УДК 547.9;577.1, 547.9;577.1.01, 577.32
№ держреєстрації 0120U104732
Інв. № _____

Національна академія наук України
Інститут молекулярної біології і генетики (ІМБіГ)
03143, м. Київ, вул. Заболотного, 150; тел. (044) 526-11-69

ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор Інституту молекулярної біології і генетики НАН України
академік НАН України

_____ М.А. Тукало
15 грудня 2021 р.

ЗВІТ
ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ

за договорами
від 21 жовтня 2020 року № 16/01.2020
від 6 травня 2021 року № 142/01/0517

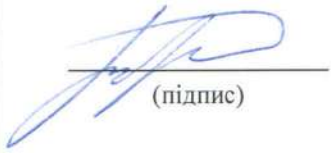
РОЗРОБКА ТА ТЕСТУВАННЯ IN VIVO ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕЇНКІНАЗИ С БЕТА – КЛЮЧОВОГО ФЕРМЕНТУ ІНДУКЦІЇ НЕЙТРОФІЛЬНИХ ПОЗАКЛІТИННИХ ПАСТОК (NETS) ДЛЯ ЗАПОБІГАННЯ ГОСТРОГО РЕСПІРАТОРНОГО ДИСТРЕС СИНДРОМУ (ARDS)

Науковий керівник НДР
д.х.н., проф., завідувач відділу
біомедичної хімії _____ С.М. Ярмолюк
15 грудня 2021 р.

2021

Результати роботи розглянуто Вченою радою ІМБіГ НАН України, протокол від 14 грудня 2021 р. № 15

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР д.х.н., проф., завідувач відділу біомедичної хімії	 (підпис)	С.М. Ярмолюк (реферат, вступ, розділ 1, 3, висновки)
Відповідальні виконавці:		
К.х.н., с.н.с.	 (підпис)	В.Г. Бджола (вступ, 3.1.5, 3.2.4, висновки) 10.12. 2021
К.б.н., н.с.	 (підпис)	Г.П. Волинець (розділи 2.1, 3.2.4) 10.12. 2021
К.м.н., н.с.	 (підпис)	Д.О. Пашевін (вступ; розділи 1, 2 3, висновки) 10.12.2021
К.б.н.	 (підпис)	С.А. Старосила (розділи 2.2, 3.1.1, 3.1.2) 9.12.2020
К.м.н., н.с.	 (підпис) (дата)	Д.О. Строй (розділи 2.4-2.8, 3.2.1-3.2.5) 10.12. 2021
К.б.н., м.н.с.	 (підпис)	М.В. Протопопов (вступ; розділи 2.1-2.3, 3.1.1-3.1.5, 3.2.4 висновки) 10.12. 2021
Аспірант	 (підпис) (дата)	В.О. Поліщук (розділи 3.2.6-3.2.10) 10.12. 2021
Аспірант	 (підпис)	Т.О. Козак (розділи 2.9-2.16, 3.2.11-3.2.12) 10.12. 2021

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 119 с., 46 рис., 6 табл., 2 додатки та 20 джерел.

Об’єкт дослідження – зміни активності протеїнкінази Cβ та активності NETозу за умов впливу інгібіторів.

Предмет дослідження – протеїнкіназа С бета, інгібітори протеїнкінази С бета, нейтрофільні гранулоцити.

Мета роботи – розробка, із застосуванням фармакофорного моделювання та молекулярного докінгу, низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази С бета (PKCB), як ключового ферменту активації нейтрофільних гранулоцитів із утворенням нейтрофільних позаклітинних пасток (NETs) для подальшого фізіологічного тестування, оптимізації відібраних молекул та проведення експериментальної терапії гострого респіраторного дистрес синдрому (ARDS).

Методи дослідження – фармакофорний скринінг, молекулярний докінг, імуноферментний аналіз (ELISE), спектрофлуориметрія, експресія генів, флуоресцентна мікроскопія, світлова мікроскопія та морфометрія.

Результати та їх новизна:

У результаті виконання роботи проведено оптимізацію розроблених на попередньому етапі ліганд-орієнтованих фармакофорних моделей інгібіторів протеїнкінази PKCB людини. За результатами фармакофорного скринінгу відносно них відібрано 4500 сполук. Проведено молекулярний докінг в АТФ-зв’язуючий сайт PKCB і відібрано 300 сполуку, що були накладені на результати фармакофорного моделювання. В результаті для тестування *in vitro/ in vivo* відібрано 28 кращих сполук по обох скринінгах.

Також було проведено визначення кількості позаклітинних нейтрофільних пасток (NETs) в ізольованих нейтрофілах кроля. Визначенно ефективність впливу інгібіторів протеїнкінази С бета (PKCB) як ключового ферменту активації нейтрофільних гранулоцитів із утворенням NETs, проведено оцінку дозозалежності їх активності. Також

був проведений ферментний імуносорбентний аналіз (ELISA) для оцінки впливу досліджуваних речовин на активність пурифікованої протеїнкінази С бета in vitro. Таким чином, визначені перспективні речовини, які можуть застосовуватися в якості блокаторів NETозу для попередження розвитку ARDS. Дані речовини-кандидати перевірялися на цитотоксичність (на культурі кардіоміоцитів), також вивчався їх дозозалежний ефект на активність пригнічення РКС-бета. Після даних досліджень відібрані речовини тестувалися на моделі ГРДС in vivo. Оцінювалися показники морфологічного (зміна маси легень, мікроскопічні зміни структури альвеол), імунохімічного (ELISA), генетичного (зміни експресії генів за різних умов) апарату.

Оптимізовані фармакофорні моделі можуть використовуватися іншими дослідницькими групами в Україні та світі для фармакофорного скринінгу з метою пошуку нових класів інгібіторів PKCB. Ідентифіковані сполуки-хіти, можуть застосовуватися в якості блокаторів NETs за для попередження розвитку ARDS. Вони можуть бути основою для подальшої оптимізації та біологічного дослідження.

Ключові слова: протеїнкіназа С бета, нейтрофільні позаклітинні пастки, гострий респіраторний дистрес синдром, хімічна оптимізація, сполука-хіт, сполука-лідер, раціональний дизайн ліків.

ABSTRACT

Report SRW: 119 p. there are 46 draw, 6 tables, 2 app., 20 sour.

Research object – modification in protein kinase Cβ activity and NET's activity under the influence of inhibitors.

Purpose of work – protein kinase C beta, protein kinase C beta inhibitors, neutrophilic granulocytes.

Research methods – pharmacophore screening, molecular docking, , ELISA, spectrofluorimetry, gene expression, fluorescence microscopy, light microscopy and morphometry.

Results and novelty – as a result of the work, the optimization of ligand-oriented pharmacophore models of human PKCB protein kinase inhibitors developed at the previous stage was carried out. According to the results of pharmacophore screening, 4,500 compounds were selected. Molecular docking was performed at the ATP-binding site of PKCB and 600 compounds were selected. The results of these screenings were superimposed. In consequence, for in vitro / in vivo testing, 48 preferred compounds were selected from both screenings.

The number of extracellular neutrophil traps (NETs) in isolated rabbit neutrophils was also determined. The effectiveness of the protein kinase C beta inhibitors action as a key enzyme of activation of neutrophilic granulocytes with the formation of NETs was determined and the dose-dependence of their activity was evaluated. To estimate inhibitory activity of tested compounds on in vitro protein kinase C beta, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was also performed. Thus, promising compounds that can be used as NETose blockers to prevent the development of ARDS have been identified. For best compounds, cytotoxicity was tested on cardiomyocytes system. Also, these compounds have been used for rat experimental ARDS treatment.

Keywords: protein kinase C beta, neutrophilic extracellular traps, acute respiratory distress syndrome, chemical optimization, hit-compound, lead-compound, rational drug design.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАК, ОДИНИЦЬ І ТЕРМІНІВ11

ВСТУП.....12

1. СУЧАСНИЙ СТАН ПИТАННЯ 14

2 МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....17

2.1 Молекулярний докінг за допомогою пакета програм Autodock 17

2.1.2. Підготовка молекул лігандів 17

2.1.3. Підготовка молекули рецептора 17

2.1.4. Створення мап для молекулярного докінгу.....18

2.1.4. Гнучкий докінг.....19

2.1.5. Ранжування результатів молекулярного докінгу. 20

2.2. Побудова фармакофорних моделей та фармакофорний скринінг.....20

2.2.1 Оптимізація ліганд-орієнтованих фармакофорних моделей. Фармакофорний скринінг 22

2.3. Побудова рецепторно-орієнтованої фармакофорної моделі.....25

2.4. Опис тварин, що використовували для отримання циркулюючих нейтрофілів.....26

2.5. Оцінка впливу речовин, підібраних методом молекулярного докінгу, на активність формування нейтрофільних екстрацелюлярних пасток 27

2.6. Визначення ефективності низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази С бета (PKCB) на утворення NETs.....28

2.7. Визначення ефективності і дозозалежності низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази С бета (PKCB) in vitro методом ферментного імуносорбентного аналізу.....29

2.8. Оцінка кардіотоксичності відібраних сполук на культурі кардіоміоцитів.....30

2.9. Моделювання ГРДС на щурах лінії SHR.....32

2.10. Оцінка набряку легень.....33

2.11. Вимірювання вмісту білку в бронхолегеневому лаважі (БАЛ).....33

2.12. Вимірювання концентрації вільної ДНК у бронхоленевому лаважі та плазмі крові.....34

2.13. Вимірювання рівню цитокінів.....35

2.14. Визначення експресії генів, що кодують цитокіни.....35

2.15. Світова мікроскопія.....36

2.16. Імуногістохімічні дослідження.....38

3 РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....40

3.1. Раціональний дизайн інгібіторів PKCB.....40

3.1.1. Підготовка скринінгової колекції сполук, навчальних та тестових вибірок для фармакофорного моделювання.....40

3.1.2. Побудова діганд-орієнтованих фармакофорних моделей інгібіторів PKCB.....41

3.1.2.1. Оптимізація ліганд-орієнтованих фармакофорних моделей інгібіторів PKCB та фармакофорний скринінг з їх використанням.....47

3.1.3. Побудова рецепторно-орієнтованої фармакофорної моделі інгібіторів PKCB.....50

3.1.4. Молекулярний докінг сполук в АТФ-зв'язувальний сайт протеїнкінази PKCb і відбір лігандів для біохімічного тестування 53

3.1.5. Відбір лігандів для біохімічного тестування.....55

3.2. Оцінка біологічної активності (in vitro/ in vivo) та токсичності.....55

3.2.1. Оцінка речовин, підібраних методом молекулярного докінгу, на активність формування нейтрофільних екстрацелюлярних пасток.....56

3.2.2. Визначення дозозалежності відібраних інгібіторів PKCB на утворення NETs 57

3.2.3. Визначення ефективності і дозозалежності низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази С бета (PCKß) in vitro методом ферментного імуносорбентного аналізу.....62

3.2.4. Способи взаємодії сполук 146528, 786436 та 963975 із АТФ-акцепторним сайтом.....65

3.2.5. Оцінка кардіотоксичності обраних блокаторів PCKß на культурі неонатальних кардіоміоцитів щура 68

3.2.6. Оцінка набряку легень 71

3.2.7. Оцінка вмісту загального білку у бронхолегеневому лаважі.....72

3.2.8. Оцінка вмісту вільної ДНК у БАЛ та плазмі крові щурів 73

3.2.9. Визначення рівнів спонтанного та індукованого NETозу за допомогою методу флуоресцентної мікроскопії у щурів з ГРДС. 75

3.2.10. Оцінка вмісту цитокінів у плазмі крові щурів.....83

3.2.11. Визначення експресії генів, що кодують цитокіни 86

3.2.12. Оцінка ультраструктурних змін у легенях методом світлової мікроскопії 88

ВИСНОВКИ 99

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 101

Додаток А 104

Додаток Б 115

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАК, ОДИНИЦЬ І ТЕРМІНІВ

РКСВ – протеїнкіназа С бета

ГРДС – гострий респіраторний дистрес синдром

ARDS – Acute respiratory distress syndrome

NETs – нейтрофільні екстрацеллюлярні пастки

PDB – protein data bank

RMSD – Root-mean-square deviation (середньоквадратичне відхилення)

АТФ – аденозинтрифосфат

IC_{50} – концентрація інгібітора, при якій активність ензиму становить 50% від початкової

ВСТУП

Пандемія SARS-CoV-2 COVID-19 триває вже другий рік і за статистикою станом на серпень 2021 року в Україні налічується понад 2,3 млн випадків інфікування вірусом SARS-CoV-2 та понад 53 тисяч смертей (згідно даних на сайті https://covid19.gov.ua/). 42% людей, які страждають пневмонію викликану цим вірусом та у понад 61% людей, що при цьому потребують догляду в відділеннях інтенсивної терапії спостерігається розвиток гострого респіраторного дистрес синдрому (надалі ARDS). ARDS при протіканні хвороби COVID-19 спричиняє летальні наслідки в понад 26% (26 - 61,5%) випадків у пацієнтів відділень інтенсивної терапії, та у понад 65% (65,7% - 94%.) у пацієнтів, що підключені до апаратів штучної вентиляції легень. %. [1,3] Одним із основних патогенетичних механізмів запуску ARDS при COVID-19 вважається активація нейтрофільних гранулоцитів з утворенням NETs [1, 2]. Нами раніше було показано, що у пацієнтів з ARDS кількість NETs в бронхіальних аспіратах корелювала з вираженістю і важкістю патологічного процесу.

Виходячи з цього, розробка нових препаратів, що можуть інгібувати утворення NETs є перспективним напрямком. Перспективною мішенню для розробки таких препаратів є протеїнкіназа С бета (PKCB) – фермент, що активується при активації рецепторів нейтрофілів (ряду толл-лайк рецепторів, CD-14 та інших), забезпечує залучення усіх сигнальних шляхів реалізації NETозу [8-10] та активація PKCB є достатньо специфічною при індукції процесу NETозу.

В цій роботі було продемонстровано, що у пацієнтів з ГРДС кількість NETs в бронхолегеневому лаважі корелювала з вираженістю і тяжкістю патологічного процесу. Найбільш цікавою частиною проекту є пошук найбільш ефективних низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази С бета (PKCB) як ключового ферменту активації нейтрофільних гранулоцитів із

утворенням нейтрофільних позаклітинних пасток та фізіологічного тестування відібраних молекул, що може забезпечити ефективне пригнічення надмірної імунної реакції. Такий спосіб боротьби с ГРДС може забезпечити швидке та безпечне усунення запалення і таким чином зменшить рівень смертності як при COVID-19, так і при інших вірусних респіраторних інфекціях.

1. СУЧАСНИЙ СТАН ПИТАННЯ

Гострий респіраторний дистрес синдром (ГРДС) є безпосередньою причиною загибелі людей при ураженні легень різного генезу, передусім, при інфікуванні коронавірусами. SARS-CoV-2. COVID-19 є високопатогенним і може призвести до смертельних ускладнень, особливо до ГРДС. ГРДС розвивається у 42% пацієнтів, які страждають на пневмонію COVID-19, і у 61-81% пацієнтів, які потребують догляду у відділенні інтенсивної терапії. Смертність від типового ГРДС становить 40,0% (95% CI, 38,1% -42,1%). При COVID-19 від ГРДС смертність становить від 26% до 61,5% у відділеннях інтенсивній терапії, а у пацієнтів, які перебували ШВЛ, смертність може становити від 65,7% до 94%. [3, 4, 5]. У 2020 році з'явилися дані, що NETs мають велике значення в патогенезі коронавірусної хвороби. Так, у роботі Yu Zuo зі спів. показано, що в сироватці крові пацієнтів з COVID-19 підвищується рівень вільної ДНК, кон'югованої з ДНК мієлопероксидази (MPO-DNA) та цитрулінованого гістону H3 (Cit-H3) – основних високоспецифічних маркерів NETs [6]. В іншій роботі показано, що нейтрофіли формують NETs при гострому ураженні легень. Крім безпосереднього ушкодження, NETs провокують поляризацію альвеолярних макрофагів та утворення M1 фенотипу з прозапальною активністю. Було встановлено, що в пацієнтів з ГРДС рівень M1 корелював з NETs, так само, як і при експериментальному відтворенні цього синдрому [7]. Очевидно, що надлишок прозапального фенотипу макрофагів у легенях є ініціальним моментом розвитку важких форм COVID-19, які супроводжуються масивним виділенням прозапальних цитокінів ("цитокіновий шторм") з залученням у пошкодження й інших органів.

У цілому, активне утворення NETs є характерним для людей з груп ризику розвитку тяжкого перебігу COVID-19: це люди похилого віку [8],

хворі із серцево-судинною патологією [9], цукровим діабетом та ожирінням [10].

З огляду на вищезгадані дані стає зрозумілою важливість дослідження процесів активації нейтрофільних гранулоцитів в механізмах реалізації ГРДС, зокрема, при COVID-19. Для вирішення цієї наукової проблеми потрібна релевантна модель, що дозволятиме розкрити патогенетичні ланцюги, в які залучені нейтрофільні гранулоцити. На нашу думку, такою моделлю може виступати комбінований вплив гіпервентиляції та одночасного введення Poly(I:C) низької молекулярної маси в верхні дихальні шляхи тварини. Аналоги такої моделі використовувалась раніше [11], було показано, що застосування Poly(I:C) погіршувало перебіг ГРДС через активацію TLR3 за умов супутньої гіпервентиляції. Відповідно, відтворення патологічних змін таким способом дасть змогу оцінювати вплив різноманітних агентів на перебіг ушкоджень легеневої тканини. Найбільш перспективною мішенню щодо впливу на участь нейтрофільних гранулоцитів в ГРДС, на нашу думку, є протеїнкіназа С β. Велика кількість досліджень доводять критичну важливість активної PKC для реалізації нейтрофільних пасток [12, 13].

Протеїнкіназа С (PKC, EC 2.7.11.13) – велика надродина серин/треонінкіназ, які опосередковують основні клітинні сигнали необхідні для активації, проліферації, диференціації та виживання клітин. Саме тому, що PKC має виконує величезну кількість клітинних функцій, вона може бути важливою мішенню для дії фармакологічних речовин. Існує принаймні п’ятнадцять ізотипів PKC, які мають подібну структуру, але мають різні функції. Ізотипи PKC можна поділити на три класи на основі первинної структури і біохімічні властивостей. Усі ізотипи PKC мають спільну характерну послідовність - мотив C1 на додаток до домену серин/треонінової протеїнкінази. Фізіологічна функція, специфічна для

ізотипу PKC, регулюється трьома подіями: дозрівання, каталітична активація та таргетінг.

Виходячи з наведених даних, пошук нових препаратів для контролю активності нейтрофільних гранулоцитів та пригнічення утворення NETs є вельми перспективним в якості можливих препаратів, що будуть зменшувати альтеративні процеси при ГРДС. На нашу думку, найкращою мішенню для терапевтичного впливу є протеїнкіназа С бета (PKCB) – ключовий фермент, який активується при активації рецепторів нейтрофілів (ряду толл-лайк рецепторів, CD-14 та інших) та забезпечує залучення усіх сигнальних шляхів реалізації [15, 16]. Маючи підтверджену модель (щури з впливом Poly(I:C) та гіпервентиляцією) ми будемо мати змогу адекватно оцінити вплив різних речовин-інгібіторів PKCB на перебіг ГРДС, та відібрати найефективніші з них у якості перспективних лікарських засобів. Для відбору найбільш ефективних речовин найбільш ефективними, на нашу думку, було дослідження їх впливу на культуру ізольованих нейтрофільних гранулоцитів і паралельне дослідження ефекту речовин на активність протеїнкіназаи С бета (PKCB) шляхом ферментного імуносорбентного аналізу (ELISA) з подальшим дослідженням дозозалежності їх впливу.

2 МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Молекулярний докінг за допомогою пакета програм Autodock

Для рецепторно-орієнтованого напівгнучкого докінгу використовували пакети програм та AutoDock 4.2.6. Для проведення процедури молекулярного докінгу необхідно підготувати молекулу рецептора (видалити зайві молекули з PDB файлу, що взятий з Protein Data Bank), створити мапи (координаційні файли, які визначають кишені для докінгу та необхідні параметри для кожного атому в ліганді), підготувати колекцію сполук, що буде докуватись (розставити необхідні заряди, конвертувати файли зі структурою лігандів з 2D в 3D формат, конвертувати мульти-SDF чи формату *.DB в окремі файли формату формату *.MOL2 для подальшої автоматичної обробки згідно процедури докінгу).

2.1.2. Підготовка молекул лігандів

Молекули лігандів для проведення молекулярного докінгу готуються з використанням трьох програм: Open Babel, Vega та MGL Tools.

Оптимізація геометрії лігандів виконується з використанням програми Open Babel. Призначення атомних типів AUTODOCK та зарядів Гайстейгера, додавання атомів водню на гетероатомах та збереження файлів з координатами ліганду в форматі PDBQT, проводяться програмами MGL Tools та Vega.

2.1.3. Підготовка молекули рецептора

Дані про просторову структуру протеїнкінази С бета було взято з бази даних Brookhaven Protein Data Bank (PDB). Мішенями для докінгу були дві просторові структури: 2I0E.

Видалення непотрібної інформації (координати атомів води, допоміжних іонів та молекул для кристалізації) з файлу рецептора виконувались в програмному забезпеченні від компанії BIOVIA Discovery Studio Visualizer.

Призначення атомних типів AUTODOCK та зарядів Гайстейгера, додавання гідрогенів до гетероатомів, збереження еоординатів в форматі PDBQT виконується в програмному пакеті MGL Tools.

2.1.4. Створення мап для молекулярного докінгу

Для створення мап необхідно визначити так званий GridBox. Це паралелепіпед, що визначає область для проведення розрахунків. В даній роботі GridBox будувався так, щоб важливі для активності та селективності сполук амінокислотні залишки знаходились в середині нього, роздільна здатність 0,208 Å. Також для проведення розрахунків необхідно зазначити всі можливі атоми, що входять до складу молекул лігандів. В даній роботі ці атоми були такими: C, O, N, P, Br, Cl, F H I S. Встановлення параметрів GridBox та типів атомів відбувається в програмному забезпеченні MGL Tools. Безпосереднє створення файлів мап для докінгу проводиться програмою AUTOGRID. GridBox зображено на картинці нижче.

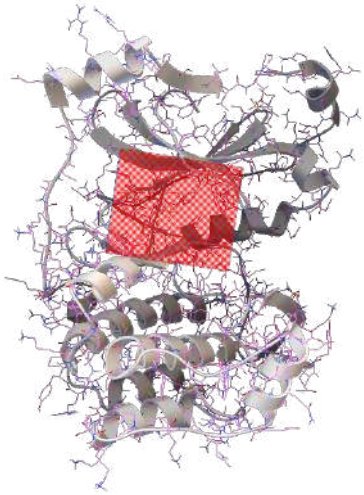


Рисунок 2.1 – Зображення грід-решітки, що була побудована для проведення молекулярного докінгу.

2.1.4. Гнучкий докінг.

AutoDock – мультиплатформенна програма, що працює як в середовищі Windows, так і Linux, але оскільки комп'ютерний кластер побудований на базі системи Linux, всі наступні розрахунки проводились з використанням скриптів, написаних на мові BASH. Програма AutoDock одночасно запускалась на 48 ядрах, розраховуючи таку ж кількість лігандів.

Для проведення молекулярного докінгу для кожного ліганду створюється файл параметрів в форматі DPF (Dock Parametr File), де зазначаються всі необхідні параметри для проведення розрахунків. Створення цих файлів виконується скриптами, що є у програмному пакеті MGL Tools.

Параметри за якими проводився віртуальний скринінг є наступними: крок поступального руху (translation step) – 2 Å, кут кватерніону (quaternion step) - 50°, торсійний кут (torsion step) - 50°, кут та коефіцієнт торсійної свободи (torsional degrees of freedom and coefficient) - 2 / 0.274, толерантність кластера (cluster tolerance) - 2 å, зовнішня енергія решітки (external grid

energy) – 1000, максимальна початкова енергія (max initial energy) – 0, максимальне число спроб (max number of retries) – 10000, число структур у популяції (number of individuals in population) – 300, максимальне число етапів оцінки енергії (maximum number of energy evaluations) – 850000, максимальне число генерацій (maximum number of generations) – 27000, кількість структур, які переходять до наступної генерації (number of top individuals to survive to next generation) – 1, рівень генної мутації (rate of gene mutation) - 0,02, рівень кросоверу (rate of crossover) – 0,8, спосіб кросоверу (mode of crossover) – arithmetic, альфа-параметр розподілу гауса (alpha parameter of cauchy distribution) – 0, бета-параметр розподілу гауса (beta parameter cauchy distribution) – 1, кількість запусків генетичного алгоритму ламарка (number of lamarckian genetic algorithm (lga) runs) – 10.

2.1.5. Ранжування результатів молекулярного докінгу.

Ранжування результатів відбувається з урахуванням кількісних та якісних параметрів. Кількісні розраховуються скоринговою функцією AutoDock. Якісні – оцінюються здатністю лігандів утворювати водневі зв’язки з ключовими амінокислотними залишками протеїнкінази СК2: Glu114, Val116, Ala 175.

2.2. ***Побудова фармакофорних моделей та фармакофорний скринінг***

Хімічні структури відомих інгібіторів протеїнкінази С бета (PKCB) були одержані з бази даних ChEMBL, а також із літературних даних та використані для побудови та валідації ліганд-орієнтованих фармакофорних моделей. Структури активних сполук для навчальної вибірки були

мінімізовані (2500 кроків мінімізації) та протоновані (pH = 7) за допомогою програми OpenBabel 2.4.0 у силовому полі MMFF94 (mmff94) з використанням алгоритму спряжених градієнтів.

