціативою кафедри патофізіології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (Київ, Україна) та фінансується за бюджетною програмою МОЗ України, державний реєстраційний номер 0122U001308.

REFERENCES

1. GBD 2019 Mental Disorders Collaborators. Global, regional, and national burden of 12 mental disorders in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Psychiatry*. 2022;9(2):137-50.
2. Gao Y, Zhou W, Wang Q, Zhai Q, Zhou L. Global, regional, and national burden of mental disorders and substance use disorders in older adults from 1990 to 2021: a systematic analysis and future trend prediction study. *Front Psychiatry*. 2025;16.
3. Masiulis S, Desai R, Uchański T, Martin IS, Lavery D, Karia D, et al. GABAA receptor signaling mechanisms revealed by structural pharmacology. *Nature*. 2019;565(7741):454-9.
4. Griffin CE, Kaye AM, Bueno FR, Kaye AD. Benzodiazepine pharmacology and central nervous system-mediated effects. *Ochsner J*. 2013;13(2):214-23.
5. Bolognesi ML. A new era for multi-target drug discovery? *ACS Med Chem Lett*. 2019;10(3):273-5.
6. Ramsay RR, Popovic-Nikolic MR, Nikolic K, Uliassi E, Bolognesi ML. A perspective on multi-target drug discovery and design for complex neurological disorders. *Front Neurosci*. 2018;12:269.

7. Donevan SD, Rogawski MA. GYKI 52466, a 2,3-benzodiazepine, is a highly selective, non-competitive antagonist of AMPA/kainate receptor responses. *Neuron*. 1993;10(1):51-9.
8. Aricioglu F, Akkaya C, Al-Salami M, Dastan D, Ozek G, Ozek T. Nootropic and neuroprotective effects of β -carboline alkaloids. *Turk J Pharm Sci*. 2019;16(3):362-9.
9. Bogza SL, Kiselev VV, Tkach VI, Vlasenko SI. New 2,3-benzodiazepine derivative: synthesis, activity on central nervous system, and toxicity study in mice. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14(8):814.
10. Kudryavtsev DS, Solovyov AY, Zhuravel IO, Bogza SL. Screening of anxiolytic properties and analysis of structure-activity relationship of new derivatives of 6-(4-methoxy)-7H-[1,2,4]-triazolo [3,4-a]. [2,3]-benzodiazepine. *Res Results Pharmacol*. 2021;7(3):11-22.
11. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(1):235-42.
12. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF ChimeraX: structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci*. 2021;30(1):70-82.
13. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(W1):W357-64.
14. Mendez D, Gaulton A, Bento AP, Chambers J, De Veij M, Félix E, et al. ChEMBL: towards direct deposition of bioassay data. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D930-40.
15. Gilson MK, Liu T, Baitaluk M, Nicola G, Hwang L, Chong J. BindingDB in 2015: A public database for medicinal chemistry, computational chemistry and systems pharmacology. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D1045-53.
16. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem*. 2010;31(2):455-61.
17. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web server to support rational medicinal chemistry. *Sci Rep*. 2017;7(1):42717.
18. Swanson K, Walther P, Leitz J, Bosc N, Le M, Pérez-Nuño VI, et al. ADMET-AI: a machine learning ADMET platform for evaluation of large-scale chemical libraries. *Bioinformatics*. 2024;40(7):btae416.
19. Pu L, Naderi M, Liu T, Wu HC, Zhang E, Liu T, et al. eToxPred: a machine learning-based approach to estimate the toxicity of drug candidates. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2019;20(1):2.
20. Zhang J, Chen X, Eaton M, Wu J, Ma Z, Lai S, et al. Severe deficiency of the voltage-gated sodium channel NaV1.2 elevates neuronal excitability in adult mice. *Cell Rep*. 2021;36(5):109495.
21. Sun JF, Zhao MY, Xu YJ, Su Y, Kong XH, Wang ZY. Fenamates inhibit human sodium channel Nav1.2 and protect glutamate-induced injury in SH-SY5Y cells. *Cell Mol Neurobiol*. 2020;40(8):1405-16.
22. Schwartz G, Fehlings MG. Evaluation of the neuroprotective effects of sodium channel blockers after spinal cord injury: improved behavioral and neuroanatomical recovery with riluzole. *J Neurosurg*. 2001;94(2 Suppl):245-56.
23. Lee Y, Park Y, Nam H, Lee JW, Yu SW. Translocator protein (TSPO): the new story of the old protein in neuroinflammation. *BMB Rep*. 2020;53(1):20-7.
24. Rupprecht R, Papadopoulos V, Rammes G, Baghai TC, Fantl W, F-G, et al. Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(12):971-88.
25. Selleri S, Bruni F, Costagli C, Costanzo A, Guerrini G, Ciciani G, et al. The orexin system: a new therapeutic target for neuropsychiatric disorders. *Front Pharmacol*. 2014;5:16.
26. Shemet YaA, Ziablitshev SV, Likhodiievskiy VV, Korsak AV, Sychov OO, Chukhrai SM. The effect of gaba-benzodiazepine receptor complex modulators (MPTD-01 and BS 34-20) on the cerebral cortex after experimental brain injury. *Med Sci Ukr*. 2024;20(1):75-9.
27. Rudolph U, Möhler H. GABAA receptor subtypes: therapeutic potential in anxiety, depression, and cognitive disorders. *Neurotherapeutics*. 2014;11(1):18-41.