Для підготовки колекції, що налічувала більше 150 тис. сполук, до фармакофорного скринінгу була проведена її фільтрація за правилом Ліпінського та від реакційноздатних сполук, далі для всіх молекул були згенеровані конформери та конвертовані в спеціальну базу даних зі структурою KDB-дерева. Для кожної молекули був встановлений ліміт 150 конформерів та 100 кроків оптимізації (силове поле MMFF94 (mmff94), алгоритм спряжених градієнтів). Для кожної молекули розраховували молекулярні дескриптори, такі як кількість атомів, кількість зв'язків різного типу, молекулярна вага, кількість донорів та акцепторів водневих зв'язків, logP, кількість галогенових атомів, топологічна полярна поверхня (TPSA) та молекулярна рефракція.

Тестову вибірку інгібіторів PKCB готували подібно до скринінгової колекції. Ґрунтуючись на ній, були підготовлені файли параметрів, необхідні для фармакофорного скринінгу та рескорингу результатів.

Ліганд-орієнтовані фармакофорні моделі будували за допомогою веб-серверу PharmaGist (http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PharmaGist/). Інгібітор бісіндолілмалеймід з комплексу з PKCB (PDB ID: 2I0E) (сполука-штифт) і 13 відомих інгібіторів цього ензиму з найвищою інгібувальною активністю (IC_{50} до 4,7 nM) використовувалися для побудови ліганд-орієнтованих фармакофорних моделей. Інші параметри були встановлені по замовчуванню.

З даних, отриманих з PharmaGist брали попарні суперпозиції вхідних лігандів до сполуки-штифта (бісіндолілмалеймід). При суперпозиції сполука-штифт була жорсткою, тоді як ліганди, що прирівнювались до неї – гнучкими. При цьому попарному вирівнюванні всі ліганди представлялися у вигляді фармакофорних точок. До точок штифта

прирівнювалися точки інших лігандів. За замовчуванням поріг відстані становив 1,8 Å для центрів ароматичних точок і 1,4 Å – для центрів інших типів фармакофорних точок. При вирівнюванні обраховувався скор, по якому обиралися кращі пари, за формулою $\sum_i s(f_i)$, де $s(f_i)$ - скор відповідності фармакофорній точці (за замовчуванням, його величина для гідрофобних груп становить 0,3, для ароматичних циклів – 0,3, для інших фармакофорних точок – 1) [13].

Візуалізацію та маніпуляцію з фармакофорними моделями проводили за допомогою програми Discovery Studio Visualizer 4.0 (http://www.3dsbiovia.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio/visualization-download.php). На основі міжмолекулярних зв'язків між бісіндолілмалеймідом і PKCB (PDB ID: 2I0E) було побудовано первинну фармакофорну модель. До неї були накладені ліганди з попарного вирівнювання. На основі відповідності цих лігандів фармакофорним точкам первинної моделі було обраховано ваги цих точок.

Моделі, відредаговані в програмі Discovery Studio Visualizer 4.0 зберігали у форматі .CHM. За допомогою програми PharmDeveloper, що була розроблена нами раніше [14, 15], проводили конвертацію файлів із формату .CHM у формат .QUERY.

Виключені об'єми конструювали за допомогою програми Studio Visualizer 4.0.

Також, за допомогою програми PharmDeveloper було здійснено оптимізацію та валідацію фармакофорних моделей, конвертовано скринінгову базу даних та проведено скринінг і рескоринг результатів.

2.2.1 Оптимізація ліганд-орієнтованих фармакофорних моделей. Фармакофорний скринінг

Оптимізація – це ітераційна процедура, в якій кожний етап ітерації – це фактично валідаційний скринінг тестової вибірки по відношенню до оптимізованої моделі. Як і у попередньому етапі проекту здійснювали три ітерації оптимізації радіусів та скору з кроком = 0,1 та 0,2 відповідно для кожного параметра.

Для оптимізації фармакофорних моделей було взято хімічні структури відомих інгібіторів протеїнкінази С бета (PKCB), зібрані з бази даних ChEMBL та із літературних даних і препроцесовані на попередньому етапі проекту були використані для валідації ліганд-орієнтованих фармакофорних моделей. Всього було 731 сполуки. З них було видалено навчальні інгібітори і поділено їх на активні і не активні. Катоф активності становив 50 нМ. Активних лігандів було 309, не активних – 409.

Для фармакофорного скринінгу з використанням оптимізованих моделей було взято колекцію, що налічувала більше 150 тис. сполук, теж препроцесовану на попередньому етапі проекту – профільтровану за правилом Ліпінського та від реакційноздатних сполук. Для всіх молекул були згенеровані конформери (до 150 конформерів та 100 кроків оптимізації (силове поле MMFF94 (mmff94), алгоритм спряжених градієнтів)) та конвертовані в базу даних зі структурою KDB-дерева. Для кожної молекули розраховувані молекулярні дескриптори, такі як кількість атомів, кількість зв’язків різного типу, молекулярна вага, кількість донорів та акцепторів водневих зв’язків, logP, кількість галогенових атомів, топологічна полярна поверхня (TPSA) та молекулярна рефракція.

Візуалізацію та маніпуляцію з фармакофорними моделями проводили за допомогою програми Discovery Studio Visualizer 4.0 (https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download).

Оптимізацію та валідацію фармакофорних моделей, конвертовано, проведено скринінг і рескоринг результатів проводили з використанням прогармного пакету PharmDeveloper (власна розробка співробітників

відділу біомедичної хімії Інституту молекудярної біології і генетики НАН України).

Під час валідації фармакофорних скринінгів ліганди оцінювали за значенням PDscore, який демонструє, на скільки ліганд відповідає фармакофорним точкам моделі. Чим точніше ліганд відповідає всім точкам – тим скор вищий. Крім цієї геометричної відповідності враховуються ваги точок. Якщо є співпадіння з точкою більшої ваги, то це дасть більший приріст скору, ніж співпадіння з точкою меншої ваги. Також важливою складовою цього скору є оцінка по QSAR на основі активних / неактивних лігандів з тестової вибірки (для цього програма формує таблицю спеціальних коефіцієнтів, до яких прирівнюються параметри досліджуваних лігандів.

PDscore розраховується за формулою:

$$S = K * \sum_i w(f_i) * S_{def}(f_i) * \frac{(t-d)}{t} \qquad (1)$$

де S – кінцевий скор, K – корегувальний коефіцієнт, $w(f_i)$ – вага фармакофорної точки, $S_{def}(f_i)$ – скор фармакофорної точки за умовчанням, t – радіус фармакофорної точки, d – відстань між фармакофорною точкою ліганда і моделі.

Розрахунок корегувального коефіцієнту. Спочатку розраховуються корегувальні коефіцієнти для кожного дескриптора згідно з формулою:

$$k(d) = \pm \frac{1 - dev(d)/aver(d)}{\sum_i 1 - \frac{dev(i)}{aver(i)}} \qquad (2)$$

Де k(d) – коефіцієнт коригування дескриптора, dev(d) – середнє відхилення, aver(d) – середнє значення, dev(i) і aver(i) – середнє відхилення і середнє значення дескриптора *i*.

Параметри дескриптора, такі як середнє відхилення, середнє значення та коригувальний коефіцієнт були додані до таблиці параметрів.

Схема для розрахунку коефіцієнта, на який буде помножено ваговий скор є наступною:

K = 1;

descr(i) > aver(i) – dev(i) Λ descr(i) < aver(i) + dev(i) ⟹ K := K + k(i) * 3;

descr(i) ≤ aver(i) – dev(i) ⋁ descr(i) ≥ aver(i) + dev(i) ⟹ K := K – k(i), де K – коефіцієнт, на який помножується ваговий скор, descr(i) – значення дескриптора *i* досліджуваного ліганда, aver(i) – середнє значення дескриптора, що був взятий із таблиці параметрів, k(i) – коригувальний коефіцієнт дескриптора, що був взятий із таблиці параметрів.

Сумарний скор оптимізованих фармакофорних моделей був розрахований згідно з формулою:

$$q = \frac{a}{a_{max}} + \frac{a/all}{(a/all)_{max}} + \frac{a_r/a}{(a_r/a)_{max}} \quad (3)$$

Де a – кількість активних сполук із валідаційного сета, що були ідентифіковані під час скринінгу щодо відібраної моделі, a_{max} – максимальна кількість активних сполук із валідаційного сета, знайдена під час скринінгу всіх згенерованих моделей, all - кількість усіх (активних та неактивних) сполук із валідаційного сета, ідентифікована під час скринінгу щодо відібраної моделі, $(a/all)_{max}$ – максимальне співвідношення активних сполук із валідаційного сета до загальної кількості сполук, ідентифікованих під час скринінгу серед усіх згенерованих моделей, a_r – кількість коректно знайдених активних сполук із валідаційного сету по відношенню до вибраної моделі, $(a_r/a)_{max}$ – максимальне співвідношення коректно знайдених активних сполук із валідаційного сета до загальної кількості сполук, ідентифікованих під час скринінгу всіх згенерованих моделей. Моделі сортували відповідно до скору і найкращі відбирали для основного скринінгу.

2.3. Побудова рецепторно-орієнтованої фармакофорної моделі

Рецепторно-орієнтовану фармакофорну модель інгібіторів PKCB будували за допомогою програми Discovery Studio Visualizer 4.0. Вона розроблялася на основі двох комплексів: PKCB з інгібітором бісіндолілмалеймід (PDB ID: 2I0E) та з інгібітором ANP800 (PDB ID: 3PFQ).

На основі міжмолекулярних зв'язків між інгібіторами і PKCB вкомплексах було побудовано первинну фармакофорну модель. Радіуси фармакофорних точок встановлювалися по замовчуванню: для ароматичних точок – 1,2 Å, для гідрофобних – 1 Å, для заряджених – 1 Å, для донорів і акцепторів водневого зв'язку – 0,9 Å.

Модель, побудовану в програмі Discovery Studio Visualizer 4.0 зберігали у форматі .CHM. За допомогою програми PharmDeveloper, проводили конвертацію файлів із формату *.CHM у формат *.QUERY. Також у PharmDeveloper фармакофорні точки моделі усереднювалися. Усереднювалися лише точки, що знаходилися на відстані не більше 0,5 Å.

Виключені об'єми конструювали за допомогою програми Discovery Studio Visualizer 4.0.

2.4. ***Опис тварин, що використовували для отримання циркулюючих нейтрофілів***

Всі процедури були виконані у відповідності до вимог Директиви Європейського союзу 2010/63/EU про захист тварин, що використовуються у наукових цілях та затверджені Комітетом Біомедичної Етики Інституту Фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України.

У експериментах *in vivo* було використано венозну кров дорослих самців кролів масою 6300±300 г та щурів лінії SHR (спонтанно-гіпертензивні щури) віком 16-20 місяців, вагою 375±20 г. Перед експериментами тварин утримували в стандартних умовах віварію

Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України при природній тривалості світлового дня та температурному контролі приміщення. Тварини утримувались на збалансованій дієті та мали необмежений доступ до їжі і води. Забір крові кролів проводився після 20 хв утримання тварини без стресу в спеціальній клітці, забір крові у щурів проводили безпосередньо після забою тварин.

2.5. Оцінка впливу речовин, підібраних методом молекулярного докінгу, на активність формування нейтрофільних екстрацелюлярних пасток

Забір крові проводили з використанням системи для забору крові S-Monovette Sarstedt, стабілізатор-антикоагулянт EDTA). Після забору проводили фракціонування отриманої крові з використанням методики центрифугування в градієнті перколу. Для цього стабілізовану натрієвою сіллю ЕДТА кров розводили 0.9 % розчином хлористого натрію в співвідношенні 1:1, після чого нашаровували на заздалегідь підготовлений градієнтний розчин перколу, який складався з 4 шарів з відносною густиною 72%, 63%, 54%, 45%. Вказані концентрації перколу одержували при змішуванні 9 частин перколу і 1 частини 10-кратного розчину Хенкса (pH 7.0), після чого необхідна густина досягалася шляхом розбавлення відповідною кількістю 0.9% розчину хлористого натрію. Центрифугування крові проводилося в два етапи: 1) при 400 g протягом 5 хв, після чого відбирався перший надосадовий шар, а відібраний об'єм компенсували додаванням еквівалентної кількості 0.9% розчину хлористого натрію; 2) 800 g протягом 15 хв, по завершенні якого відбувався відбір клітин між шарами густини 45% і 54% (моноцити), 54% і 63% (лімфоцити), 63% і 72% (нейтрофільні гранулоцити); 3) фракцію нейтрофільних гранулоцитів поміщали в пробірку та центрифугували при 1200 g протягом 5 хв.

Надосадові залишки градієнта перколу заміщували середовищем для культивування (RPMI-1640 Medium, Sigma-Aldrich), і обережно розводили в ньому осад. Після відмивання кількість отриманих клітин оцінювалася шляхом підрахунку в камері Горяєва, потім отримані нейтрофільні гранулоцити поміщали в плашки, на дні яких були заздалегідь підготовані скельця та середовище RPMI з розрахунку 800 мкл на лунку. Клітини висаджували на круглі скельця (d=12 mm) з розрахунку 140000-160000/см2, інкубували протягом трьох годин в термостаті при температурі 37ºС. Кожна проба крові поділялася на контрольну (для визначення спонтанного рівня, інкубація без впливів додаткових речовин) та індуковану, де до клітин, що інкубувалися, додавали активатор процесу утворення нейтрофільніх пасток (phorbol-12-myristate-13-acetate, Sigma-Aldrich).

Для оцінки активності процесів утворення нейтрофільних позаклітинних пасток використовували методику підрахунку клітин з подвійним забарвленням флуоресцентними барвниками. Для цього дослідне скло виймали з плашки, промивали PBS, додавали барвник Hoechst 33342 (10 мкл стокового розчину на 780 мкл PBS) та пропідіум йодид (1 мкл стокового розчину на 780 мкл PBS) і залишали на 10 хвилин в термостаті при температурі 37ºС). По закінченні часу ще раз промивали розчином PBS і проводили підрахунок на флуоресцентному мікроскопі Nikon Eclipse E200 використовуючи фільтр DAPI з фотофіксацією за допомогою камери DS-FI-1. На кожному склі підраховували по 500 клітин та визначали відсоток формування нейтрофільних пасток та інтактних нейтрофілів.

2.6. Визначення ефективності низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази С бета (PKCB) на утворення NETs

Ефективність дії специфічних інгібіторів протеїнкінази С β на активність процесів утворення нейтрофільних екстрацелюлярних пасток визначалася наступним чином: досліджувані речовини розводили в DMSO з отриманням розчинів концентрацією 1 мкМ. Лунки з виділеними нейтрофільними гранулоцитами (виділення за вищеописаною методикою) поділялися на три групи: контрольна (інтактні клітини), стимульована (нейтрофіли, що інкубували з phorbol-12-myristate-13-acetate, активатором NETозу), дослідна (нейтрофіли, що інкубувалися одночасно з phorbol-12-myristate-13-acetate та з досліджуваною речовиною – певним інгібітором протеїнкінази С β).

Інкубація тривала протягом трьох годин в термостаті при 37°С. Результатом дослідження був підрахунок активності NETозу в стимульованих нейтрофілах та зміни його активності за умов додавання досліджуваних речовин. За звітний період була проведена оцінка наступних речовин-можливих інгібіторів протеїнкінази С β.

2.7. ***Визначення ефективності і дозозалежності низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази С бета (PKCB) in vitro методом ферментного імуносорбентного аналізу***

Визначення активності протеїнкінази Cβ при дії інгібіторів проводили з використанням набору PKC Kinase Activity Kit (ab139437), який забезпечує простий нерадіоактивний і надійний метод кількісного визначення активності всіх ізоформ PKC в нативних, частково очищених лізатах або на чистому ферменті. Цей набір також використовується для скринінгу фармакологічних інгібіторів або активаторів ПКС. При цьому аналізі спеціальний синтетичний пептид використовується як субстрат, специфічний для ПКК. Цей субстрат, яким попередньо покриті лунки на мікропланшеті, фосфорилюється ПКК після додавання АТФ. Фосфорильований субстрат розпізнається

поліклональним антитілом, яке розпізнає лише фосфосубстрат. Згодом фосфоспецифічне антитіло розпізнається вторинним антитілом, яке кон'юговане HRP. Після інкубації із вторинними антитілами, додають розчин ТМБ (3,3`,5,5`-тетраметилбензидин), який розщеплюється пероксидазою хріна та набуває кольору. Фосфорилювання субстрату та колір ТМВ розвиваються пропорційно активності ПКС, яка є у зразку. Процес розвитку кольору припиняється кислотою (Stop solution), а інтенсивність кольору вимірюється в умовних одиницях за допомогою мікропланшетного рідера при OD 450 нм, контрольнім показником, який віднімається від даної оптичної щільності є щільність виміряна при довжині хвилі 630 нм. Оптична густина в контрольній лунці з інтактним ферментом приймається за 100%.

2.8. ***Оцінка кардіотоксичності відібраних сполук на культурі кардіоміоцитів***

Виділення неонатальних кардіоміоцитів. Шляхом цервікальної дислокації щури знерухомлювалися та анестезувалися. Після цього через передній поздовжній розріз виймалося серце. Шлуночки відокремлювалися від передсердь і двічі відмивалися у стерильному буферному сольовому розчині (pH 7,4) наступного складу: HEPES – 20 ммоль/л, KCl – 5,4 ммоль/л, NaCl – 116,4 ммоль/л, глюкоза – 5,5 ммоль/л, Na_2HPO_4 – 0,4 ммоль/л та K_2HPO_4 – 0,4 ммоль/л. Після цього вони механічно подрібнювалися ножицями до отримання шматочків тканини розміром близько 1мм^3. Ці шматочки міокарду підлягали ферментативному розщепленню у середовищі виділення, яке на основі зазначеного буферу містило колагеназу II типу (95 ОД/мл) та панкреатин (0,6 мг/мл). Перетравлення відбувалося у п’ять циклів по десять хвилин кожний. Під час цього процесу шматочки міокарду перемішувалися у середовищі виділення за допомогою магнітного перемішувача. Після кожного з циклів шматочкам міокарду давали осісти,

а надосадове середовище зливали. Починаючи з третього циклу, шматочки міокарду додатково підлягали процесу механічного суспендування шляхом піпетування, після чого середовище виділення збиралося у пробірку. Клітини осаджувалися шляхом центрифугування при 400 g протягом 60 с, після чого клітини ресуспендувались у живильному середовищі культивування такого складу: середовище Ігла в модифікації Дюльбекко (DMEM), середовище 199 (співвідношення DMEM/199 - 4:1), теляча сироватка - 8%, Na_2CO_3 – 4,2 ммоль/л, HEPES - 15 ммоль/л та антибіотики (стрептоміцин – 100 мкг/мл, гентаміцин – 0,05 мг/мл, пеніцилін – 100 ОД/мл). Кількість живих та загиблих клітин визначали за допомогою методу фарбування клітин 0,2 % розчином трипанового синього. Отримані клітини саджали на 96-лункові планшети (20 тисяч клітин на лунку) та інкубували з доксорубіцину гідрохлоридом (Sigma Aldrich) в середовищі DMEM+199 48 годин Культивування проводили у живильному середовищі вищезазначеного складу при 37°С у газовому середовищі, яке містило 5% CO^2 та 95% атмосферного повітря.

МТТ-тест. Для кількісної оцінки кардіотоксичності відібраних речовин, використовували МТТ-тест (MTT Protocol, Wallertand Provost Lab), котрий базується на здатності живих клітин перетворювати блідо-жовтий водорозчинний 3-(4,5-диметилтіазолін-2)-2,5-дифенілтетразолійбромід (МТТ) в блакитні кристали формазану (МТТ-ф), нерозчинні у воді. Кількість утвореного формазану визначали колориметричним методом після його розчинення в органічних розчинниках. Через добу в кожну лунку додавали по 20 мкл стокового розчину МТТ (5 мг МТТ (Sigma Aldrigh) на 1 мл PBS) та інкубували 4 години. Результат оцінювали шляхом вимірювання на спектрофотометрі CFEX-45 ColorFlex (Hunter Lab Inc, США) оптичної щільності лізату в лунках, отриманого за допомогою додавання в кожну лунку по 200 мкл DMSO, при довжині хвилі 570 нм.

2.9. Моделювання ГРДС на щурах лінії SHR

Для досліджень було відібрано 40 щурів-самців лінії SHR отриманих із лабораторії Charles River (США). віком 16-20 місяців, середня вага 375±23 г. Наявність артеріальної гіпертензії було підтверджено за допомогою неінвазивного приладу CODA monitor. В дослідження відібрали тварин з наступним тиском: Systolic 190 ± 17,62 мм рт.ст, Diastolic 133,7 ± 22,7 мм рт. ст.

Вони випадково були розподілені на 4 групи: 1. SHAM (вдаване втручання) 10 тварин, 2. ГРДС, 10 тварин 3. ГРДС + введення 1мкМ речовини 146528 (10 тварин) 4. ГРДС + введення 1 мкМ речовини 963975 (10 тварин).

Тварин анестезували (уретан, 1,5 г / кг), вставляли трахеостому (19fr тупа Луєр канюля) та підключали до апарату FlexiVent. У яремну вену вставляли венозний катетер, який використовували для введення NaCl (групи 1 та 2), або блокаторів РКСВ (групи 3 та 4). Відібрані для дослідження *in vivo* речовини (146528 та 963975) вводили у дозі 1мкМ (розведені у 100 мкл NaCl) у венозний катетер за 10 хвилин до початку введення PolyI:C (щури групи 3 та 4). Щурам групи 1 та 2 (SHAM та ГРДС) вводили той самий об’єм фізіологічного розчину.

Тварини підтримувалися за температури 37°С і при дії міорелаксанту (Atracurium-Novo, Novopharm Biosynthes, Україна).

Моделювання гострого респіраторного дистрес синдрому проводили шляхом поєднання інтратрахеального введення PolyI:C та наступної гіпервентиляції протягом 4-х годин.

PolyI:C вводили в дозі 30 мг/кг, попередньо розчинивши його у 300 мкл фізіологічного розчину. Розпилення відбувалося протягом 10 хвилин із зволоженням 20% (в контрольній групі розпилювали фізіологічний розчин

за аналогічним протоколом) ультразвуковим розпилювачем (Aeroneb Pro, ANP-1100, Aerogen Ltd, Irland) через струс порт респіратора. Дані молекули імітують вірусну пневмонію і, таким чином, наближають дану модель до ГРДС, яка розвивається при COVID-19.

Одразу після введення PolyI:C вмикали протокол прецизійної гіпервентиляції та проводили її протягом 4 годин із такими параметрами: частота вентиляції 90 разів/хв, tidal volume 35 ml/kg (у групі SHAM 10 ml/kg, дихальний об'єм в перерахунку на масу щура), Peep 0 мм (у групі SHAM 2 мм.в.ст., позитивний тиск на кінець видиху, попереджає (в групі SHAM) або збільшує пошкодження легень), Pmax 30 мм.в.ст. (обмеження по максимальному тиску під час вдиху).

2.10. ***Оцінка набряку легень***

Вміст рідини в легенях, пов'язаний з пошкодженням легень, вимірювали, використовуючи співвідношення ваги вологих легень до сухих. Ліві нижні відділи легень зважували одразу після видалення (мокра маса, wet) і знову зважували після сушіння в духовій шафі при 60°C протягом 72 год (суха маса, dry). Співвідношення ваги легкого і сухого розраховували як відношення вологої ваги до сухої ваги. Таким чином оцінювали ступінь набряку легень, чим більше цей показник, тим більше набряк.

2.11. ***Вимірювання вмісту білку в бронхолегеневому лаважі (БАЛ)***

Бронхоальвеолярне промивання проводили двічі з використанням 1 мл фізіологічного розчину. Отриману рідину центрифугували при 1500 об/хв протягом 10 хв (при 4°C), а надосадову рідину зберігали при –80 ° C до аналізу. Вимірювання загальної концентрації білку у БАЛ було проведено на приладі Nanodrop 1000 у відповідності до інструкції**.**

2.12. ***Вимірювання концентрації вільної ДНК у бронхоленевому лаважі та плазмі крові.***

Концентрація вільної ДНК була виміряна у плазмі крові на спектрофотометрі Hitachi4000 за допомогою набору для тестування dsDNA Quant-iT PicoGreen (Invitrogen).

Побудова калібрувальної кривої. Для приготування калібрувальної кривої використовувалась стандартна лямбда-ДНК, що надається зі 100 мкг/мл у наборах Quant-iT ™ PicoGreen®. Для отримання концентрації робочого розчину 2 мкг/мл її розводили в 50 разів ТЕ буфером. Концентрацію ДНК підтверджували на хвилі поглинання 260 нм (А260) в кюветі з довжиною шляху 1 см. А 260 0,04 відповідає 2 мкг/мл розчину дволанцюгової молекули ДНК. Стандартну криву створювали в п'яти точках з концентраціями від 1 нг/мл до 1 мкг/мл, потім додавали 1,0 мл робочого водного розчину реагенту Quant-iT™PicoGreen® (після попереднього розведення стокового розчину у 200 разів) до кожної кювети.

Одразу після забору венозної крові проводили центрифугування протягом 10 хв при 1,5 тис g для розділення формених елементів та плазми. Плазму крові вносили у кювети для спектрофлуориметра, додавали 1,0 мл водного робочого розчину реагенту Quant-iT ™ PicoGreen® до кожної кювети. Добре перемішували та інкубували протягом 2–5 хв при кімнатній температурі в темноті. Вимірювали флюоресценцію на таких довжинах хвиль: збудження ~ 480 нм, випромінювання ~ 520 нм. Перерахували концентрацію вільної ДНК у пробах, використавши побудовану калібрувальну криву. Проби з ДНК внести у кювети для спектрофлуориметра, додати 1,0 мл водного робочого розчину реагенту Quant-iT ™ PicoGreen® до кожної кювети. Добре перемішати та інкубувати протягом 2–5 хв при кімнатній температурі в темноті. Виміряти

флюоресценцію на таких довжинах хвиль: збудження ~ 480 нм, випромінювання ~ 520 нм. Перерахувати концентрацію вільної ДНК у пробах використавши побудовану калібрувальну криву.

2.13. Вимірювання рівню цитокінів

Для вимірювання кількості Il-1beta, Il-6, Il-10 та TNF-alpha використовували метод прямого імуноферментного аналізу. При цьому антиген пасивно приєднується до пластичної твердої фази за період інкубації. Після етапу промивання антиген виявляється шляхом додавання спочатку первинного антитіла, а потім вторинного антитіла, ковалентно зв'язаного з ферментом. Після інкубації та промивання в плашку додається хромоген/субстрат, завдяки чому активність ферменту викликає зміну кольору. Кольорова реакція зупиняться через певний час, а інтенсивність кольору зчитується на спектрофотометрі.

2.14. Визначення експресії генів, що кодують цитокіни

Визначення кількості матричних РНК генів, що кодують хемокіни та цитокіни (TNFalpha, Il-6, Il-10 тощо) проводили у тканинах легень методом Real-time PCR з використанням флюоресцентномічених зондів.

Виділення РНК з тканин легень. Для виділення тотальної РНК з клітин зразків була використана гуанідин ізотіоцианат-фенол-хлороформна екстракція з використанням реагенту Trizol (Invitrogen). Виділені зразки РНК розводили у 50 мкл дистильованої води, після чого вимірювали концентрацію РНК та оцінювали чистоту спектрофотометричним методом (NanoDrop ND1000).

Зворотна транскрипція. Спочатку готувалася реакційна суміш, яка містила 1 мкл Random Hexamer primer, 5 мкл очищеної від нуклеаз деіонізованої H_2O та 6 мкл тотальної РНК. Отримані зразки інкубували при температурі 70 °С впродовж 5 хв на ампліфікаторі Gene Amp®PCR System 2700, виробництва Applied Biosystems, США. На другому етапі до суміші додавали 2 мкл dNTP (^{x}10), 4 мкл Buffer RT, 0,5 мкл RiboLock RNAse inhibitor та 1 мкл RevertAid H Minus Reverse Transcriptase. Отримані зразки термостатували при 42°С протягом 60 хв., після чого інкубували при 70°С впродовж 10 хв.

Полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі. ПЛР у реальному часі проводилася з використанням приладу 7500 Fast Real Time PCR від Applied Biosystems (США). Для здійснення ПЛР у 96-лунковий планшет вносили по 10 мкл суміші із 5 мкл TaqMan Universal PCR Master Mix, 0,15 мкл зонду для кожного окремого гену (TNFα, IL-6, IL-10) 0,2 мкл Rox (1:9), 2,65 мкл H_2O та по 2 мкл кДНК. Денатурацію кДНК проводили за температури 95°С протягом 15 с. Приєднання зонду та елонгація здійснювалася за температури 60°С протягом 1 хв. Реєстрацію флуоресценції проводили кожного циклу під час етапу елонгації. Програма ПЛР у реальному часі складалася із 50 циклів.

2.15. Світова мікроскопія

Для оцінювання структурних змін в тканинах легень у експериментальних тварин, що перебували в умовах штучної вентиляції легень із загальноприйнятим об`ємом – 10 мл/ кг на фоні інтратрахеального введення фізіологічного розчину n = **5** та в режимі гіпервентиляції на фоні інтратрахеального введення Poly I:C (n=9) ізолювалася інфракардіальна та каудальна долі правої легені легені щурів Тканини легень фіксувалися в 10% забуференому формаліні з подальшою заливкою

в парафін та порізкою парафінових зрізів товщиною 7 мкм. Парафінові зрізи фарбувалися гематоксилін-еозином та вивчалися на мікроскопі Nikon Eclipse E200, зображення фіксувалися за допомогою камери Nikon DS-Fi1.

Для об'єктивного визначення стану компонентів тканини легень при різних впливах були включені загальноприйняті методи оцінювання їх геометричних параметрів.

Були проаналізовані наступні морфометричні показники: для оцінювання респіраторного відділу легень визначались об'єм альвеолярного простору та міжальвеолярних перегородок по відношенню до площі, що досліджувалась у відсотках. Для оцінювання стану повітроносних шляхів в поперечних зрізах бронхіол, визначались площа простору обмеженого базальною мембраною бронхіального епітелію, включаючи просвіт бронхіоли, (Abm), зовнішньою межею гладкої мускулатури (Amo) і зовнішньою адвентиціальною межею (Ao) . Наступні параметри були розраховані, базуючись на отриманих у результаті вимірів даних: загальна площа стінки бронхіоли, за виключенням площі просвіту (WAt = Ao - Abm), площа внутрішньої області стінки бронхіоли (слизова оболонка), за виключенням площі просвіту бронхіоли (WAi = Amo – Abm) та площа зовнішньої області стінки бронхіоли (підслизова оболонка) (WAo = Ao – Amo). Отримані показники, в свою чергу дозволили визначити площу окремих зон стінки бронхіоли як відсоток від загального простору, а саме: площу внутрішньої області стінки від загальної площі бронхіоли, включаючи просвіт у відсотках- %TAi; площу зовнішньої області стінки бронхіоли від загальної площі бронхіоли, включаючи просвіт у відсотках-%TAo; тотальну площу стінки бронхіоли (слизова та підслизова оболонка) по відношенню до загальної площі бронхіоли, включаючи просвіт – %TAt. А також відсоток площі внутрішньої області стінки бронхіоли (слизової оболонки) від загальної площі бронхіоли без урахування площі просвіту – %Wai та відсоток площі

зовнішньої області стінки бронхіоли від загальної площі стінки бронхіоли без урахування площі просвіту – %Wao. (1, 2) Показник %Wab і демонструє динаміку змін площі просвіту бронхіоли. Аналізувались поперечні зрізи бронхіол з діаметром до 0,5 мм, в яких відношення меншого діаметру до більшого діаметру не перевищувало значення 0,5 (це свідчило про те, що зріз бронхіоли є поперечним).

Також морфометрично були проаналізовані товщина міжальвеолярних перегородок та об'єм повітряного простору альвеол.

Морфометричне оцінювання проводилося із використанням програмного забезпечення ImageJ.

2.16. Імуногістохімічні дослідження

Для виявлення рівнів інфільтрації активованими нейтрофілами паренхіми легень тварин, задіяних у експерименті, застосовувався імуногістохімічний метод подвійного мічення. Виявляли маркерний білок нейтрофілів – мієлопероксидаза (anti-MPO Antibody (8F4) Novus Cat/N NBP1-51148)) та маркер активації утворення нейтрофільних позаклітинних пасток (NETs) - цитрулінований гістон H3 (Anti-Histone H3 (citrulline R17) antibody Abcam Cat/N ab219407). Після депарафінізації та регідратації зрізи, товщиною 4 мкм інкубували в цитратному буфері (pH 6.0) при 90◦C протягом 40 хв для демаскування епітопів та блокуючому буфері, в склад якого були включені 3% BSA та 10% козячої сироватки протягом 1 год при кімнатній температурі. Первинні антитіла розводились в буфері, що містив 0,3% BSA та 0,1% Triton-X100. Інкубація зрізів в розчині вищезгаданих первинних антитіл проводилась при кімнатній температурі протягом 2 год. Для візуалізації реакції зв'язування первинних антитіл із відповідним білком використовувались вторинні антитіла мічені Alexa 596 для мієлопероксидази та Alexa 488 для цитрулінованого гістону (H3)

Матеріал аналізувався за допомогою конфокального мікроскопу FV1000-BX61WI (Olimpus, Japan)

Цитрулінований гістон Н3 | Мієлопероксидаза | Композит

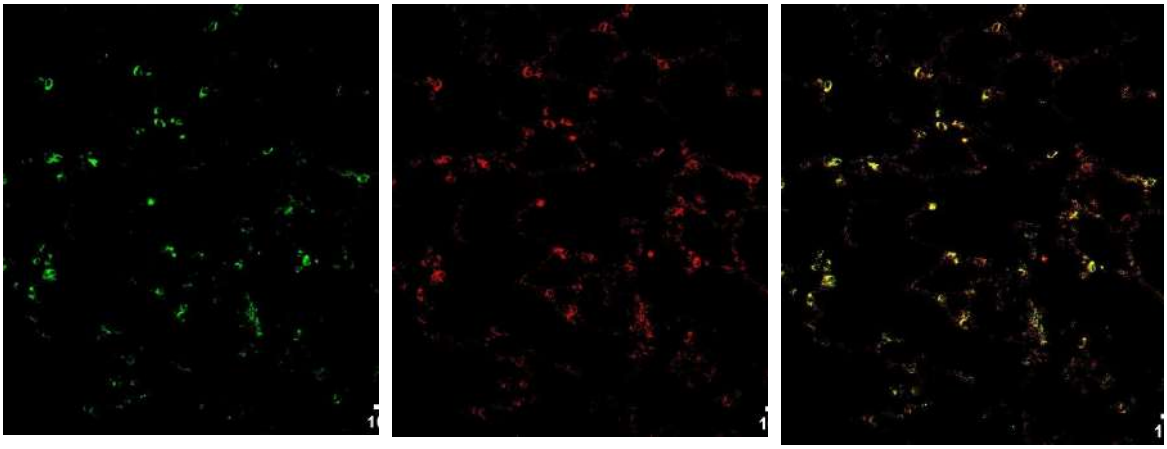


Рисунок 2.2 – Іммуногістохімічне виявлення нейтрофілів в паренхімі легені щура. Нейтрофіли, які містять маркерний білок мієлопероксидазу (червоний) та цитрулінований гістон Н3 (зелений), знаходяться в процесі формування нейтрофільних позаклітинних пасток.

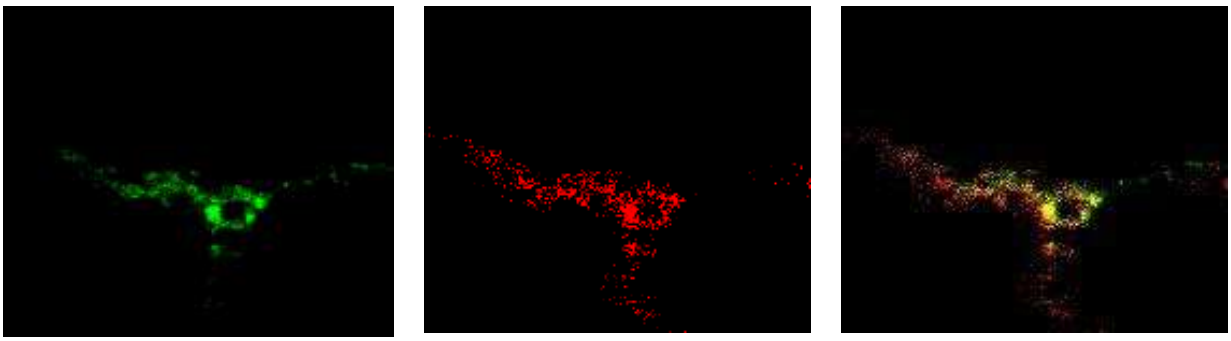


Рисунок 2.3 – Деталізована ділянка Рисунок 2.2. Нейтрофіл, який сформував позаклітинну пастку.

3 РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Раціональний дизайн інгібіторів PKCB

Для розробки нових інгібіторів протеїнкінази С бета було застосовано ряд методів молекулярного моделювання, а саме: рецепторно-орієнтоване фармакофорне моделювання, ліганд-орієнтоване фармакофорне моделювання, молекулярний докінг та алгоритми машинного навчання.

3.1.1. Підготовка скринінгової колекції сполук, навчальних та тестових вибірок для фармакофорного моделювання

Для фармакофорного скринінгу використано колекцію сполук відділу біомедичної хімії, що налічувала більше 150 тис. сполук. Цю скринінгову колекцію конвертовано в базу зі структурою KDB-дерева.

Для підготовки навчальної і тестової вибірок були відібрані структури всіх відомих інгібіторів протеїнкінази PKCB із бази даних ChEMBL та з літературних джерел. Всього було одержано 731 сполуки.

Всі фармакофорні моделі потребують оптимізації і валідації. Для цього з відомих інгібіторів PKCB було видалено навчальні інгібітори і поділено їх на активні і не активні. Катоф активності становив 50 nM. Активних лігандів було 309, не активних – 409.

Для побудови ліганд-орієнтованих фармакофорних моделей із навчальної вибірки бралися лише 13 найактивніших інгібіторів PKCB з різних хімічних класів. Ще один ліганд – бісіндолілмалеймід з комплексу з PKCB (PDB ID: 2I0E) без зміни координат, виступав в ролі сполуки-штифта. Таким чином всі моделі базуються на цьому кристалі, але являються ліганд-орієнтованими.

3.1.2. Побудова діганд-орієнтованих фармакофорних моделей інгібіторів PKCB

Для розробки первинної фармакофорної моделі інгібіторів протеїнкінази PKCB за основу було взято просторову структуру каталітичної субодиниці із інгібітором бісіндолілмалеймід з бази даних PDB (ID: 2I0E).

Всі ароматичні кільця двох індольних і малеймідного фрагментів інгібітора бісіндолілмалеймідy утворюють низку гідрофобних взаємодій із амінокислотними залишками АТФ-зв'язувального сайту протеїнкінази PKCB (Ala369, Val356, Leu348, Val423 та Ala483). Ці взаємодії було відтворено згенерувавши п'ять ароматичних точок без направлених векторів з центрами в геометричних центрах ароматичних кілець інгібітора із стандартними радіусами 1,1 Å. Метильний замісник на одному з індолів утворює гідрофобні взаємодії з Met473 та Ala483, тому було побудовано гідрофобну точку на цьому замісникy. Радіус встановлено 1 Å. Було згенеровано два акцептори водневого зв'язку на кето-групах малеймідy, якому відповідають водневі зв'язки з Val423 та Thr404. Також було побудовано донор водневого зв'язку на атомі нітрогену малеймідy, якому відповідає водневий зв'язок з Glu421. Також було побудовано донор на аміні, якому відповідає водневий зв'язок з Asp470. Радіуси акцепторів і донорів було встановлено 0,91 Å (Рисунок 3.1, 3.2).

Додатково фармакофорну модель доповнено виключеними об'ємами. Було вибрано всі атоми активного центру протеїнкінази PKCB в радіусі 5 Å та згенеровано для них виключені об'єми. Такі виключені об'єми роблять модель значно точнішою – вони не дозволяють вибирати сполуки при скринінгу, що потенційно будуть перекриватися з амінокислотними залишками активного центру. Таким чином, відібрані сполуки будуть максимально відповідати по об'єму та формі АТФ-зв'язувальному центру.

Таким чином, оболонка із виключених об’ємів фактично імітує активний сайт рецептора. Радіус виключених об’ємів був встановлений 1.2 Å, що відповідає Ван-дер-Ваальсовому радіусу атома Гідрогена.

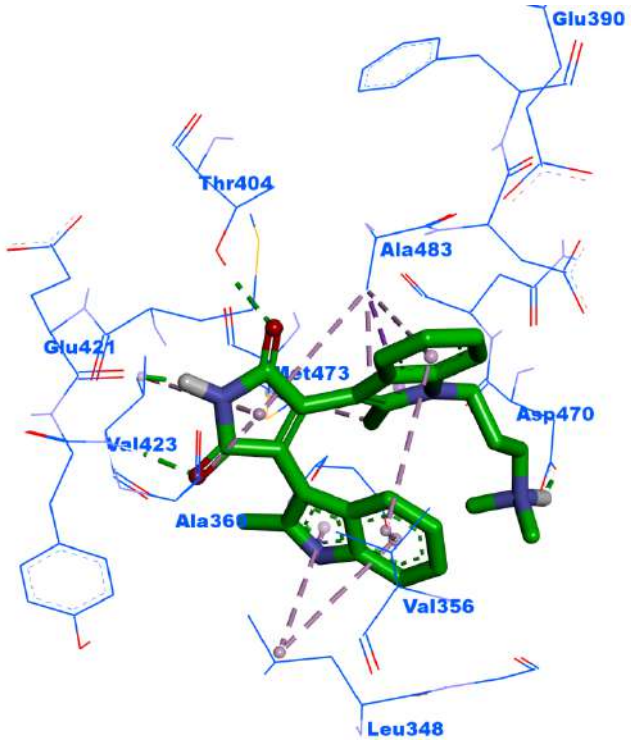


Рисунок 3.1 – Взаємодії інгібітора бісіндолілмалейміду із амінокислотними залишками АТФ-зв’язувального сайту PKCB. Зеленими пунктирними лініями показано водневі зв’язки, фіолетовими – гідрофобні.

В результаті первинна фармакофорна модель, яка була використана для комбінування, містила десять фармакофорних точок – п’ять ароматичних без направлених векторів, одну гідрофобну два акцептори водневого зв’язку, два донори водневого зв’язку і 158 виключених об’ємів (Рисунок 3.2).

Щоб побудовану модель зробити ліганд-орієнтованою до веб-серверу PharmaGist було завантажено інгібітор бісіндолілмалеймід з комплексу з PKCB (сполука-штифт) і 13 відомих інгібіторів цього ензиму з найвищою інгібувальною активністю (IC_{50} до 4,7 nM). З даних, отриманих з PharmaGist

брали попарні суперпозиції вхідних лігандів до сполуки-штифта (бісіндолілмалеймід). Ці попарні суперпозиції лігандів було використано далі для визначення ваг фармакофорних точок. Вага вказує на важливість фармакофорної точки, визначає її внесок у скор при скринінгу і відповідає кількості лігандів, що співпали з цією точкою. Ваги точок приведені в таблиці 3.1.

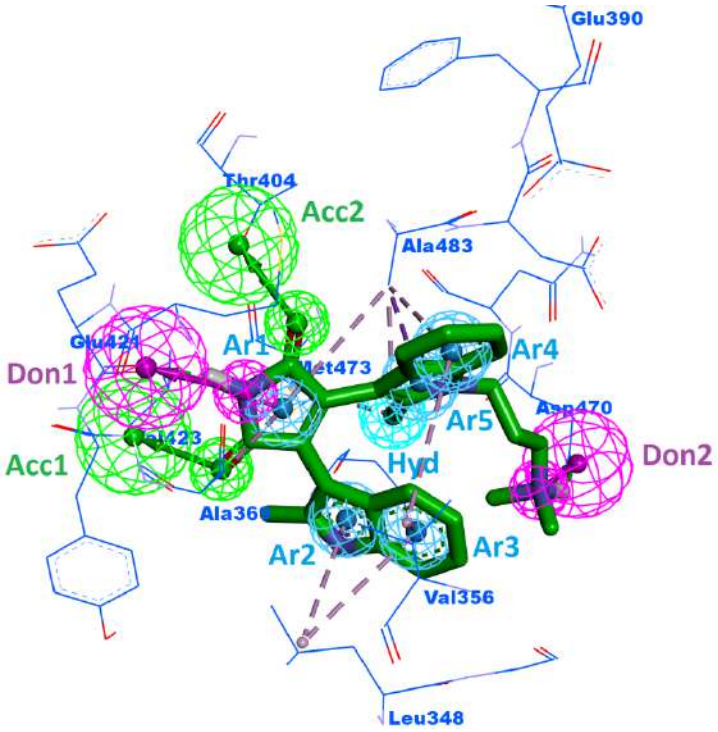


Рисунок 3.2 – Первинна фармакофорна модель інгібіторів протеїнкінази PKCB, яка була використана для комбінування. Синім кольором позначені ароматичні точки без вектора, блакитним – гідрофобну точку, зеленим – акцептори водневого зв'язку, малиновим – донори водневого зв'язку, виключені об'єми не візуалізувалися для ясності зображення, так як їх велика кількість закриває саму модель.

Таблиця 3.1 – Ваги фармакофорних точкок первинної фармакофорної моделі інгібіторів протеїнкінази PKCB

Фармакофорна точка	Acc1	Acc2	Don1	Don2	Ar1	Ar2	Ar3	Ar4	Ar5	Hyd
Вага	7	7	9	5	9	7	4	9	6	3

Первинну модель було комбіновано. Було дев’ять напрямів по комбінуванню. Для комбінування вказувалася кількість фармакофорних точок в дочірніх моделей, що отримувались під час комбінування в кожному напрямі, а також параметри точок і груп точок. Певні точки могли бути відсутніми, обов’язковими або в групі. З групи отримувалася спеціально вказана кількість точок. У восьмому і дев’ятому напрямі ароматичні точки додатково змінювалися на гідрофобні. Параметри і результати комбінування приведені в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2 – Параметри і результати комбінування первинної фармакофорної моделі інгібіторів протеїнкінази PKCB

Номер вхідної моделі	1	2	3	4	5	6	7	8	9
К-ть точок в дочірніх моделях	5	5	6	6	5	5	5	5	5
К-ть дочірніх моделей	24	24	24	24	24	24	16	24	24
Acc1	g1-1	g1-1	g1-2	g1-2	g1-2	g1-2	g1-1	g1-2	g1-2
Don1	g1-1	g1-1	g1-2	g1-2	g1-2	g1-2	n	g1-2	g1-2
Acc2	g4-1	g1-1	g1-2	g1-2	g1-2	g1-2	g1-1	g1-2	g1-2
Ar1	n	n	n	n	-	-	n	n	n (Hyd)
Ar2	g2-1	g2-1	g2-1	g2-1	g2-1	g2-1	g2-1	g2-1 (Hyd)	g2-1 (Hyd)
Ar3	g2-1	g2-1	g2-1	g2-1	g2-1	g2-1	g2-1	g2-1 (Hyd)	g2-1 (Hyd)
Ar4	g3-1	g3-1	g3-1	g3-1	g3-1	g3-1	g3-1	g3-1 (Hyd)	g3-1 (Hyd)
Ar5	g3-1	g3-1	g3-1	g3-1	g3-1	g3-1	g3-1	g3-1 (Hyd)	g3-1 (Hyd)
Hyd	g4-1	g4-1	g4-1	g1-2	g4-1	g1-2	g1-1	g1-2	g1-2
Don2	g4-1	g4-1	g4-1	n	g4-1	n	g1-1	-	-

Примітки: n – обов’язкова точка; g – група точок, перше число в групі – номер групи, друге – кількість точок, що має отриматися з групи; (Hyd) – ароматична точка змінена на гідрофобну.

Таким чином було отримано 208 дочірніх фармакофорних моделей. Їх сконвертовано у формат .QUERY. Потім був проведений ініціюючий скринінг. 19 моделей з п'яти напрямів (2, 5, 6, 8, 9) його пройшли – вони знаходили інгібітори PKCB.

Наступним кроком була оптимізація цих фармакофорних моделей. На першому етапі проєкту було опрацьовано моделі напряму 2. Цих вхідних моделей було дві. З кожної формувалася величезна множина похідних дочірніх моделей з різними параметрами. Здійснювали три ітерації оптимізації радіусів та скору з кроком = 0,1 та 0,2 відповідно для кожного параметра. Серед них відібрано 4 моделі (табл. 3.3), яка найкраще знаходили активні сполуки з тестової вибірки. Всі чотири моделі (Рисунок 3.3) успішно пройшли валідацію відносно тестової вибірки – вони ідентифікують активні інгібітори з тестової вибірки, відсоток правильно знайдених сполук становить більше 60%.

Таблиця 3.3 – Параметри валідованих фармакофорних моделей інгібіторів протеїнкінази PKCB по напряму 2

Модель	Тип фарм. точки	X	Y	Z	Вага	R, Å
PKCb_2-5combf-22_624_m	Ar	35,931	56,396	36,851	9	1,3
	Don	43,733	52,253	32,494	5	1,3
	Ar	36,269	55,762	31,754	9	1,7
	Ar	40,551	57,41	34,807	4	1,7
	Acc	33,013	54,595	36,115	7	1,2
PKCb_2-5combf-22_625_m	Ar	35,931	56,396	36,851	9	1,3
	Don	43,733	52,253	32,494	5	1,3
	Ar	36,269	55,762	31,754	9	1,7
	Ar	40,551	57,41	34,807	4	1,7
	Acc	33,013	54,595	36,115	7	1,3
PKCb_2-5combf-23_372	Ar	35,931	56,396	36,851	9	1,3
	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,2

	Ar	37,38	54,957	33,464	6	1,7
	Ar	40,551	57,41	34,807	4	1,7
	Acc	33,013	54,595	36,115	7	1
PKCb_2-5combf-23_1112	Ar	35,931	56,396	36,851	9	1,4
	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,3
	Ar	37,38	54,957	33,464	6	1,7
	Ar	40,551	57,41	34,807	4	1,5
	Acc	33,013	54,595	36,115	7	1

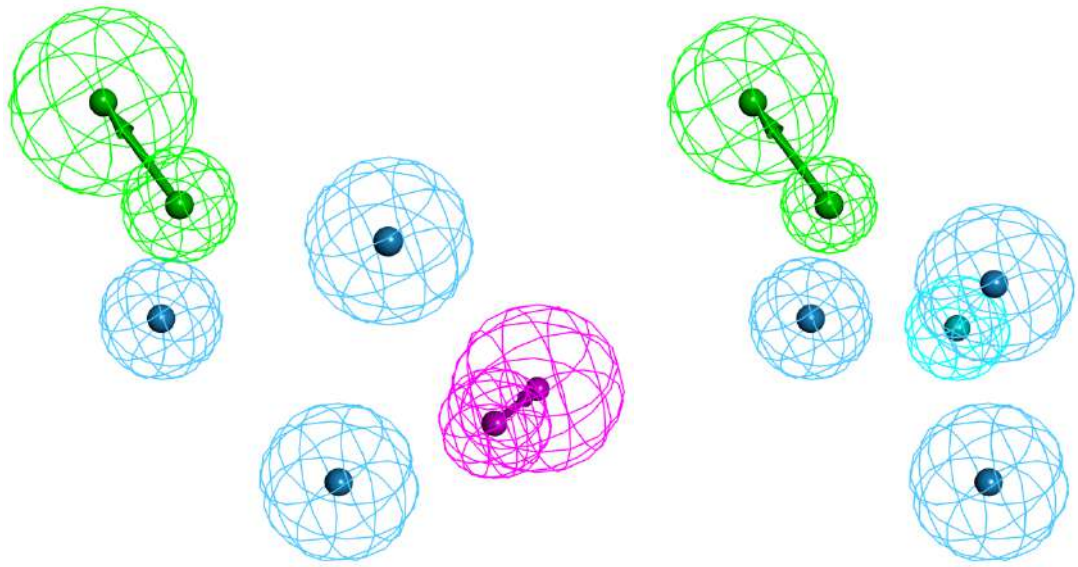


Рисунок 3.3 – Валідовані ліганд-орієнтовані фармакофорні моделі інгібіторів протеїнкінази PKCB (зліва – PKCb_2-5combf-22_624_m, справа – PKCb_2-5combf-23_372), які були використані для фармакофорного скринінгу. Синім кольором позначені ароматичні точки без вектора, блакитним – гідрофобну точку, зеленим – акцептори водневого зв'язку, малиновим – донори водневого зв'язку, виключені об'єми не візуалізувалися для ясності зображення. Моделі PKCb_2-5combf-22_625_m і PKCb_2-5combf-23_1112 не приводяться, так як вони візуально майже ідентичні до зображених моделей PKCb_2-5combf-22_624_m і PKCb_2-5combf-23_372 відповідно.