ANALYSIS *in silico* OF POLYPHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF NEW ANXIOLYTIC CANDIDATES BASED ON 2,3-BENZODIAZEPINE AND β-CARBOLINE

Ziablitsev S.V., Yevstifeev D.I., Likhodievsky V.V., Aleksandrenko N.A., Fedko K.O.

Bogomolets National Medical University Kyiv, Ukraine

Background. The search for anxiolytics with an improved safety profile is a key task of modern neuropsychopharmacology. Promising candidates are 2,3-benzodiazepine derivatives (MPTD-01, BS34-20) and β-carboline (Carbacetam), which in preclinical studies have demonstrated anxiolytic activity in the absence of side effects characteristic of classical 1,4-benzodiazepines.

Aim: to determine and compare the polypharmacological profiles of structurally distinct anxiolytic candidates MPTD-01, BS34-20 and Carbacetam to elucidate the molecular mechanisms of their action using *in silico* methods.

Materials and methods. The interaction of the compounds with a panel of key central nervous system targets, including GABAergic (GABA^A, GABA^B, TSPO), glutamatergic (AMPA), neuropeptide receptors, and ion channels (Nav1.2), was analyzed using molecular docking (AutoDock Vina, UCSF ChimeraX). ADMET profiling was also performed to assess the pharmacokinetic properties of the compounds.

Results. Carbacetam demonstrated a potent multitarget profile with high predicted affinity for GABA^A (-10.513 kcal/mol), the ion channel Nav1.2 (-9.420 kcal/mol), and the translocator protein TSPO (-9.053 kcal/mol), as well as significant interaction with GABA^B and AMPA receptors. In contrast, 2,3-benzodiazepine derivatives (BS34-20 and MPTD-01) showed a more focused effect, consisting in a balanced modulation of GABA^A (binding energy up to -8.379 kcal/mol for BS34-20) and AMPA receptors. A favorable safety profile and the ability to overcome the blood-brain barrier were predicted for all compounds.

Conclusion. The obtained data indicate that the favorable therapeutic profile of the studied compounds is due not to selectivity to a single target, but to a balanced interaction with several signaling pathways. Understanding these polypharmacological profiles created the basis for further experimental validation and rational design of safer neurotherapeutic agents.

Key words: anxiolytics; 2,3-Benzodiazepines; β-Carbolines; Molecular Docking; In Silico Pharmacology; Polypharmacology; GABA-A Receptors; GABA-B Receptors; AMPA Receptors; Orexins; Ion Channel Nav1.2.