Для пошуку інгібіторів протеїнкінази PKCb було проведено фармакофорний скринінг бібліотеки низькомолекулярних органічних сполук, що налічувала більше 150000 молекул відносно розроблених чотирьох моделей. Відповідно до значень середньоквадратичного відхилення (RMSD, Å), PDscore та візуального аналізу сполук за співпадінням із фармакофорними моделями, було відібрано 4120 сполук.

3.1.2.1. ***Оптимізація ліганд-орієнтованих фармакофорних моделей інгібіторів PKCB та фармакофорний скринінг з їх використанням***

На першому етапі роботи (21.10.2020 – 15.12.2020) було отримано первинну ліганд-орієнтовану модель. Її було створено комбінацією фармакофорів 13 відомих інгібіторів PKCb. На основі аналізу цієї моделі було впроваджено дев’ять напрямів оптимізації. Оптимізація проводилась за комбінаторним принципом. Для комбінування вказувалася кількість фармакофорних точок в дочірніх моделей, що отримувались під час комбінування в кожному напрямі, а також параметри точок і груп точок. Певні точки могли бути відсутніми, обов’язковими або в групі. З групи отримувалася спеціально вказана кількість точок. У восьмому і дев’ятому напрямі ароматичні точки додатково змінювалися на гідрофобні.

Було отримано 208 дочірніх фармакофорних моделей. Після ініціюючого скринінгу лишилося 19 моделей з п’яти напрямів (2, 5, 6, 8, 9) – вони знаходили інгібітори PKCB. Було опрацьовано моделі напряму 2.

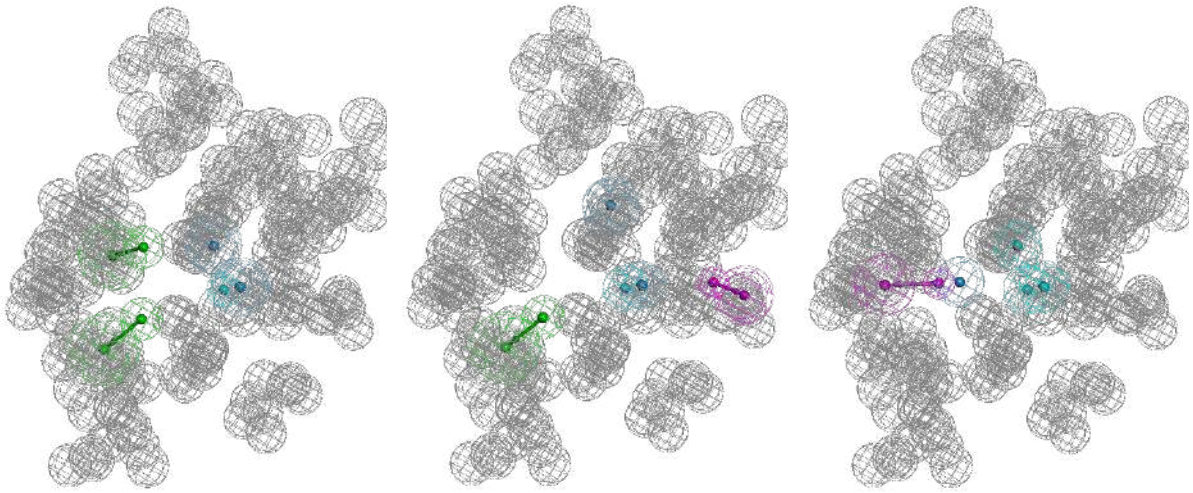
На цьому етапі проєкту було оптимізовано моделі напрямів 5, 6, 8, 9. Цих вхідних моделей було 17. З кожної формувалася величезна множина похідних дочірніх моделей з різними параметрами. Здійснювали три ітерації оптимізації радіусів та скору з кроком = 0,1 та 0,2 відповідно для кожного параметра. Серед них відібрано 58 моделі (Додаток А, приклад моделей таблиця 3.4), які найкраще знаходили активні сполуки з тестової

вибірки. Всі моделі (Рисунок 3.4) успішно пройшли валідацію відносно тестової вибірки – вони ідентифікують активні інгібітори з тестової вибірки, відсоток правильно знайдених сполук становить більше 60%.

Таблиця 3.4 – Параметри валідованих фармакофорних моделей інгібіторів протеїнкінази PKCB по напрямах 5, 6, 8, 9

Модель	Тип фарм. точки	X	Y	Z	Вага	R, Å
PKCb_5-5combf-15_256_m	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1
	Ar	37,38	54,957	33,464	6	1,6
	Ar	40,551	57,41	34,807	4	1,6
	Acc	36,571	57,457	38,996	7	1,2
	Acc	34	55,532	35,483	7	1,2
PKCb_6-5combf-11_208_m	Don	43,058	53,583	32,651	5	0,9
	Ar	36,269	55,762	31,754	9	1,6
	Ar	40,551	57,41	34,807	4	1,3
	Acc	36,571	57,457	38,996	7	1,2
	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,3

PKCb_8-5combf-20_1230_m	Ar	35,931	56,396	36,851	9	1,4
	Hyd	37,38	54,957	33,464	6	1,4
	Hyd	40,551	57,41	34,807	4	1,4
	Don	34,967	56,551	37,469	9	0,9
	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,4



а *б* *в*

Синім кольором позначені ароматичні точки без вектора, блакитним – гідрофобну точку, зеленим – акцептори водневого зв'язку, малиновим – донори водневого зв'язку, сірим – виключені об'єми.

Рисунок 3.4 – Приклади оптимізованих та валідованих ліганд-орієнтованих фармакофорних моделей інгібіторів протеїнкінази PKCB (*а* – PKCb_5-5combf-15_256_m, *б* – PKCb_6-5combf-11_208_m, *в* - PKCb_8-5combf-20_1230_m), які були використані для фармакофорного скринінгу.

Для пошуку інгібіторів протеїнкінази PKCb було проведено фармакофорний скринінг бібліотеки низькомолекулярних органічних сполук, що налічувала більше 150000 молекул відносно оптимізованих моделей. Відповідно до значень середньоквадратичного відхилення (RMSD, Å), PDscore та візуального аналізу сполук за співпадінням із фармакофорними моделями, було відібрано 9035 сполук.

3.1.3. ***Побудова рецепторно-орієнтованої фармакофорної моделі інгібіторів PKCB***

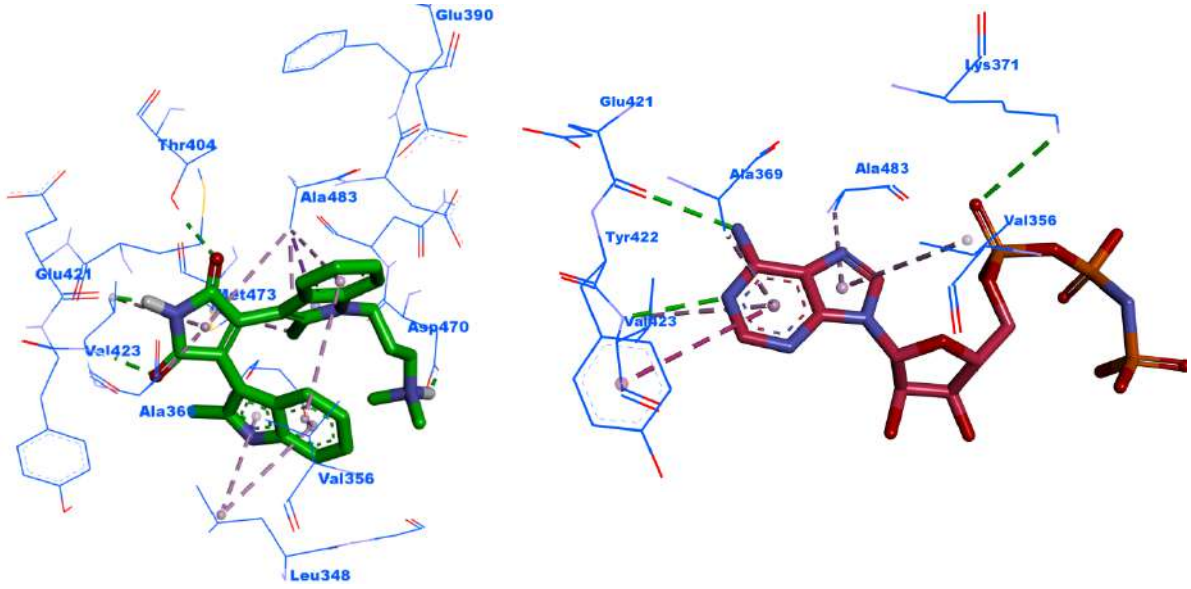
Для розробки первинної фармакофорної моделі інгібіторів протеїнкінази PKCB за основу було взято просторову структуру каталітичної субодиниці із інгібітором бісіндолілмалеймід з бази даних PDB (ID: 2I0E) та та з інгібітором ANP800 (PDB ID: 3PFQ).

Всі ароматичні кільця двох індольних і малеймідного фрагментів інгібітора бісіндолілмалеймiду утворюють низку гідрофобних взаємодій із амінокислотними залишками АТФ-зв'язувального сайту протеїнкінази PKCB (Ala369, Val356, Leu348, Val423 та Ala483). Ці взаємодії було відтворено згенерувавши три ароматичні точки без направлених векторів з центрами в геометричних центрах ароматичних гетероциклів інгібітора. Було сформовано два акцептори водневого зв'язку на кето-групах малеймiду, якому відповідають водневі зв'язки з Val423 та Thr404. Також було побудовано донор водневого зв'язку на атомі нітрогену малеймiду, якому відповідає водневий зв'язок з Glu421. (рис. 3.4 *а*, 3.5).

Аденіновий фрагмент ANP800 утворює низку гідрофобних взаємодій у аденін-зв'язувальній ділянці активного сайту протеїнкінази (з Val356, Lys371, Leu348, Ala369, Ala483, Glu421, Tyr422, Val423). Ці важливі взаємодії відтворено ароматичною точкою без направленого вектора з центром в геометричному центрі ароматичних аденіну інгібітора. Було

побудовано два акцептор водневого зв'язку на атомі Нітрогену, якому відповідає водневий зв'язок з Val423. Також було побудовано донор водневого зв'язку на атомі аміногрупі аденіну, якому відповідає водневий зв'язок з Glu421. На атомі Оксигену в першому фосфатному залишку інгібітора теж побудовано донор водневого зв'язку, якому відповідає водневий зв'язок з Lys371 (рис. 3.4 *б*, 3.5).

Додатково фармакофорну модель доповнено виключеними об'ємами. Було вибрано всі атоми активного центру протеїнкінази PKCB в радіусі 5 Å та згенеровано для них виключені об'єми. Радіус виключених об'ємів був встановлений 1.2 Å, що відповідає Ван-дер-Ваальсовому радіусу атома Гідрогена.



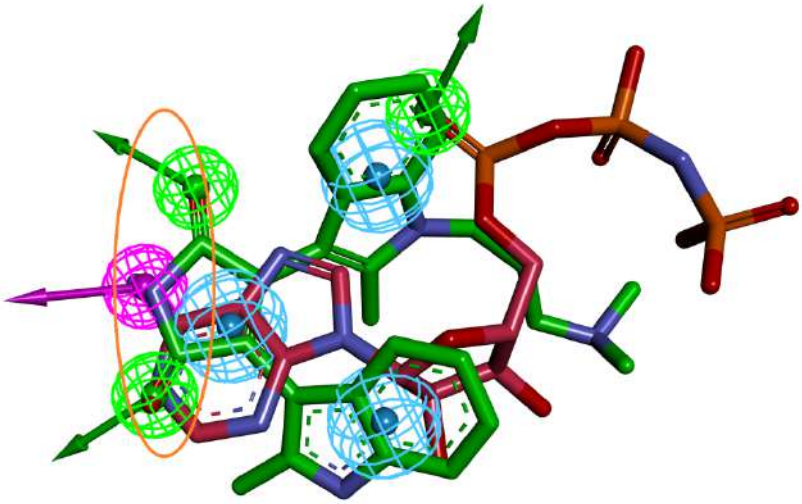
а *б*

Зеленими пунктирними лініями показано водневі зв'язки, фіолетовими – гідрофобні.

Рисунок 3.5 – Взаємодії інгібіторів бісіндолілмалеїміду (А) і ANP800 (Б) із амінокислотними залишками АТФ-зв'язувального сайту PKCB.

У PharmDeveloper геометрично усереднювалися фармакофорні точки моделі, що знаходилися на відстані не більше 0,5 Å.

В результаті первинна фармакофорна модель, яка була використана для комбінування, містила сім фармакофорних точок – три ароматичних без направлених векторів, три акцептори водневого зв'язку, один донор водневого зв'язку і 158 виключених об'ємів (рис. 3.6).



Синім кольором позначені ароматичні точки без вектора, блакитним – гідрофобну точку, зеленим – акцептори водневого зв'язку, малиновим – донори водневого зв'язку, виключені об'єми не візуалізувалися для ясності зображення, так як їх велика кількість закриває саму модель. Помаранчевим колом позначену групу фармакофорних точок, які комбінувалися.

Рисунок 3.6 – Первинна фармакофорна модель інгібіторів протеїнкінази PKCB, яка була використана для комбінування.

При комбінуванні встановлювалося загальне число фармакофорних точок в дочірніх моделях – 5. Всі точки крім двох акцепторів і одного донора, що спрямовані до шарнірної ділянки протеїнкінази, встановлювалися як потрібні по-замовчуванню. Акцептори і донор утворили групу комбінування, з якої отримували одну точку.

В результаті було отримано три дочірні фармакофорні моделі. Вони не використовувалися для фармакофорного скринінгу. На наступному етапі ці моделі буде оптимізовано з урахуванням біологічних даних, отриманих з тестування in vitro та in vivo, і використано для скринінгу з метою отримати більш активні і селективні інгібітори PKCB.

3.1.4. Молекулярний докінг сполук в АТФ-зв'язувальний сайт протеїнкінази PKCb і відбір лігандів для біохімічного тестування

На першому та другому етапі виконання проєкту «Розробка та тестування інгібіторів протеїнкінази с бета – ключового ферменту індукції нейтрофільних позаклітинних пасток (NETs) для запобігання гострого респіраторного дистрес синдрому (ARDS)» було проведено молекулярний докінг бібліотеки низькомолекулярних органічних сполук відділу біомедичної хімії Інституту молекулярної біології НАН України та проаналізовано 150000 комплексів сполук із активним сайтом PKCb.

Основними критеріями відбору були показник скору, наявність міжмолекулярних водневих зв’язків та гідрофобних взаємодій з ключовими амінокислотними залишками та візуальний аналіз комплексів сполук з активним сайтом PKCb, проте найважливішим етапом відбору є візуальна оцінка комплексів органічних сполук з АТФ-акцепторною ділянкою протеїнкінази С бета.

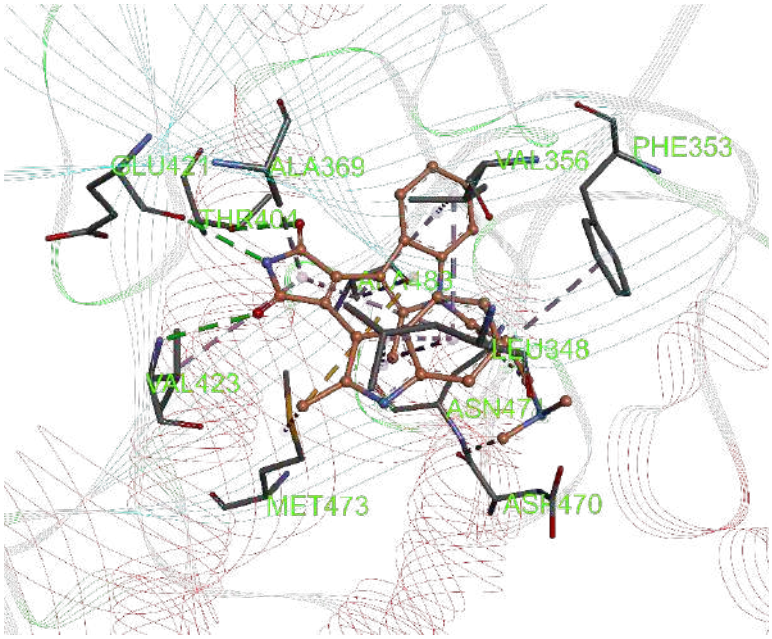
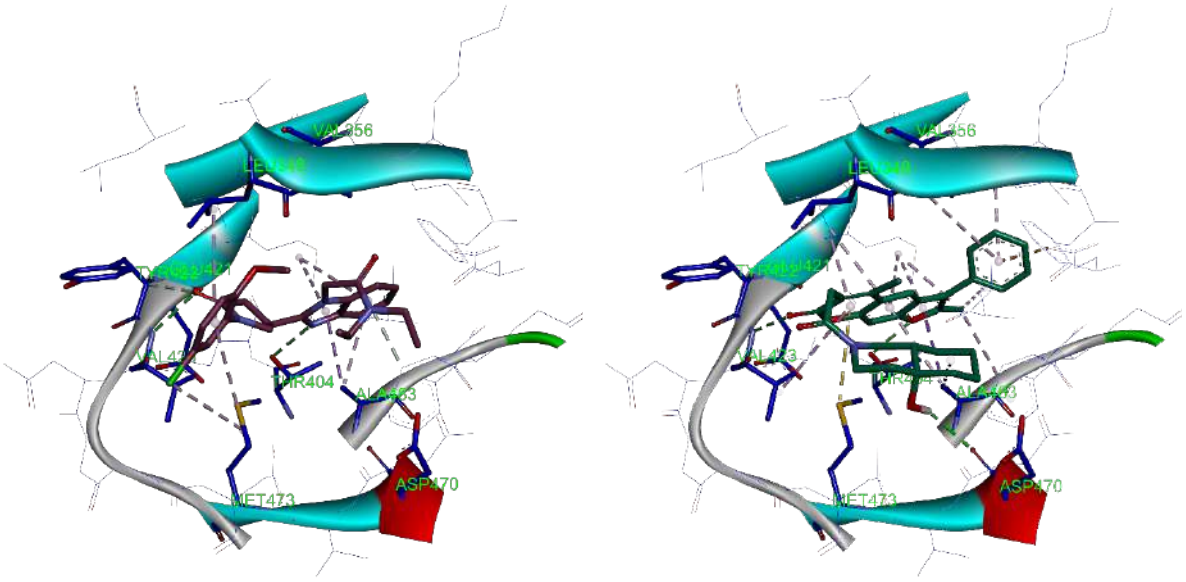


Рисунок 3.7 – Комплекс бісіндолілмаліміду з АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази С бета. Адаптовано з [14].

Таким чином було обрано 651 сполук для подальших досліджень та. Нижче показано приклади відібраних сполук. Сполука 963880 та 1098804. Обов'язковим для відбору сполуки є наявність водневого зв'язку із шарнірною ділянкою протеїнкінази – Val423. Також важливим є наявність гідрофобних взіємодій з амінокислотними залишками АТФ-акцепторного сайту (Ala483, Leu348, Ala369).



а *б*

Зеленими пунктирними лініями показані водневі зв’язки, фіолетовим – гідрофобні взаємодії.

Рисунок 3.8 – Комплекси сполук 963880 (а) та 1098804 (б) з АТФ-акцепторним сайтом PKCb.

3.1.5. ***Відбір лігандів для біохімічного тестування***

Критерієм відбору лігандів для in vitro/ in vivo тестування було одночасне потрапляння в топ результатів фармакофорного скринінгу та молекулярного докінгу.

Таких сполук було 48. Структури сполук, що проявили інгібувальні властивості щодо протеїнкінази С бета представлені в таблиці додатку Б.\

3.2. Оцінка біологічної активності (in vitro/ in vivo) та токсичності

Важливою частиною даного дослідження є біологічна валідація отриманих експериментом in silico результатів. Для цього було застосовано низку методів, а саме флюоресцентна мікроскопія, ферментний імуносорбентний аналіз (ELISE), спектрофлуориметрії, Real-time PCR, світлова мікроскопія, конфокальна мікроскопія та морфометрія. Також окремо було визначено цитотоксичність сполук та визначено рівень експресії генів, що кодують цитокіни при ГРДС.

3.2.1. ***Оцінка речовин, підібраних методом молекулярного докінгу, на активність формування нейтрофільних екстрацелюлярних пасток***

Першим завданням нашої частини досліджень була оцінка ефективності впливу речовин-інгібіторів протеїнкінази С-бета, що були відібрані методом молекулярного докінгу в інституті молекулярної біології і генетики, на розвиток нейтрофільних екстрацелюлярних пасток, що індукувалися форболмірістатацетатом. В таблиці, що приведена нижче, показаний відсоток реалізації різних видів клітинних реакцій за умов впливу досліджуваних речовин. Загальний відсоток клітин становить 100%, співвідношення всіх типів клітин наведений у таблиці у % (Таблиця 3.5).

Таблиця 3.5. Відсоток реалізації різних видів нейтрофільної відповіді за умов впливу досліджуваних речовин-інгібіторів протеїнкінази Сβ.

Номер речовини	**Живі клітини, %**	**НЕТоз, %**	**Незавершений НЕТоз, %**	**Апоптоз, %**
272030	84	11	5	0
826209	63	31	3	3
412247	88	3	8	1
786436	94	1	5	0
786437	92	3	5	0
786440	45	38	15	2
146528	93	5	1	1
146555	87	10	0	3
826603	54	34	6	6
826611	77	8	12	3
826627	54	38	8	0
790668	90	3	7	0
790669	48	33	14	5
790673	91	1	6	2
790714	58	26	10	6
271831	33	7	40	20

271832	83	15	0	2
963842	49	40	11	0
963861	52	32	13	3
963863	44	46	3	7
271871	86	9	5	0
271872	79	15	6	0
963893	61	37	0	2
274901	81	16	3	0
963924	59	30	7	4
271924	57	40	3	0
274927	92	4	4	0
963975	91	3	5	1

На даній таблиці показані результати оцінки нейтрофільних екстрацелюлярних пасток в найбільш ефективних речовин, що були надані для дослідження. Виходячи з відсотку пригнічення активності формування нейтрофільних пасток в умовах виділених ізольованих нейтрофільних гранулоцитів, нами було виділено чотири найбільш перспективні представники (виділені жовтим кольором). Червоним кольором виділені результати по речовинам, які не викликали протекцію.

3.2.2. Визначення дозозалежності відібраних інгібіторів РКСВ на утворення NETs

На наступному етапі була проведені дослідження дозозалежності ефекту відібраних 4-х речовин.

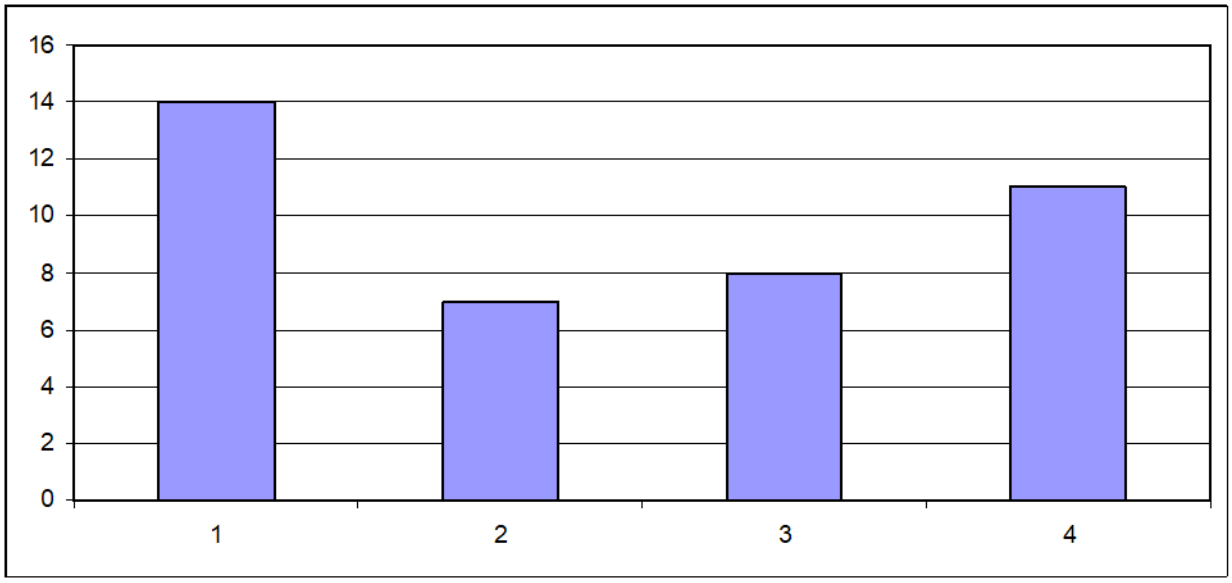


Рисунок 3.9 – Дозозалежність впливу речовини 786436 на ефективність формування NETs.

1. відсоток НЕТозу, індукований форболмірістатацетатом. 2. вплив 250 нМ речовини на виділені нейтрофільні гранулоцити. 3. Вплив 500 нМ речовини. 4. Вплив 1 мкМ речовини

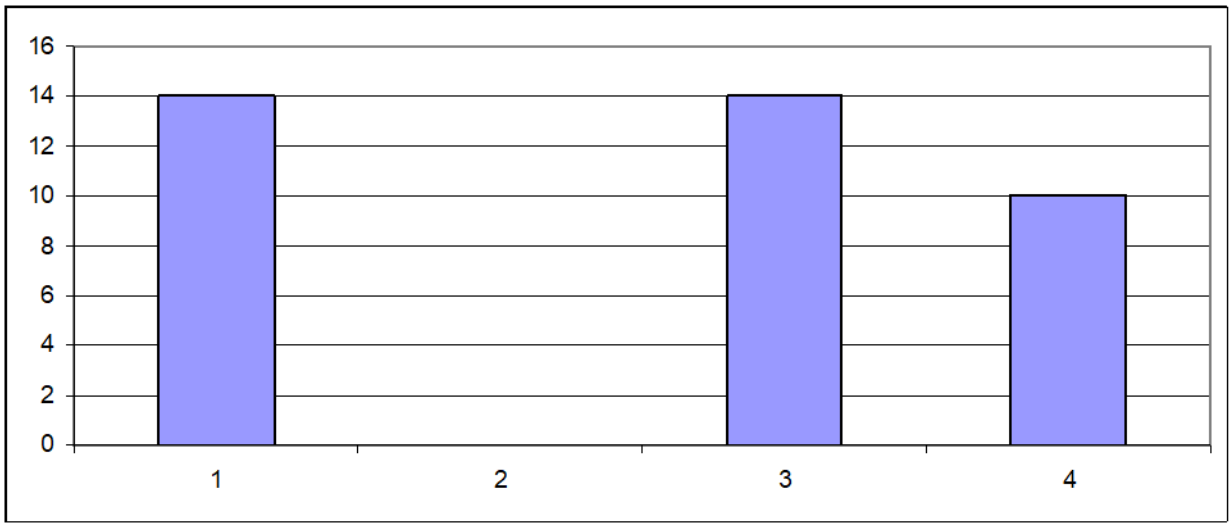


Рисунок 3.10 – Дозозалежність впливу речовини 146528 на ефективність формування NETs.

1. Відсоток НЕТозу, індукований форболмірістатацетатом. 2. вплив 250 нМ речовини на виділені нейтрофільні гранулоцити. 3. Вплив 500 нМ речовини. 4. Вплив 1 мкМ речовини.

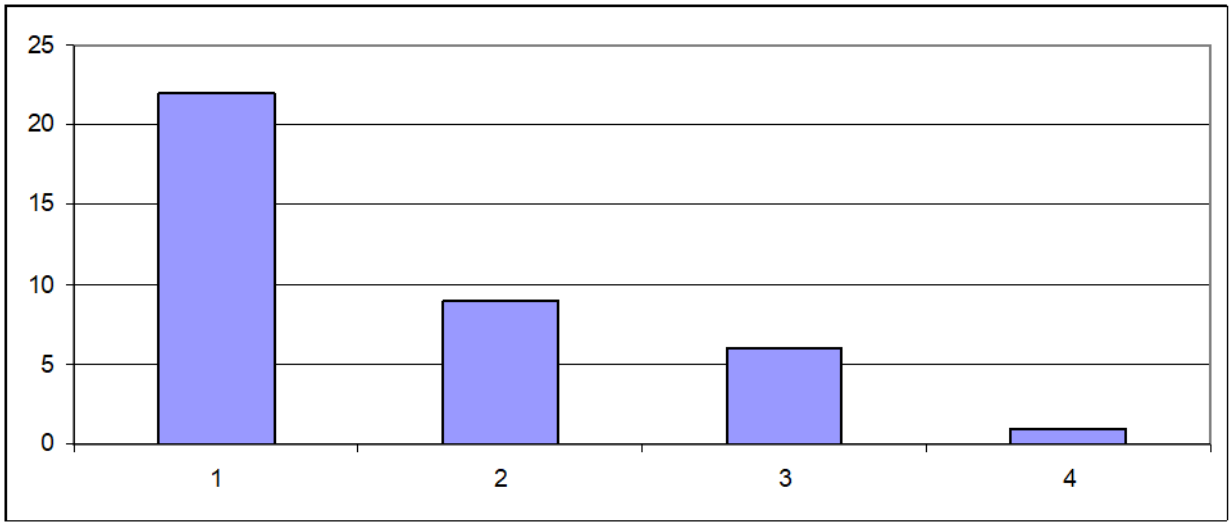


Рисунок 3.11 – Дозозалежність впливу речовини 790668 на ефективність формування NETs.

1. Відсоток НЕТозу, індукований форболмірістатацетатом. 2. Вплив 250 нМ речовини на виділені нейтрофільні гранулоцити. 3. Вплив 500 нМ речовини. 4. Вплив 1 мкМ речовини

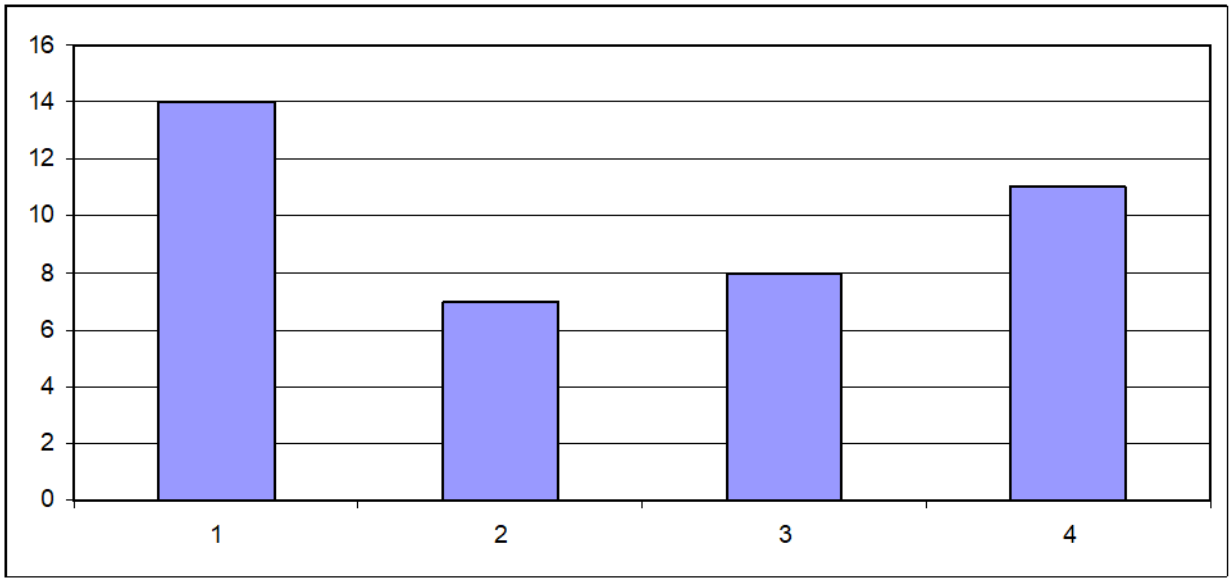
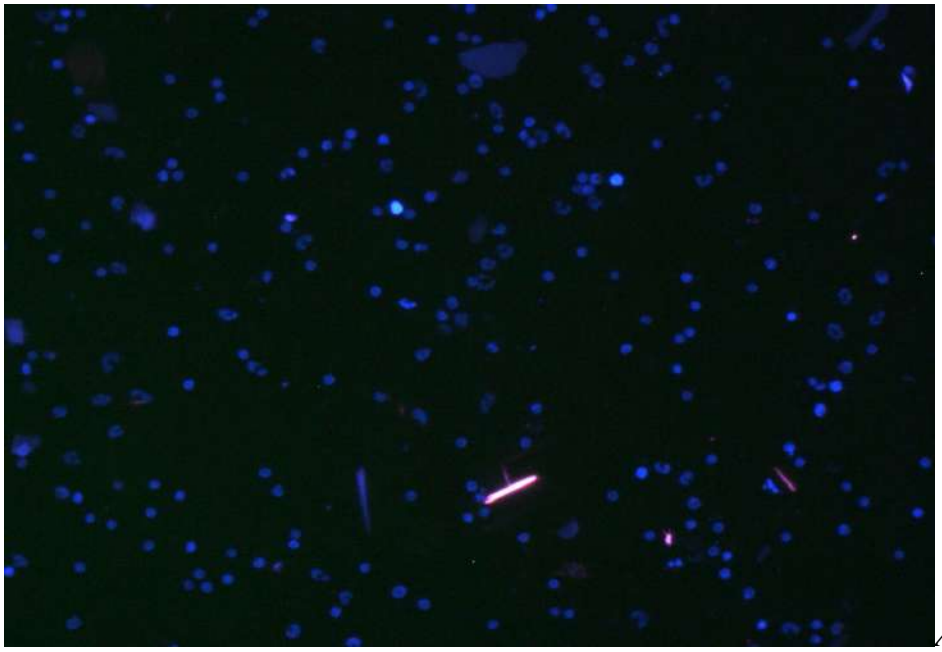


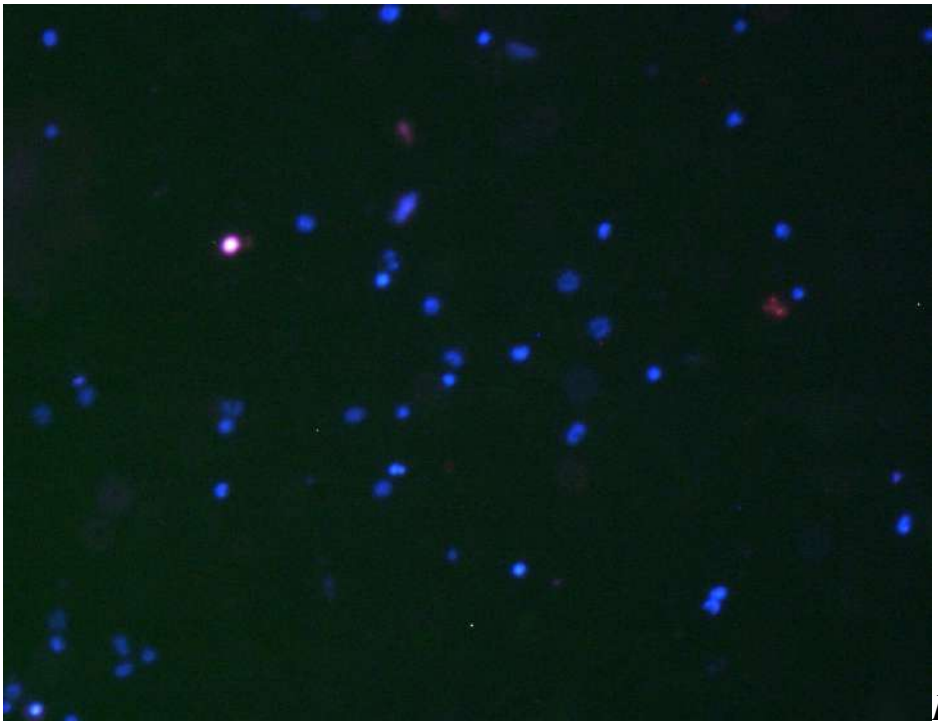
Рисунок 3.12 – Дозозалежність впливу речовини 963975 на ефективність формування NETs.

1. Відсоток НЕТозу, індукований форболмірістатацетатом. 2. вплив 250 нМ речовини на виділені нейтрофільні гранулоцити. 3. Вплив 500 нМ речовини. 4. Вплив 1 мкМ речовини



А

Б



B

Рисунок 3.13 – Оригінальні фотографії нейтрофілів А. Інтактні нейтрофіли. Б. Стимульований НЕТоз (PMA в концентрації 20 нМ). В. Речовина 790668 на фоні стимульованого НЕТозу.

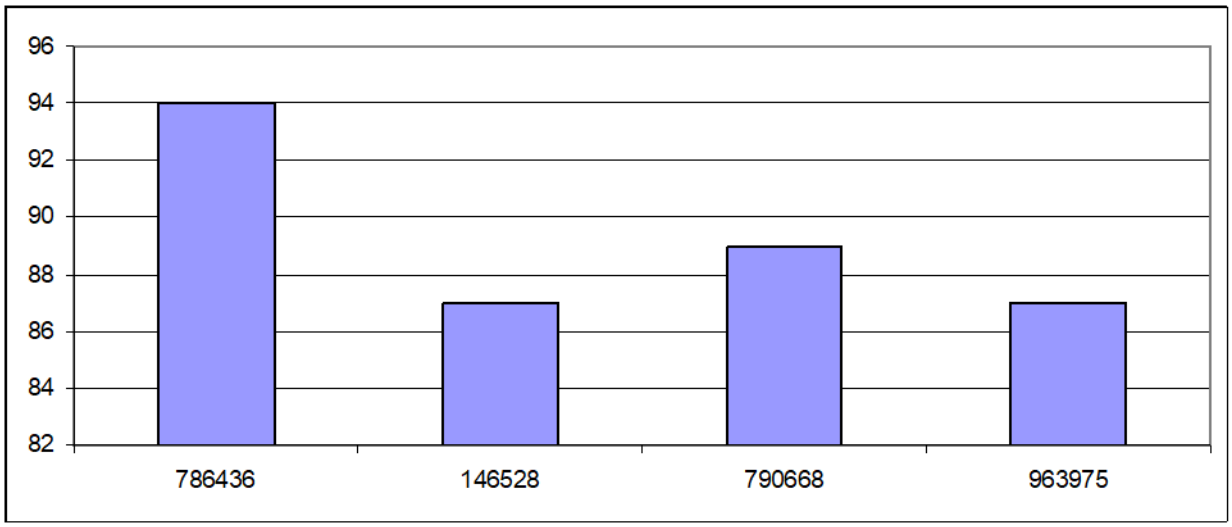


Рисунок 3.14 – Відсоток пригнічення активності НЕТозу порівняно з контрольними ізольованими нейтрофілами кроля за умов впливу вищезазначених речовин.

Отримані дані в дослідженні показують наявність поряд з ефектом пригнічення утворення пасток ще і дозозалежність даного ефекту у досліджуваних речовин.

3.2.3. Визначення ефективності і дозозалежності низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази С бета (PCKß) in vitro методом ферментного імуносорбентного аналізу.

Для визначення активності протеїнкінази Cβ при дії інгібіторів використовували протеїнкіназу Protein Kinase C, beta (PRKCB) (AA 342-600) protein (His tag,S tag).

В лунки її наносили у кількості 150 нг. Для підбору оптимальної кількості PRKCB спочатку будували калібрувальну криву. Для побудови калібрувальної кривої використовували такі кількості ферменту: 37,5 нг, 75нг, 150 нг, 300 нг (Рис. 3.15.)

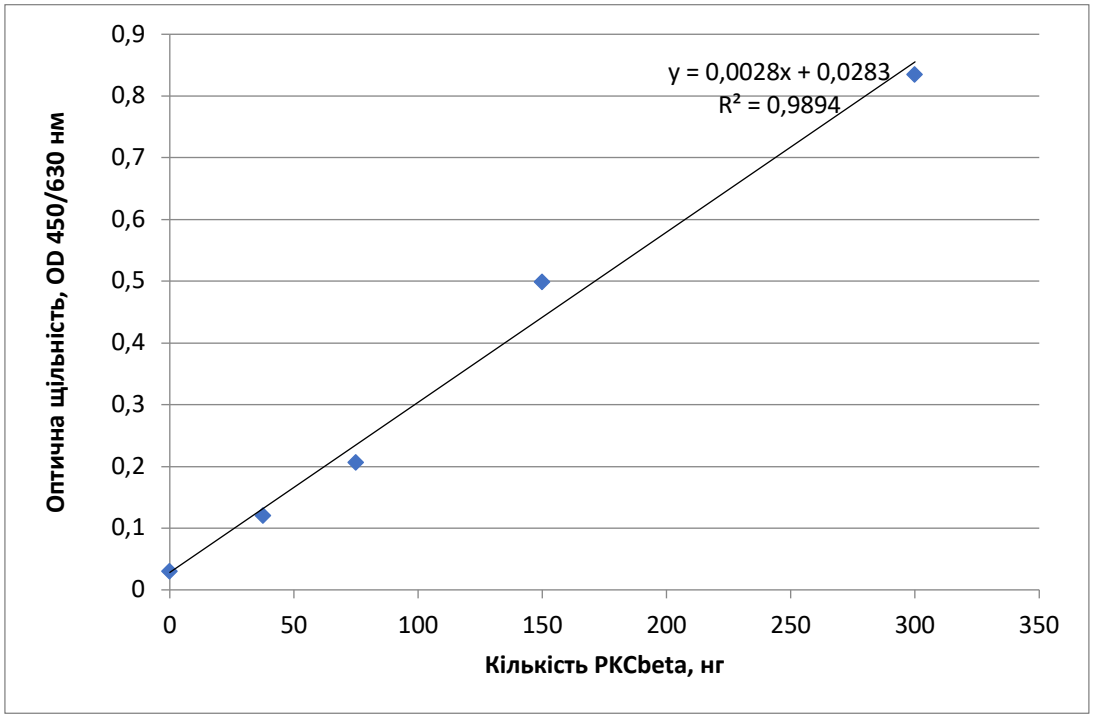


Рисунок 3.15 – Калібрувальна крива для ферменту Protein Kinase C, beta (PRKCB) (AA 342-600) protein (His tag,S tag).

Наступним етапом було дослідження дозозалежної здатності речовин пригнічувати активність PCKß. Інгібітори спочатку розводили у ДМСО до концентрації 100мкМ. А потім вносили у лунки у кількості 1 мкМ, 0,5 мкМ, 0,25 мкМ, 0,1 мкМ та інкубували з чистим ферментом (150 нг) протягом 10 хв при 37^0С

При проведенні обрахунків, оптичну щільність лунок з інтактним ферментом в дозі 150 нг усереднювали та приймали за 1, ефективність дії речовин виражали у відсотках від інтактного ферменту. Дані по дозозалежному впливу речовин приведені у Таблиці 3.6.

Таблиця 3.6. Ефективность та дозозалежность низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази С бета (PCKß) in vitro методом ферментного імуносорбентного аналізу.

№	Номер сполуки	**1 мкМ, %**	**0,5 мкМ, %**	**0,25 мкМ, %**	**0,1 мкМ, %**
1	**272030**	61	59	53	22
2	**826209**	76	73	48	54
3	**412247**	86	82	46	43
4	**786436**	90	92	72	71
5	**786437**	71	71	61	29
6	**786440**	93	79	55	43
7	**146528**	86	84	70	53
8	**146555**	88	83	65	49
9	**826603**	77	61	43	44
10	**826611**	80	73	48	25
11	**826627**	80	62	56	53
12	**790668**	88	75	66	31
13	**790669**	73	74	28	40
14	**790673**	83	78	62	27
15	**790714**	79	72	66	32
16	**271831**	75	65	64	60
17	**271832**	76	77	62	33
18	**271832**	88	81	73	45
19	**963842**	75	65	64	44
20	**963861**	81	81	48	44

21	**963863**	74	89	37	62
22	**271871**	72	65	35	30
23	**271872**	80	52	50	57
24	**963893**	82	82	48	ND
25	**274901**	63	63	63	38
26	**963924**	75	76	54	40
27	**271924**	86	91	84	70
28	**274927**	68	74	52	27
29	**963975**	82	77	64	47
30	**826611**	78	49	42	ND
31	**790669**	82	69	63	ND

Виходячи з отриманих результатів можна стверджувати, що серед досліджуваних речовин найбільшою мірою проявляє свою здатність до пригнічення протеїнкінази С β речовини 146528, 786436, 963975 та 790668 про що свідчить зниження відсотку нейтрофільних пасток за умов її застосування порівняно зі стимульованими PMA клітинами. Таким чином, відібрані перспективні речовини, які можуть застосовуватися в якості блокаторів NETosis за для попередження розвитку ARDS.

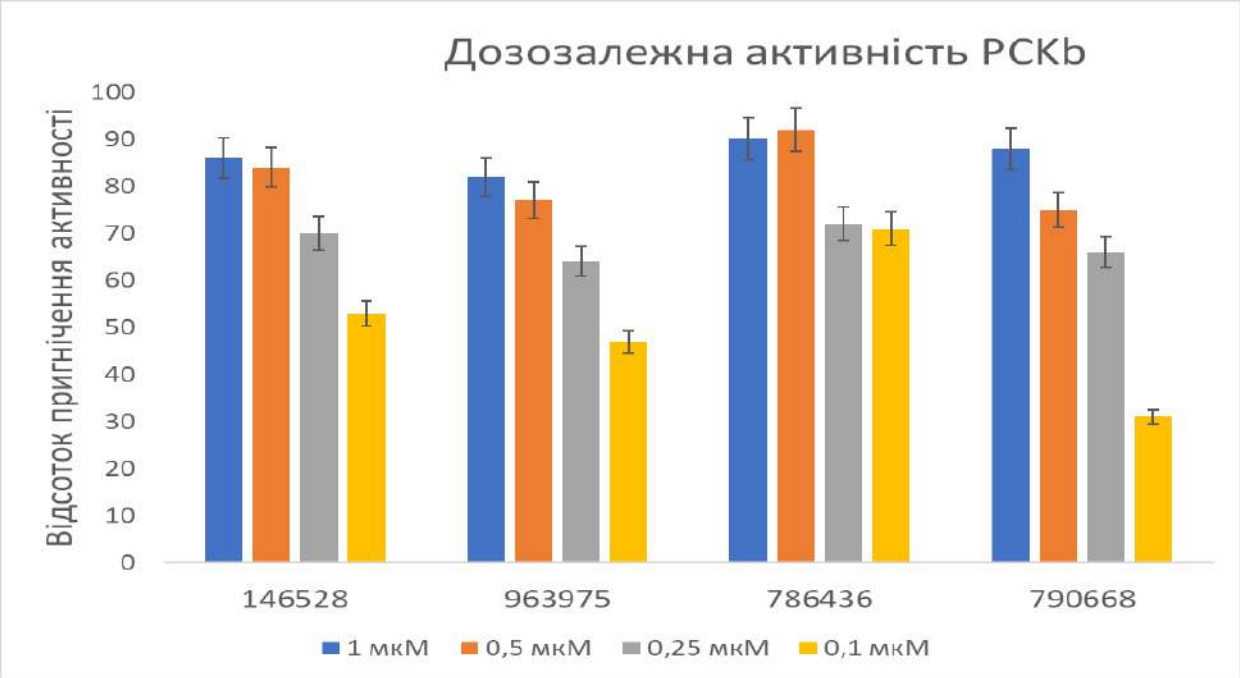


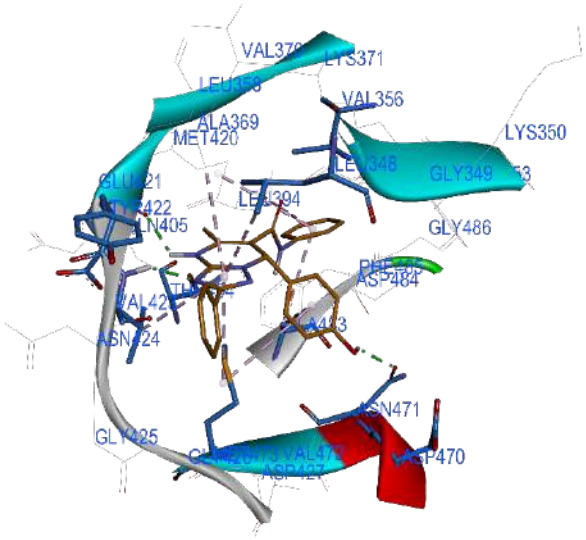
Рисунок 3.16 – Ефективность та дозозалежность відібраних низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази С бета (PCKß) in vitro

методом ферментного імуносорбентного аналізу (Речовини 146528, 786436, 963975 та 790668).

3.2.4. Способи взаємодії сполук 146528, 786436 та 963975 із АТФ-акцепторним сайтом

Щоб зрозуміти механізми, за якими знайдені сполуки проявляють інгібувальні властивості щодо протеїнкінази С бета було досліджено їх комплекси із АТФ-акцепотрним сайтом, що були отримані з використанням молекулярного докінгу.

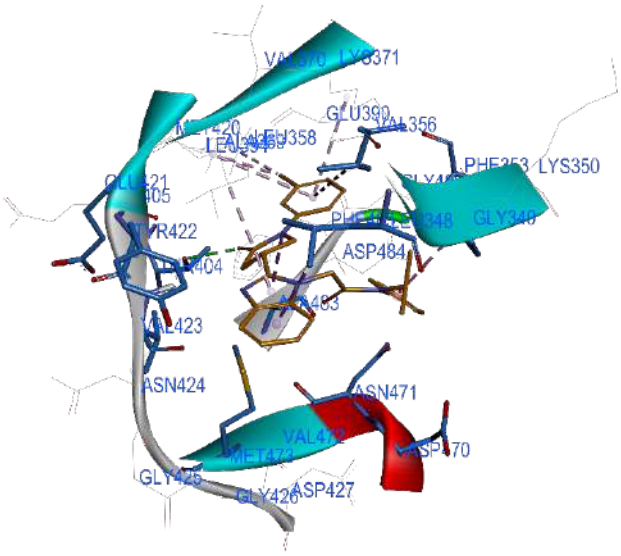
Таким чином сполука **146528** ((7S)-7-(4-гідроксифеніл)-5-метил-N,2-діфеніл-4,7-дигідро-[1,2,4]тріазоло[1,5-a]піримідин-6-карбоксамід) (рис. 3.17). Дана сполука своїм 4,7-дигідро-[1,2,4]тріазоло[1,5-a]піримідиновим фрагментом розташовується в аденін зв’язувальній ділянці та формує водневі зв’язки із шарнірною ділянкою протеїнкінази С бета – Val423 та Glu421. Також даний фрагмент формує гідрофобні взаємодії з Val423, Leu348 та Ala369. Фенілкарбомоіловий фрагмент даної сполуки направлений в глиб сайту зв’язування та формує низку гідрофобних взаємодій з такимим амінокислотними залишками як: Met420, Leu394, Ala483. 4-гідроксифенільний фрагмент сполуки формує водневий зв’язок з Asn471 та гідрофобні взаємодії з Met473.



Зеленими пунктирними лініями показані водневі зв’язки, фіолетовим – гідрофобні взаємодії.

Рисунок 3.17 – Комплекси сполук **146528** з АТФ-акцепторним сайтом PKCb.

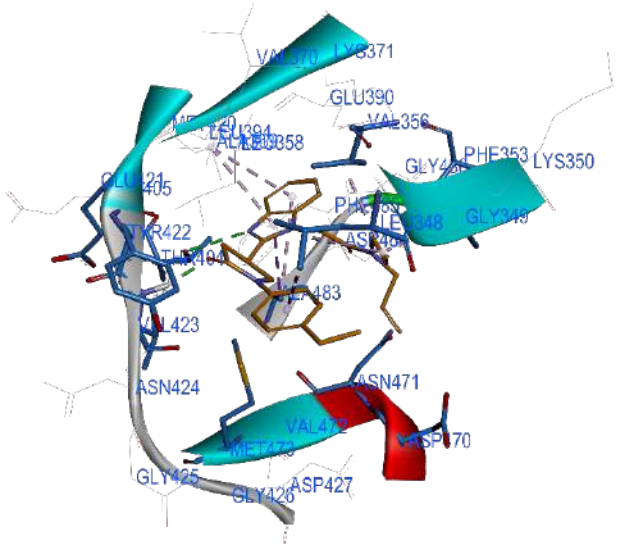
Сполука **786436** (N-ізопропіл-2-[2-[(3R)-1-(m-толіл)-5-оксо-піролідін-3-іл]бензімідазол-1-іл]-N-феніл-ацетамід) (рис. 3.18). Бензімідазольний фрагмент даної сполуки розташований в аденін зв’язувальній ділянці АТФ-акцепторного сайту PKCB та формує низку гідрофобних взаємодій з Leu348 та Ala369. [1-(m-толіл)-5-оксо-піролідін-3-іл]-овий фрагмент направлений вглиб сайту зв’язування та формує водневий зв’язок з Thr404 та гідрофобні взаємодії з Met420, Lys371, Leu394 та Val356. [2-(N-ізопропаніліно)-2-оксо-етил]-овий фрагмент формує гідрофобні взаємодії з Phe 353. Варто відзначити, що згідно такої моделі, сполука **786436** не утворює водневі зв’язки з шарнірною ділянкою протеїнкінази, що є важливим елементом взаємодії АТФ-конкурентних інгібіторів.



Зеленими пунктирними лініями показані водневі зв’язки, фіолетовим – гідрофобні взаємодії.

Рисунок 3.18 – Комплекси сполук **786436** з АТФ-акцепторним сайтом PKCb.

Сполука **963975** (N,N-діаліл-2-[2-[(3R)-1-(4-етилфеніл)-5-оксо-піроліділ-3-yl]бензамідазол-1-іл]ацетамід) (рис. 3.19). Цікаво відмітити, що сполуки **963975** та **786436** мають однакову корову структури, але при цьому мають різні способи взаємодії, згідно даних молекулярного моделювання. Таким чином, сполука **963975** бензімідазольним фрагментом направлена в глиб сайту зв’язування та формує водневий зв’язок з Thr404 та гідрофобні взаємодії з Met420 та Ala483. [1-(4-етилфеніл)-5-оксо-піролідін-3-іл]-овий фрагмент утворює водневий зв’язок з шарнірною ділянкою протеїнкінази, а саме з Val423, що суттєво відрізняє дану сполуку від сполуки **786436**.



Зеленими пунктирними лініями показані водневі зв'язки, фіолетовим – гідрофобні взаємодії.

Рисунок 3.19 – Комплекси сполук **963975** з АТФ-акцепторним сайтом PKCb.

3.2.5. ***Оцінка кардіотоксичності обраних блокаторів PCKβ на культурі неонатальних кардіоміоцитів щура***

Наступною задачею була перевірка цитотоксичності відібраних 4-х речовин. Для оцінки цитотоксичності ми використовували методику впливу даних речовин на культуру неонатальних кардіоміоцитів щура у різних концентраціях. Дводенна культура піддавалася впливу речовин в різних концентраціях, і оцінювався рівень некрозу. Наступні чотири речовини показали відсутність вираженої токсичної дії в концентрації 5 мкМ, а значне зниження живих кардіоміоцитів визначалося при концентраціях від 40 мкМ, на яких речовина 790668 давала 100 % некрозу.

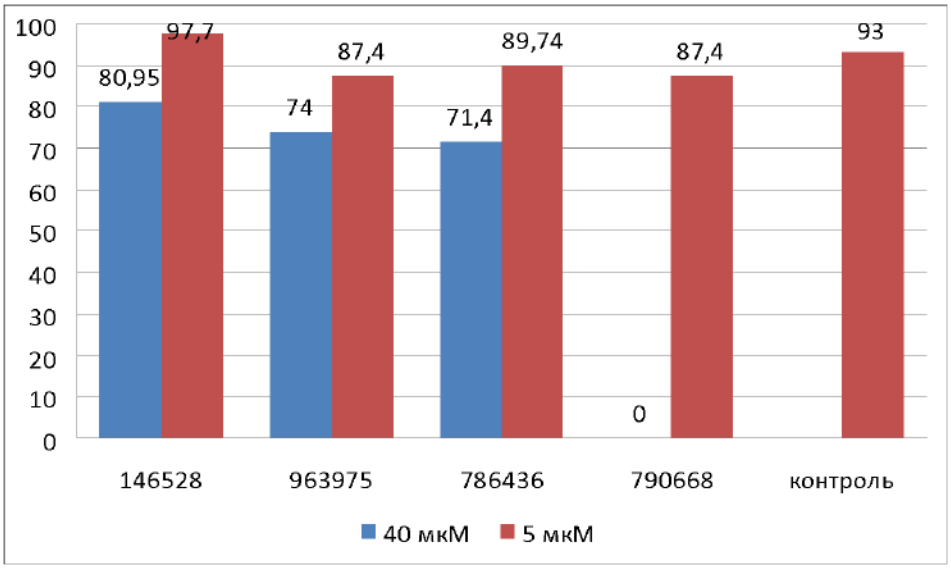
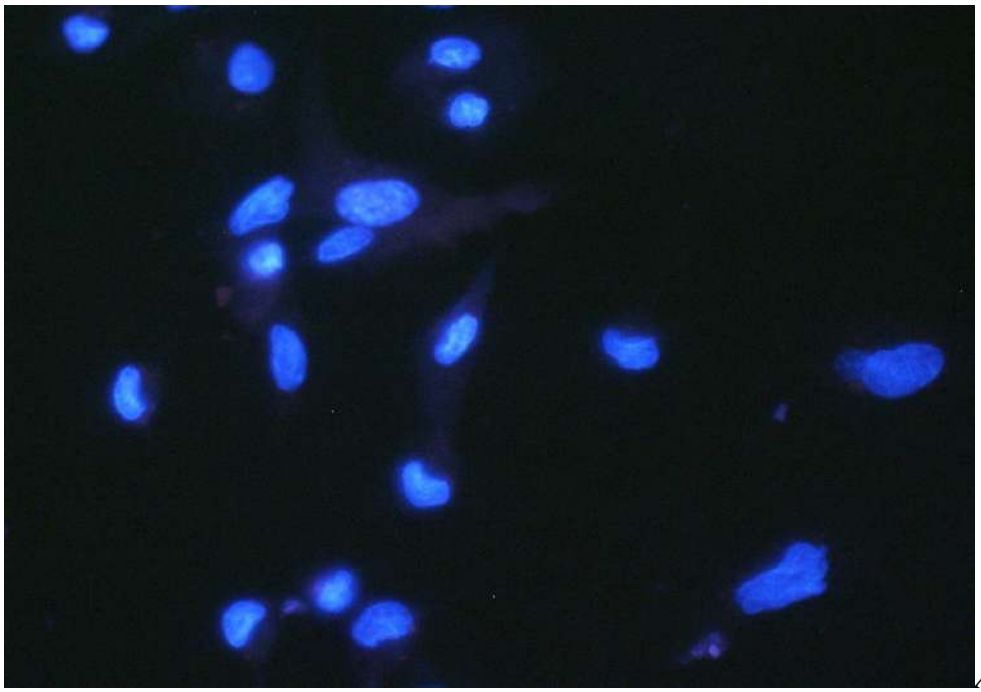
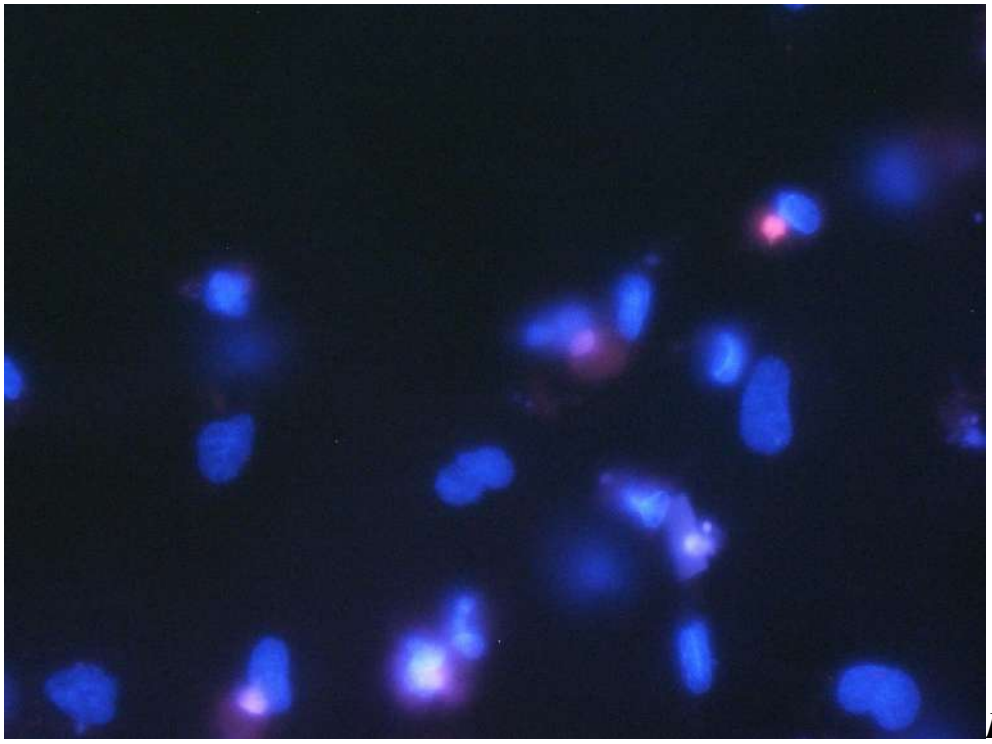


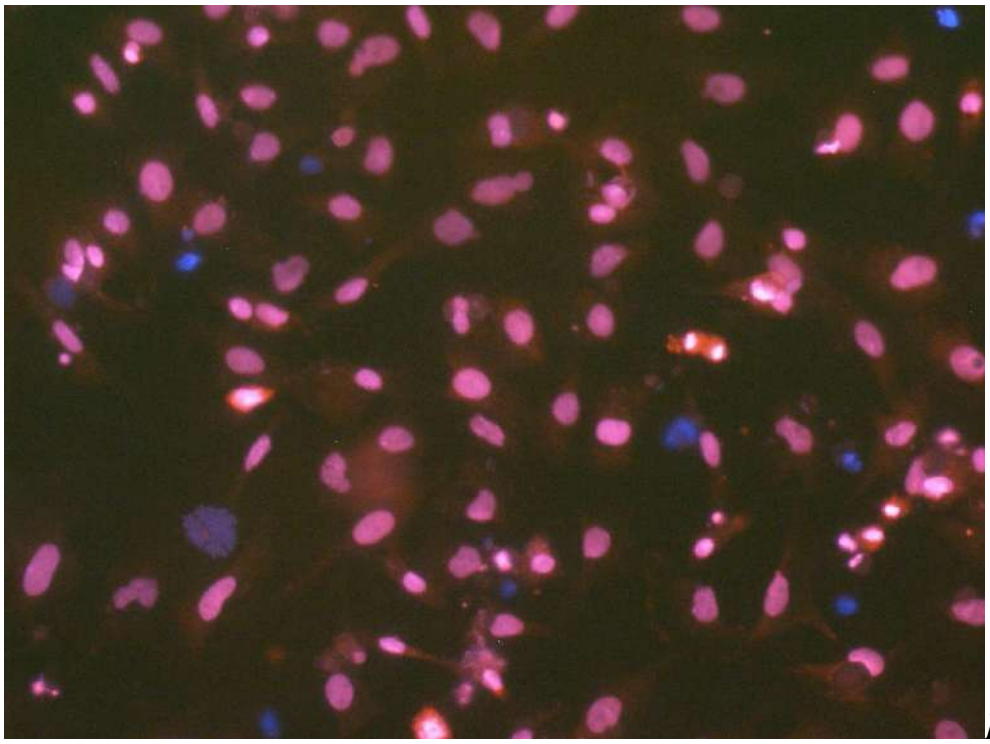
Рисунок 3.20 – Рівень живих кардіоміоцитів в культурі за умов впливу речовин-інгібіторів PCKß.



A



Б



В

Рисунок 3.21 – Зміни в культурі кардіоміоцитів.

А. контроль, Б. Вплив речовини 146528 в концентрації 5 мкМ, В. Вплив речовини 790668 в концентрації 40мікромоль. Подвійне забарвлення Hoechst – PI.

Другим методом, за допомогою якого визначали кардіотоксичність відібраних речовин – МТТ тест. За результатами його проведення найбільш безпечними виявилися речовини 146528 та 963975. В концентрації 1мкМ (тій, яку ми плануємо використовувати в дослідженнях *in vivo*) вони не викликали загибель неонатальних кардіоміцитів в культурі. Дані представлені на рисунку 3.22.

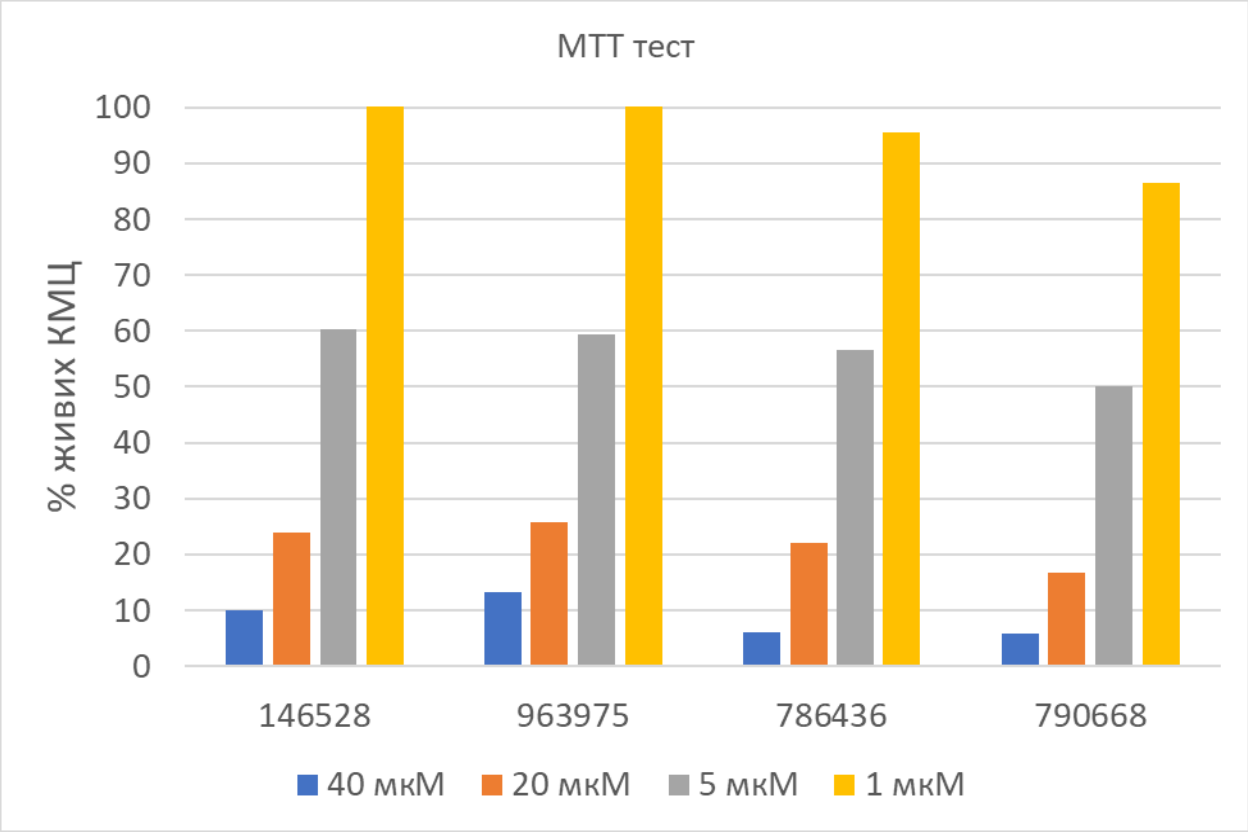


Рисунок 3.22 – Дані МТТ тесту для 4-х відібраних речовин.

3.2.6. Оцінка набряку легень

Наступним етапом проєкту було дослідження впливу відібраних речовин (146528 та 963975) на попередження розвитку запалення при моделюванні гострого респіраторного дистрес синдрому у старих щурів лінії SHR. Першою методикою, яку ми використовували, була оцінка набряку легень.

Співвідношення ваги легкого і сухого розраховували як відношення вологої ваги до сухої ваги. Таким чином оцінювали ступінь набряку легень, чим більше цей показник, тим більше набряк. Цей коефіцієнт дорівнював 4,32 в контрольній групі та 8,66 у середньому у групі щурів з ГРДС.

Використання блокаторів активності PCKß номер 146528 та 786436 призводило до зменшення набряку легень на 43% та на 34% відповідно. Таким чином використання речовини 146528 призводило до найбільш вираженого зменшення набряку легень у щурів з моделюванням ГРДС.

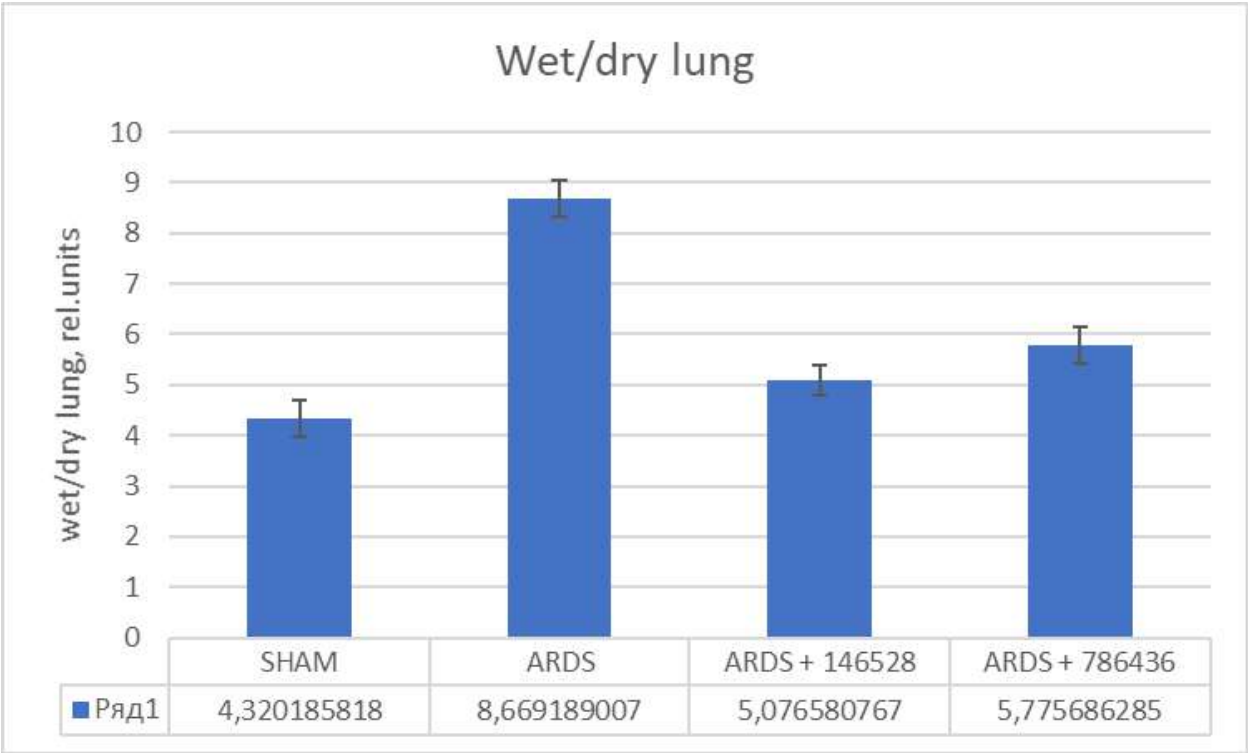


Рисунок 3.23 – Оцінка набряку легень – співвідношення wet/dry, у відносних одиницях.

3.2.7. Оцінка вмісту загального білку у бронхолегеневому лаважі

Даний показник говорить про ступінь проникності легеневих капілярів та аерогематичного бар'єру в цілому – білок фільтрується в просвіт альвеол, чим більше він, тим більше проникність капілярів.

Вміст загального білку у бронхолегеневому лаважі дорівнював 3,015 мг/мл у контрольній групі та збільшувався у 4,14 разів у групі щурів з ARDS (12,483 мг/мл). Використання речовини 146528 зменшило вміст загального білку у 6,6 разів, а речовини 786436 - у 3,6 разів порівняно з групою щурів, яку не лікували (ГРДС) Таким чином використання інгібіторів PCKß призводило до вираженого зменшення ендотеліальної та епітеліальної проникності у щурів з моделюванням ГРДС.

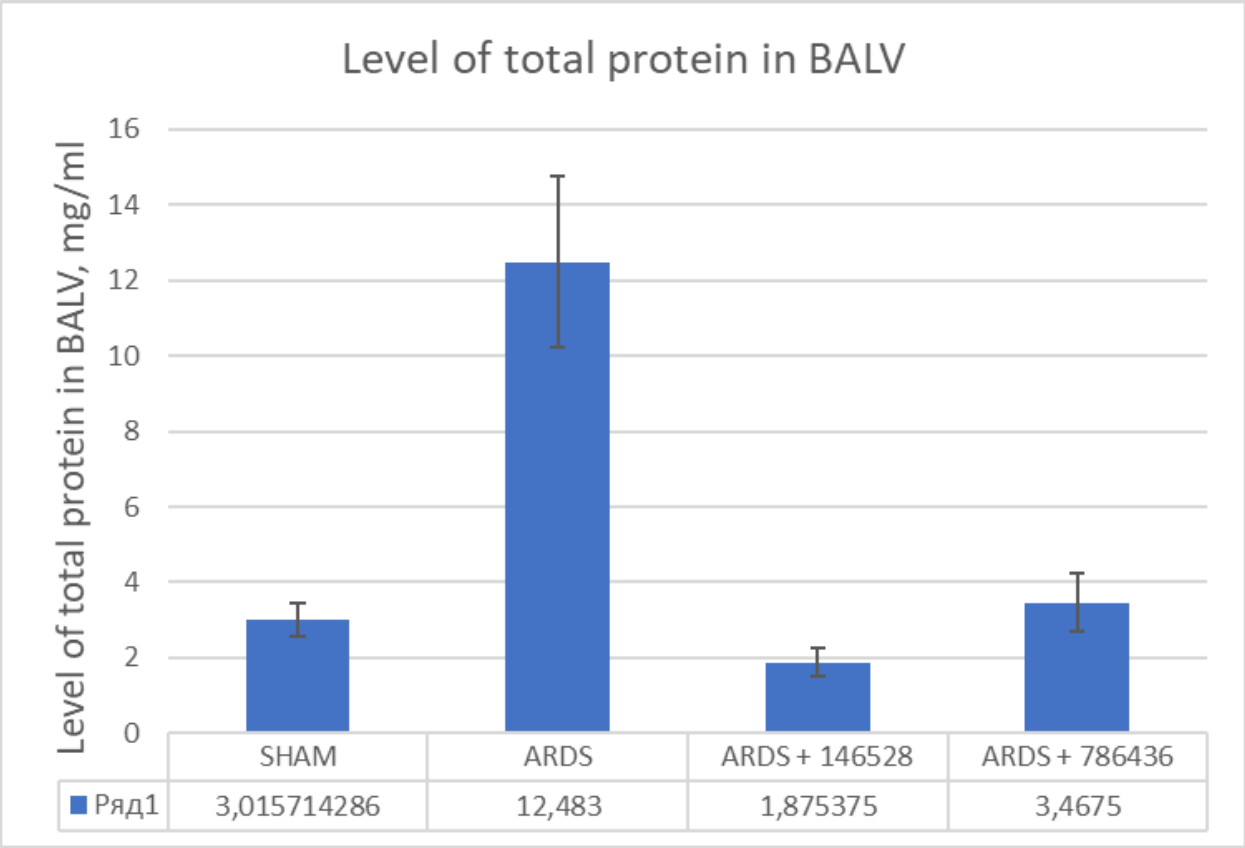


Рисунок 3.24 – Вміст загального білку у бронхолегеневому лаважі щурів.

3.2.8. Оцінка вмісту вільної ДНК у БАЛ та плазмі крові щурів

Вміст вільної ДНК як у бронхолегеневому лаважі, так і у плазмі крові є маркером формування нейтрофільних позаклітинних пасток. На рисунку 3.25 представлена калібрувальна крива для Пікогріну.

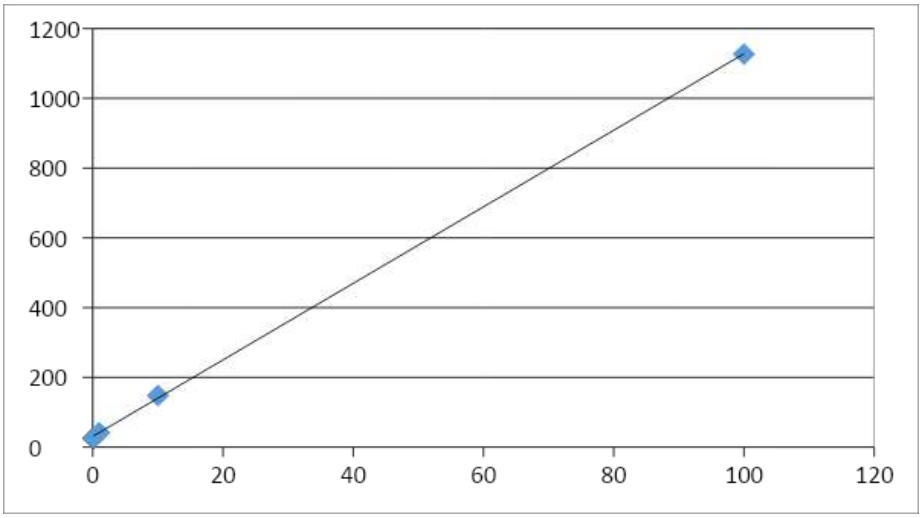


Рисунок 3.25 – Калібрувальна крива

Вміст позаклітинної ДНК у бронхолегеневому лаважі щурів із моделюванням ARDS був у 2,46 разів вищім, ніж у щурів групи SHAM (рис. 3.26). У щурів 3-ї групи, яких лікували речовиною 146528 рівень позаклітинної ДНК суттєво не змінювався, а от у щурів 4-ї групи (ARDS + речовина 963975) рівень позаклітинної речовини знизився у 2 рази, порівняно із щурами групи ARDS.

А у плазмі крові щурів з ARDS вміст вільної ДНК був на 45% вище порівняно з контролем (рис. 3.27). Використання речовини 146528 та 963975 знижу вміст позаклітинної ДНК на 18% та 23,5% відповідно в порівнянні із щурами, яких не лікували (група 2).

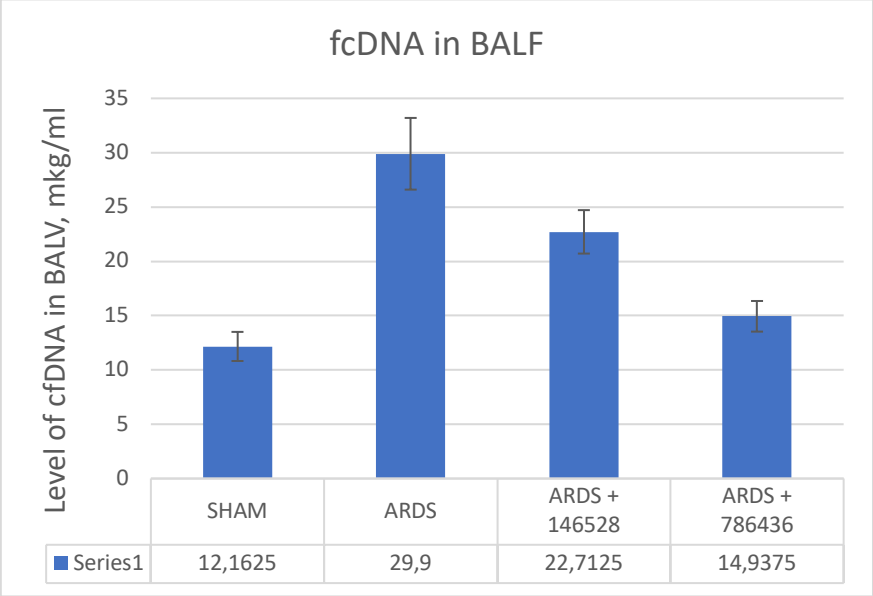


Рисунок 3.26 – Вміст позаклітинної ДНК у бронхолегеневому лаважі

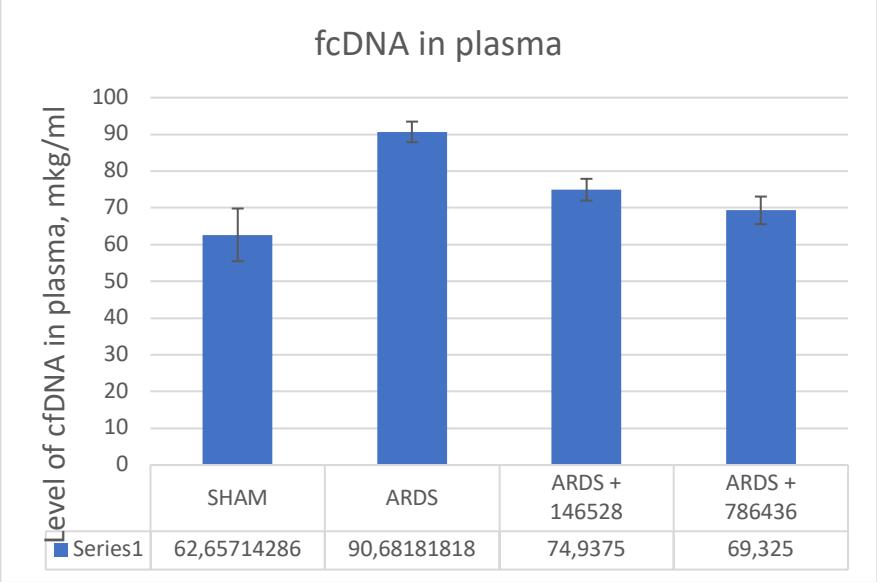


Рисунок 3.27. Вміст позаклітинної ДНК у плазмі крові щурів

3.2.9. Визначення рівнів спонтанного та індукованого NETозу за допомогою методу флуоресцентної мікроскопії у щурів з ГРДС.

Визначення рівнів формування нейтрофільних позаклітинних пасток проводили шляхом подвійного забарвлення барвниками Hoechst та пропідіум йодидом. Було показано, що у щурів групи ARDS рівень

спонтанного NETsis був у 2,7 разів вищим порівняно із щурами групи SHAM – 8,3 % проти 2,95 % (рис. 3.28 та 3.29).

Встановлено, що у щурів групи ARDS рівень індукованого PMA утворення нейтрофільних позаклітинних пасток був у 2 рази вищим порівняно із щурами групи SHAM – 26,7 % проти 13,5 % (рис. 3.30 та 3.31).

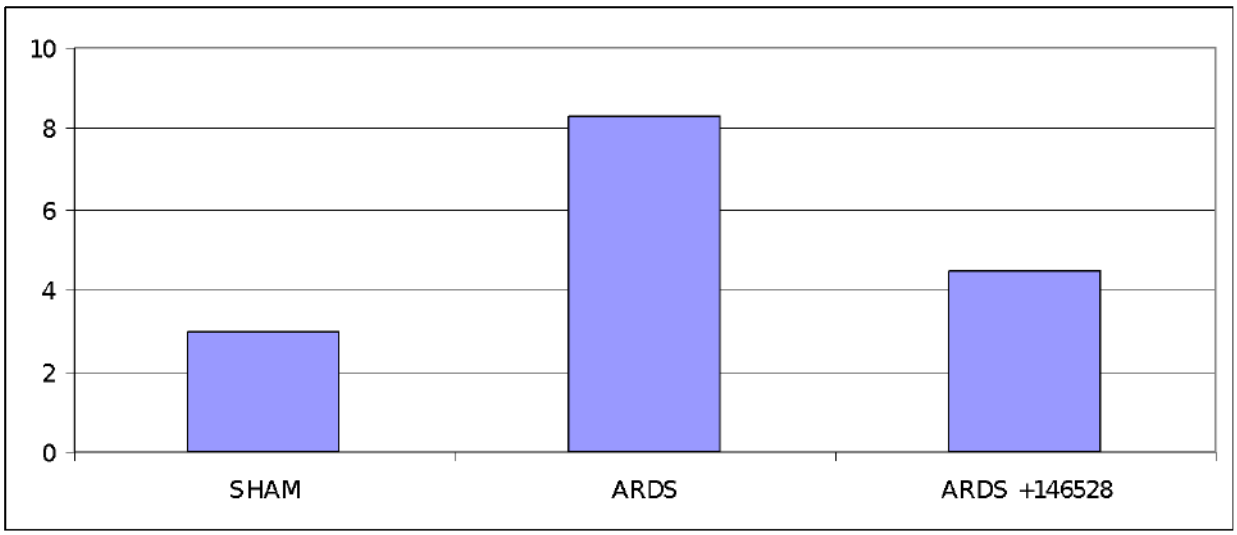


Рисунок 3.28. Зміни (в відсотках) кількості НЕТозу у нейтрофілах, виділених з удавано-оперованих щурів (SHAM), щурів з моделюванням гострого респіраторного дистрес синдрому, та щурів, що паралельно з моделюванням отримували речовину 146528

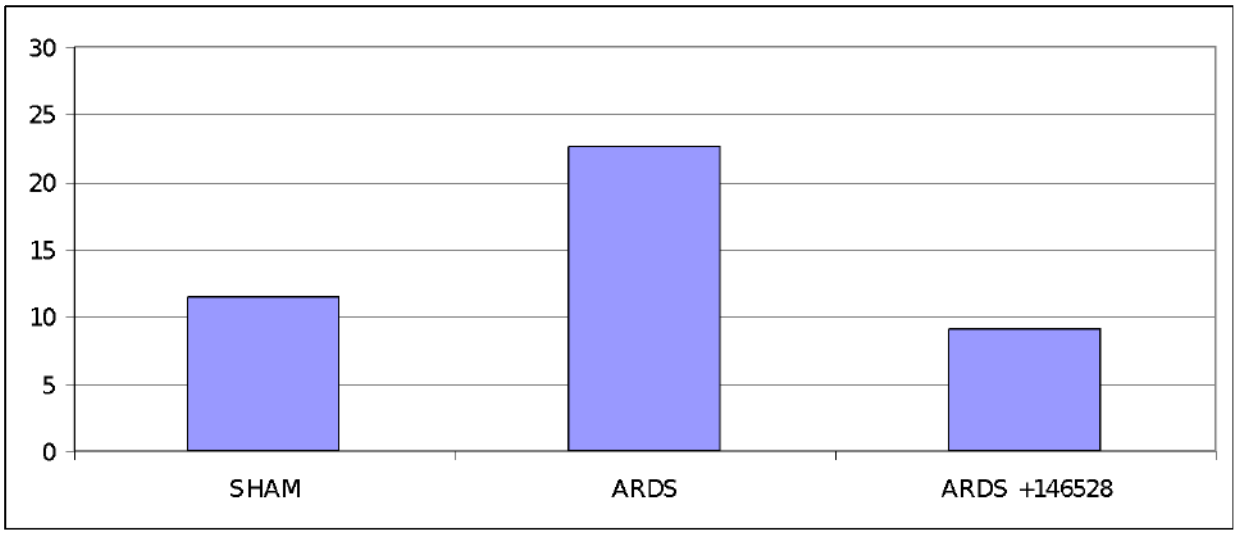


Рисунок 3.29. Зміни (в відсотках) кількості НЕТозу у нейтрофілах, виділених з удавано-оперованих щурів (SHAM), щурів з моделюванням

гострого респіраторного дистрес синдрому, та щурів, що паралельно з моделюванням отримували речовину 146528 за умов активації PMA

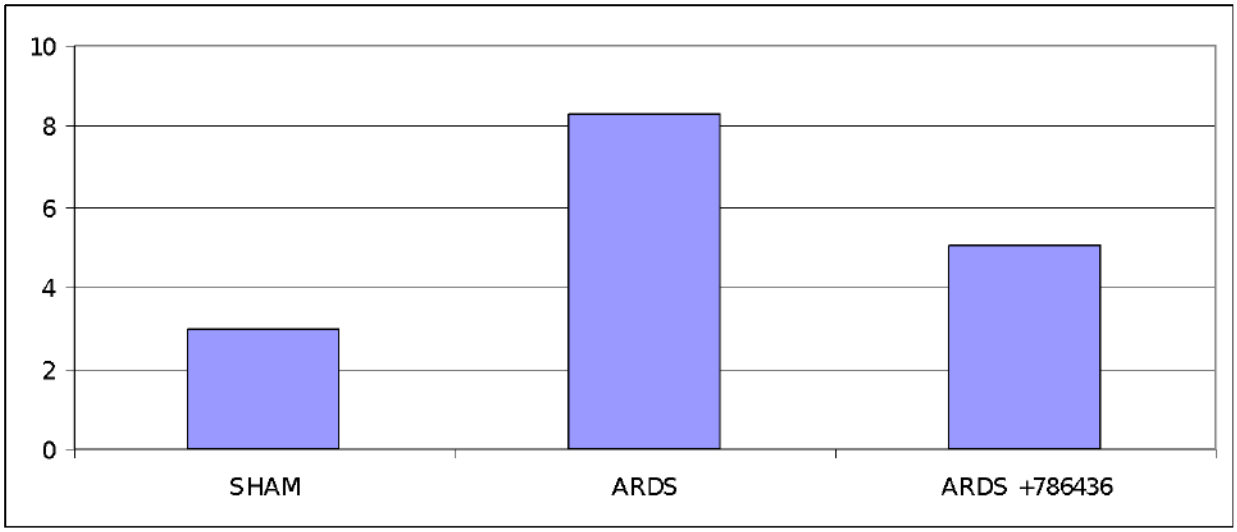


Рисунок 3.30. Зміни (в відсотках) кількості НЕТозу у нейтрофілах, виділених з удавано-оперованих щурів (SHAM), щурів з моделюванням гострого респіраторного дистрес синдрому, та щурів, що паралельно з моделюванням отримували речовину 146528.

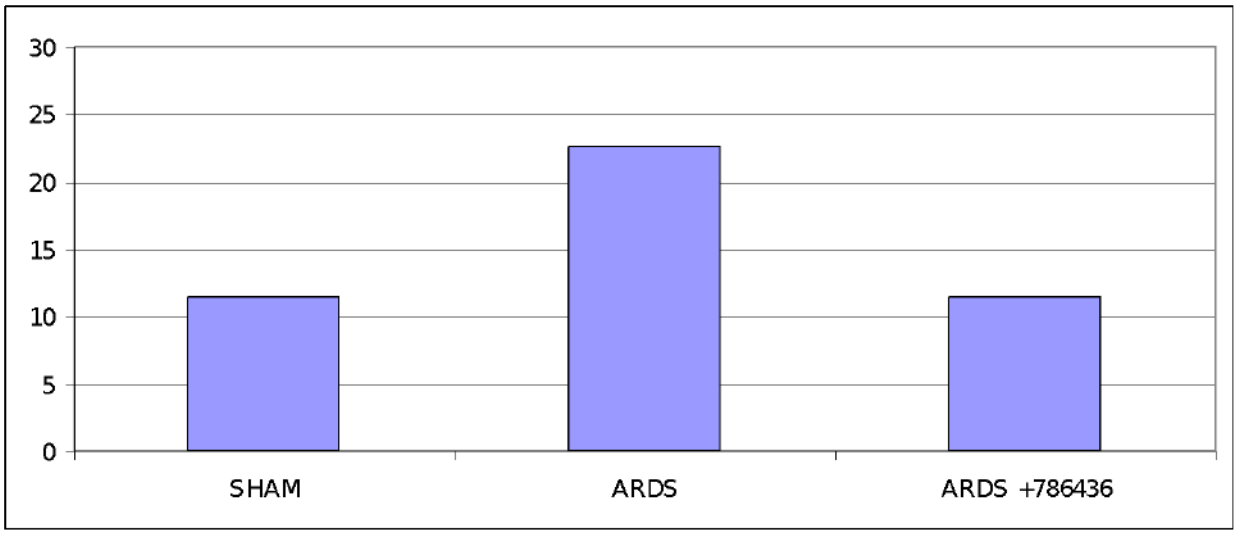
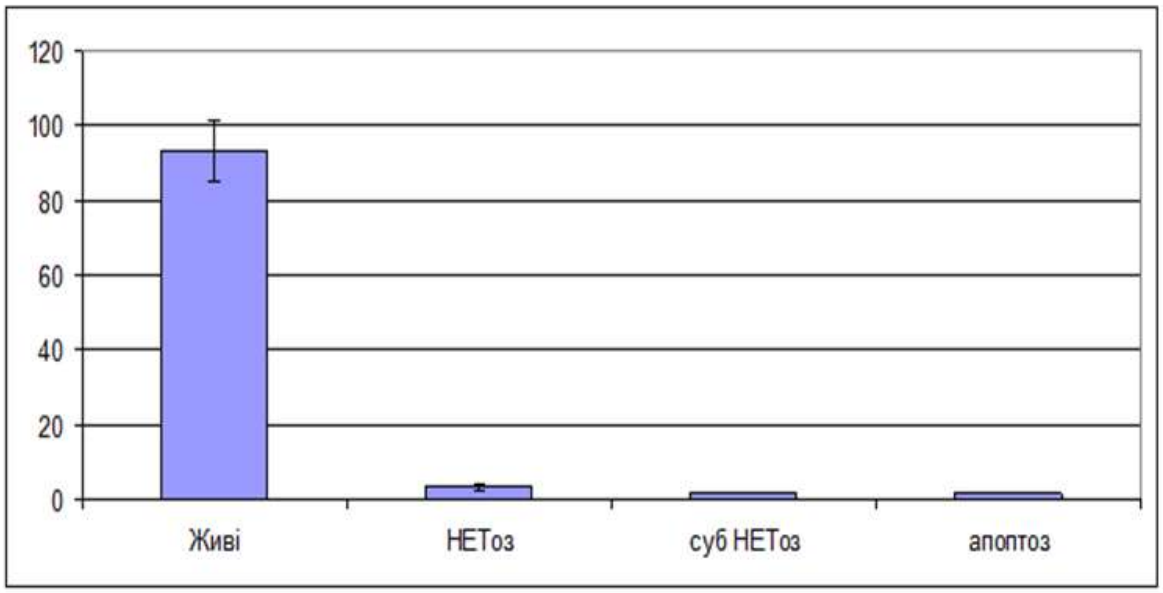
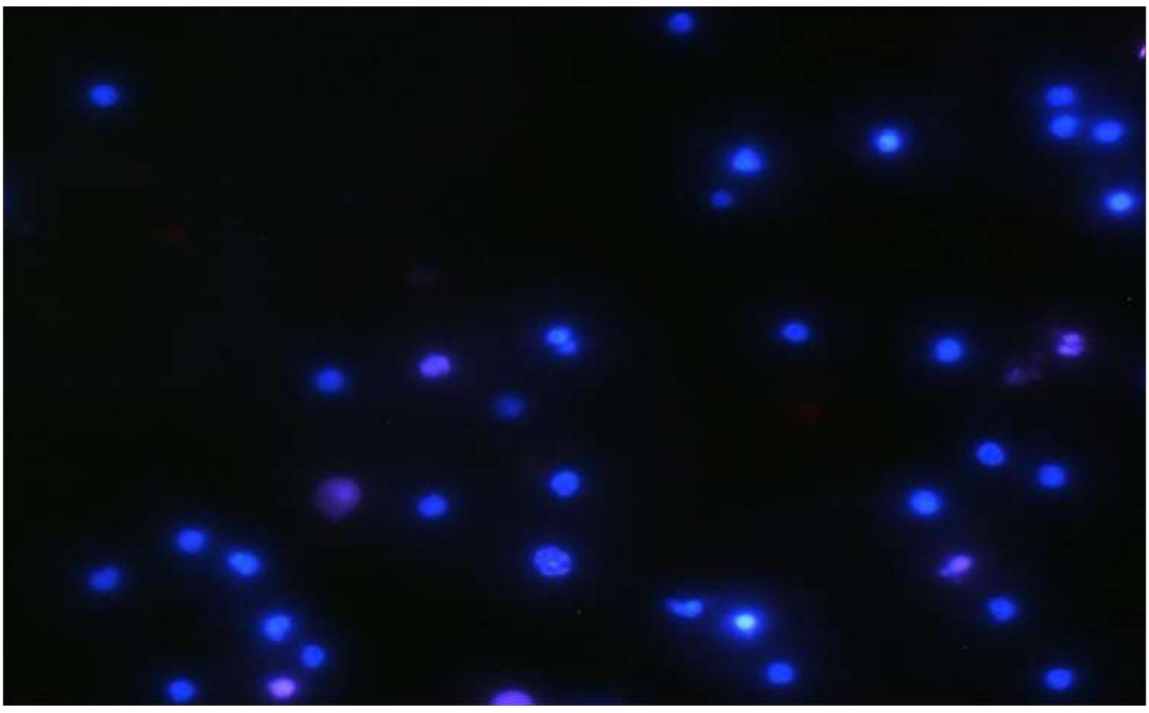


Рисунок 3.31. Зміни (в відсотках) кількості НЕТозу у нейтрофілах, виділених з удавано-оперованих щурів (SHAM), щурів з моделюванням гострого респіраторного дистрес синдрому, та щурів, що паралельно з моделюванням отримували речовину 146528 за умов активації PMA.



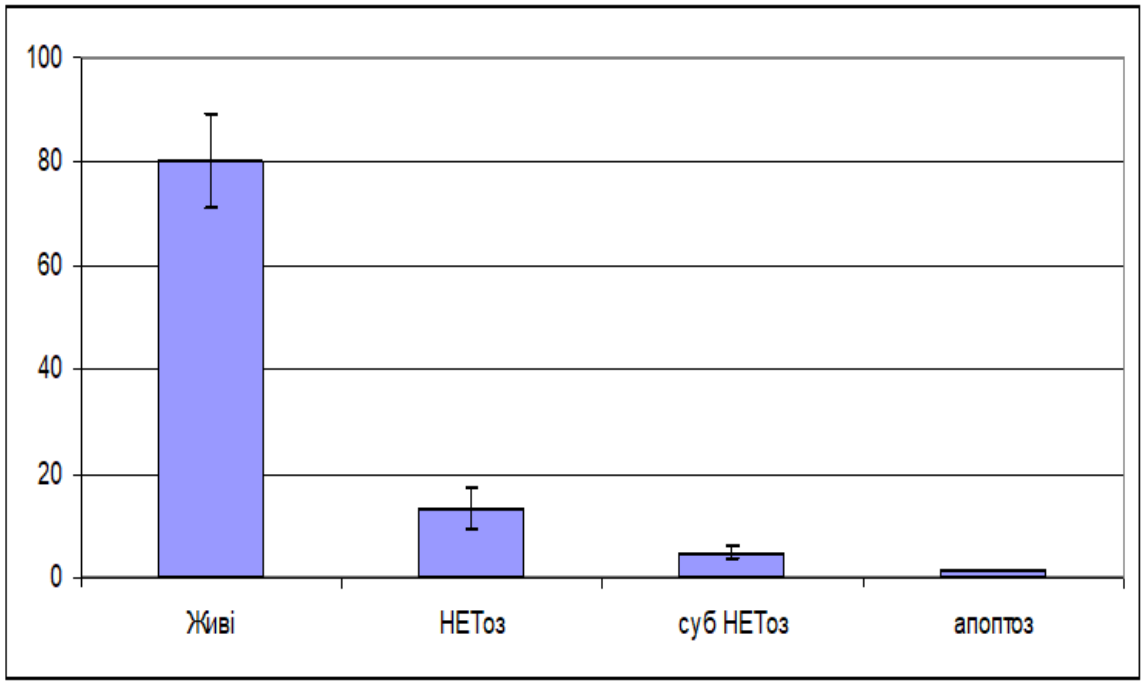
А



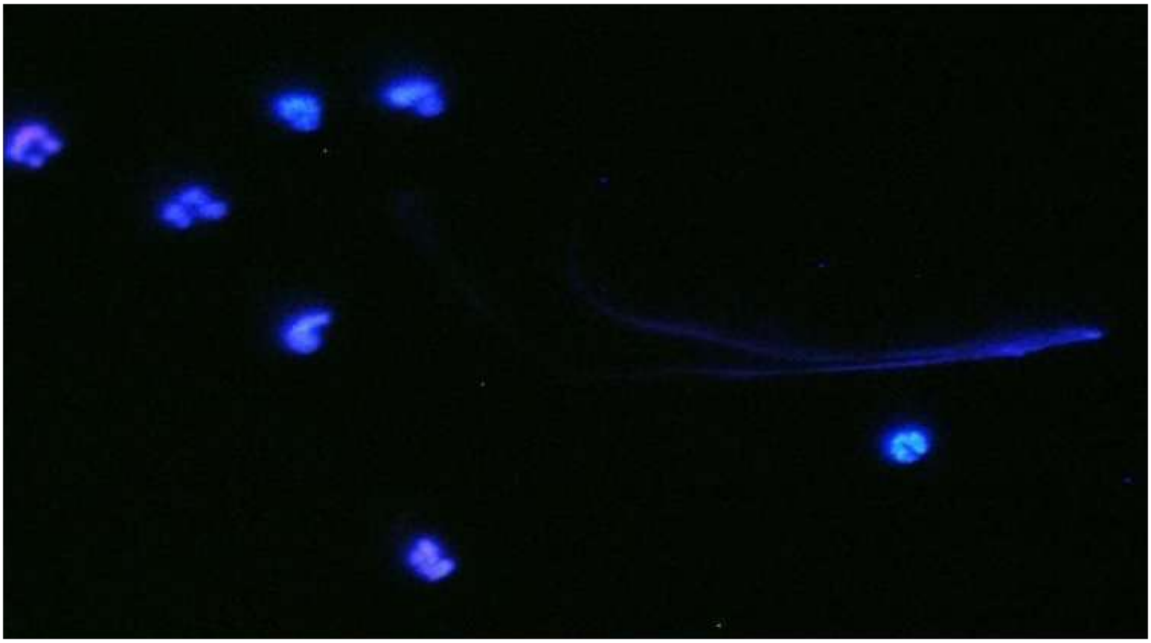
Б

Рисунок 3.32. А) Відсоткове співвідношення нейтрофілів без ознак пасток (Live), з проявами пасток (NETs) та з появами апоптозу (apoptosis), виділених з крові контрольних щурів (група SHAM).

Б) Нейтрофільні гранулоцити, виділені з крові щурів та інкубовані протягом 3х годин в середовищі RPMI (х40, подвійне забарвлення Hoechst - PI)



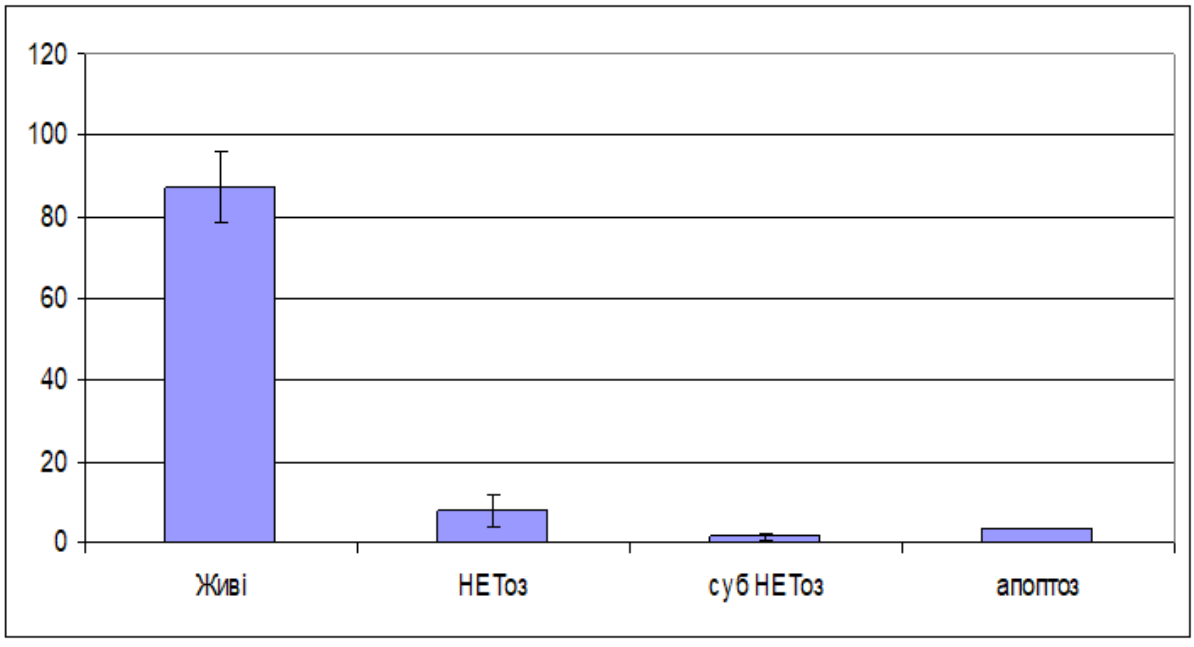
А



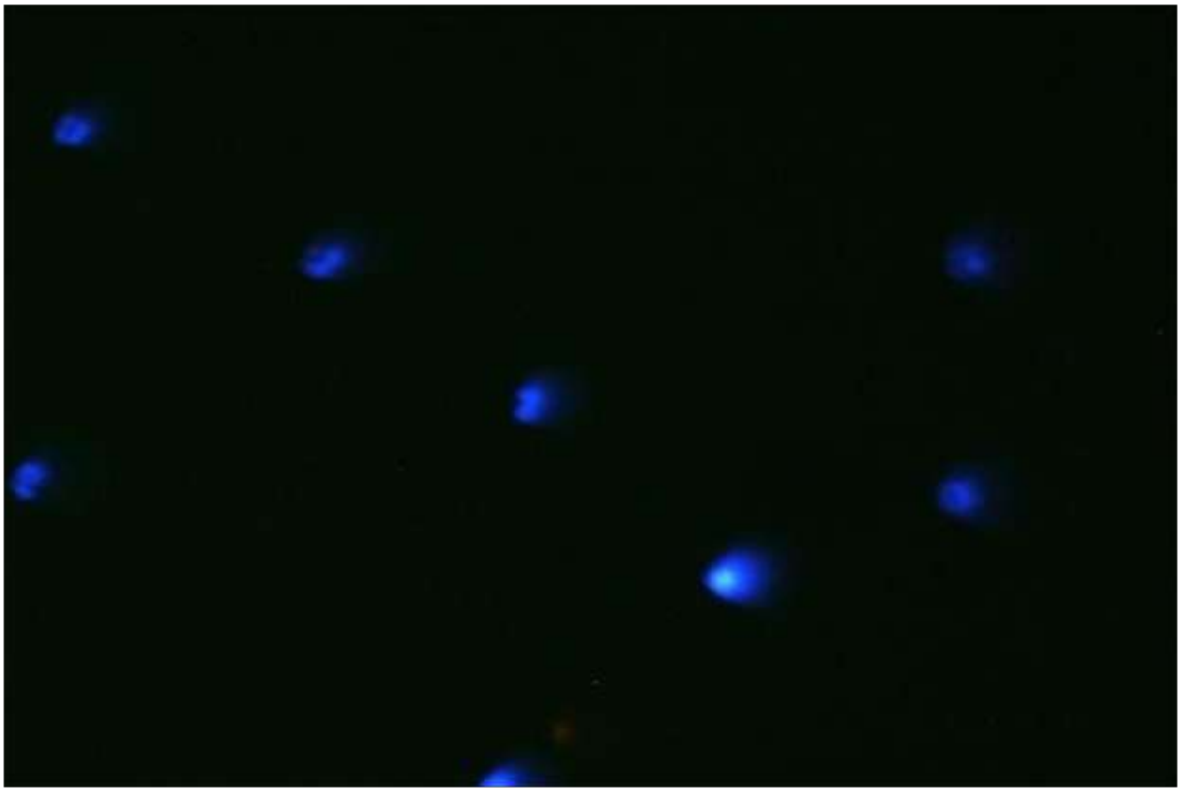
Б

Рисунок 3.33. А) Відсоткове співвідношення нейтрофілів без ознак пасток (Live), з проявами пасток (NETs) та з проявами апоптозу (apoptosis) виділених з крові контрольних щурів (група SHAM) та стимульованих PMA.

Б) Нейтрофільні гранулоцити, інкубовані протягом 3х годин в середовищі RPMI та PMA (x20, подвійне забарвлення Hoechst - PI).



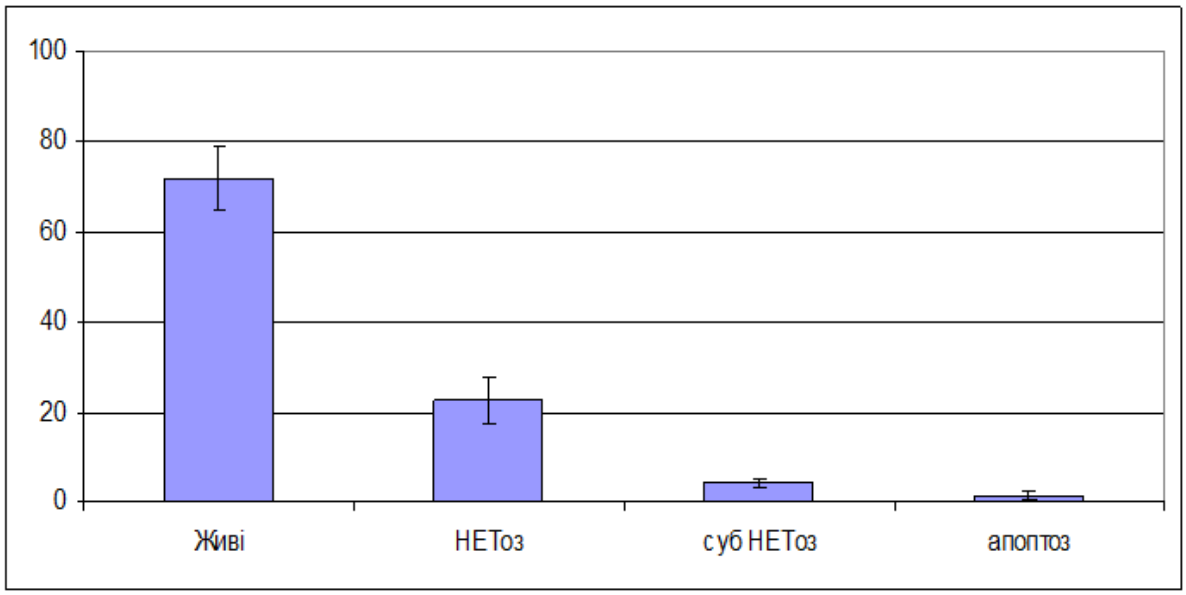
А



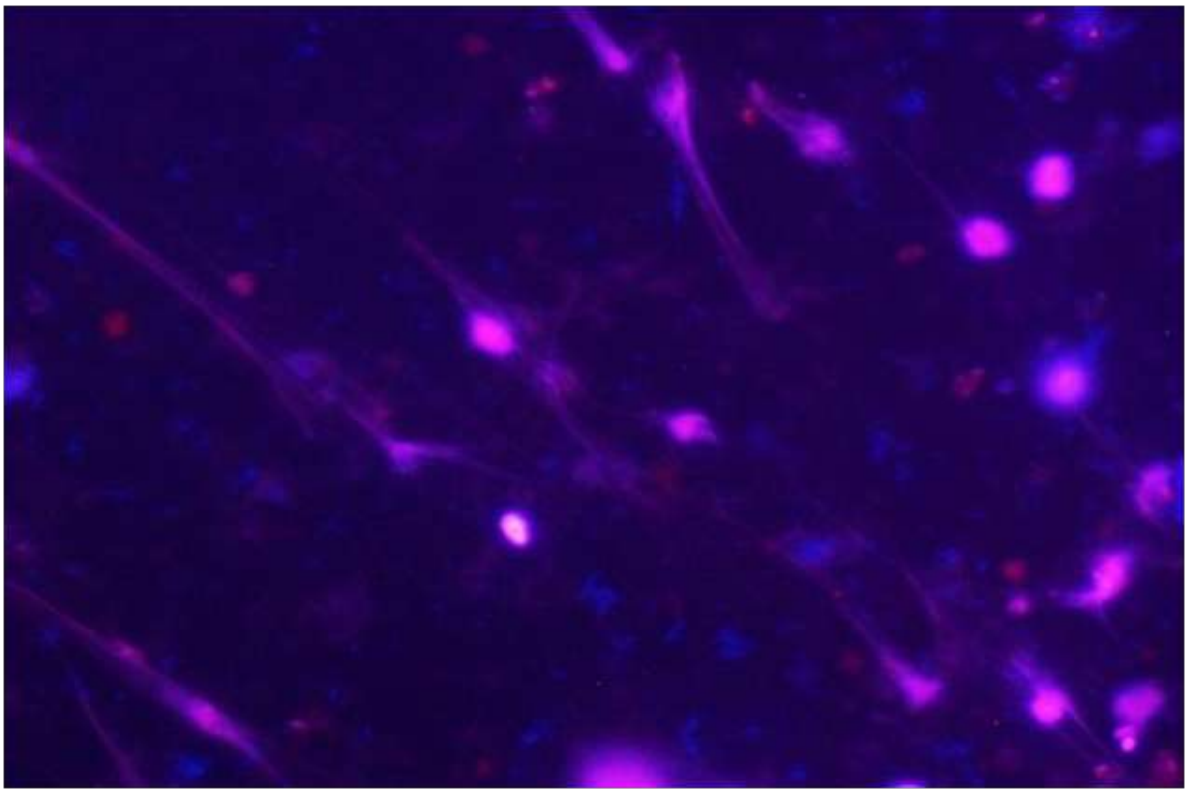
Б

Рисунок 3.34. А) Відсоткове співвідношення нейтрофілів без ознак пасток (Live), з проявами пасток (NETs) та з появами апоптозу (apoptosis) виділених з крові щурів з моделюванням ARDS.

Б) Нейтрофільні гранулоцити, виділені з крові щурів з моделюванням ARDS та інкубовані протягом 3х годин в середовищі RPMI (х20, подвійне забарвлення Hoechst - PI).



А



Б

Рисунок 3.35. А) Відсоткове співвідношення нейтрофілів без ознак пасток (Live), з проявами пасток (NETs) та з появами апоптозу (apoptosis) виділених з крові щурів з моделюванням ARDS після впливу PMA. Б) Нейтрофільні гранулоцити, виділені з крові щурів з моделюванням ARDS

та інкубовані протягом 3х годин в середовищі RPMI та активатором NETозу PMA (х20, подвійне забарвлення Hoechst - PI).

3.2.10. Оцінка вмісту цитокінів у плазмі крові щурів

Визначення кількості цитокінів у плазмі крові щурів проводили методом ELISE. Дані представлені у вигляді Mean±SEM, розмірні одиниці pg/ml.

У щурів із моделюванням ГРДС рівень IL-1β збільшився у 7 разів, порівняно з групою SHAM. Використання інгібіторів PCKß (146528 та 963975) у щурів з ГРДС зменшила рівень IL-1β у 5,4 та у 3 рази, порівняно з не лікованими тваринами (рис. 3.36).

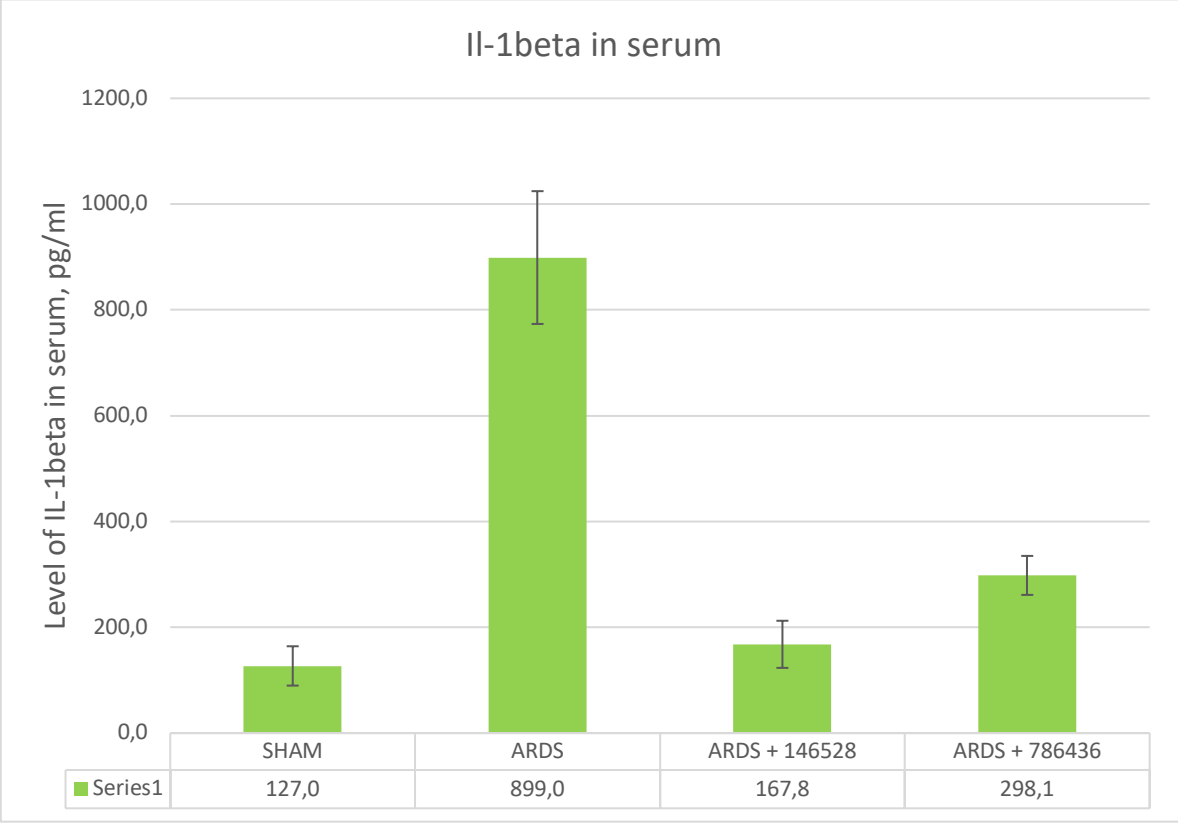


Рисунок 3.36. Вміст IL-1beta у плазмі крові щурів.

У щурів із моделюванням ГРДС рівень інтерлейкіну 6 збільшився у 13 разів, порівняно з групою SHAM. Використання інгібіторів PCKß

(146528 та 963975) у щурів з ГРДС достовірно зменшила рівень IL-6 у 6,1 та у 5,8 рази, порівняно з тваринами групи ГРДС (Рисунок 3.37).

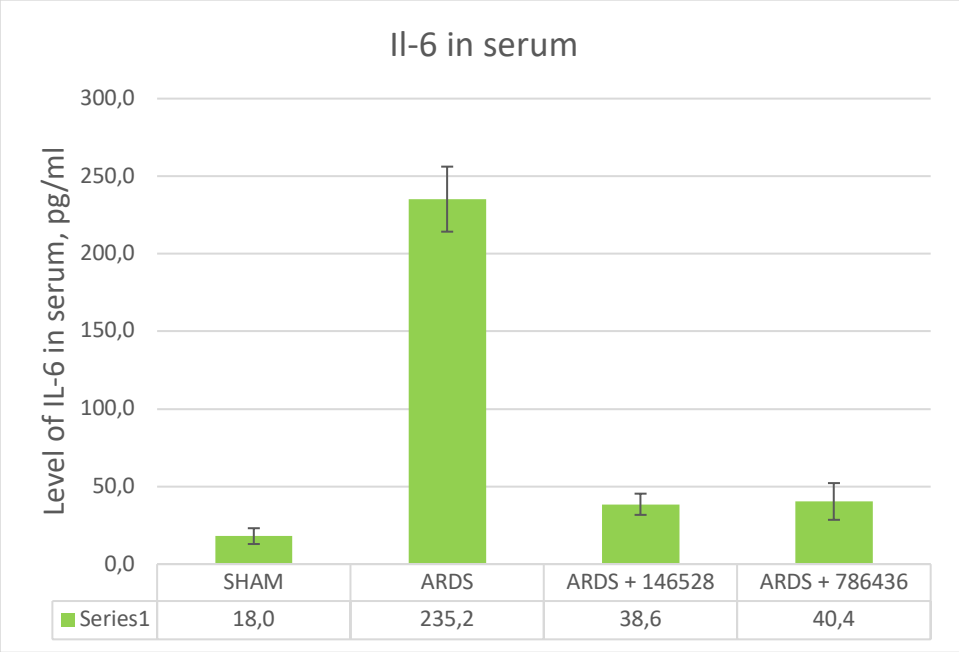


Рисунок 3.37. Вміст IL-6 у плазмі крові щурів.

Рівень ще одного прозапального цитокіну, TNFα, також підвищувався при моделювання гострого респіраторного дистрес синдрому у щурів – 7 разів, порівняно з групою SHAM. Його кількість при ГРДС складає 172,3 пг/мл плазми крові щурів. Використання інгібіторів PCKß (146528 та 963975) у щурів з ГРДС достовірно зменшила рівень TNFα у 3,3 та у 5,3 рази, порівняно з тваринами групи ГРДС (рис. 3.38).

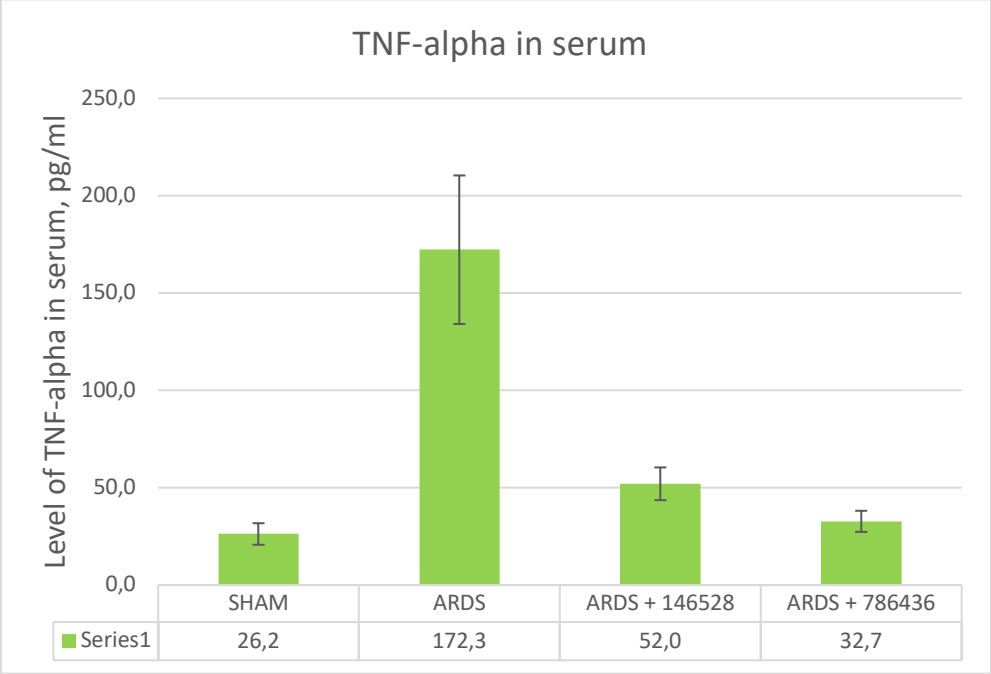


Рисунок 3.38. Вміст TNFalpha у плазмі крові щурів.

Таким чином, було показано, що обидві відібрані для лікування інгібітори PCKß призводять до зменшення інтенсивності системної запальної відповіді організму щура при моделюванні гострого пошкодження легень в тому числі завдяки зменшенню у плазмі циркулюючої крові вмісту Il-1β, Il-6 та TNFα.

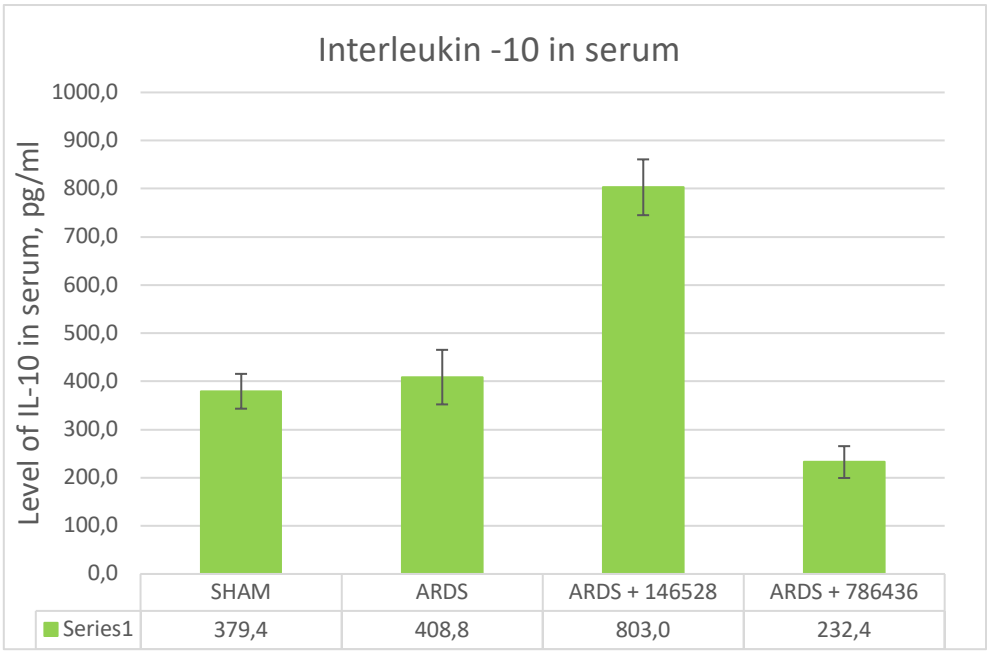


Рисунок 3.39. Вміст IL-10 у плазмі крові щурів.

Далі проводили дослідження вмісту у плазмі крові щурів протизапального цитокіну – інтерлейкіну 10. Було показано, що моделювання ГРДС у старих щурів лінії SHR не призводять до змін вмісту даного цитокіну (рис. 3.39), хоча ряд досліджень вказують на те, що рівень цього цитокіну може бути маркером важкості пошкодження легень. Проте, використання інгібітору PCKß 146528 у щурів із ГРДС призводить до підвищення вмісту Il-10 в плазмі, що може свідчити про активацію процесів, направлених на зменшення системних проявів запального процесу.

3.2.11. Визначення експресії генів, що кодують цитокіни

Відомо, що TNFα та Il-6 є прозапальними цитокінами, рівень яких підвищується при розвитку ряду патологічних станів, у тому числі і ARDS [17, 18]. Інтерлейкін 10 є антизапальним цитокіном, але є дані, що під час гострого пошкодження легень (пневмонія, індукована введенням бактеріального ліпополісахариду) [19] експресія гену, що його кодує, суттєво підвищується. У пацієнтів з гострим респіраторним синдромом рівень цього цитокіну також підвищується в плазмі крові [20].

Для оцінки ефективності нашої моделі ГРДС в роботі проводили визначення експресії генів, що кодують цитокіни (TNFα, Il-6, IL-10, тощо) проводили у тканинах легень методом Real-time PCR. Було показано, що при моделюванні ГРДС рівень експресії гену, що кодує TNFα підвищився у 3,5 рази ($p<0,01$), Il-6 – у 2,6 разів($p<0,01$), і вміст мРНК гену IL-10 збільшився майже у 2 рази (рис. 3.30)

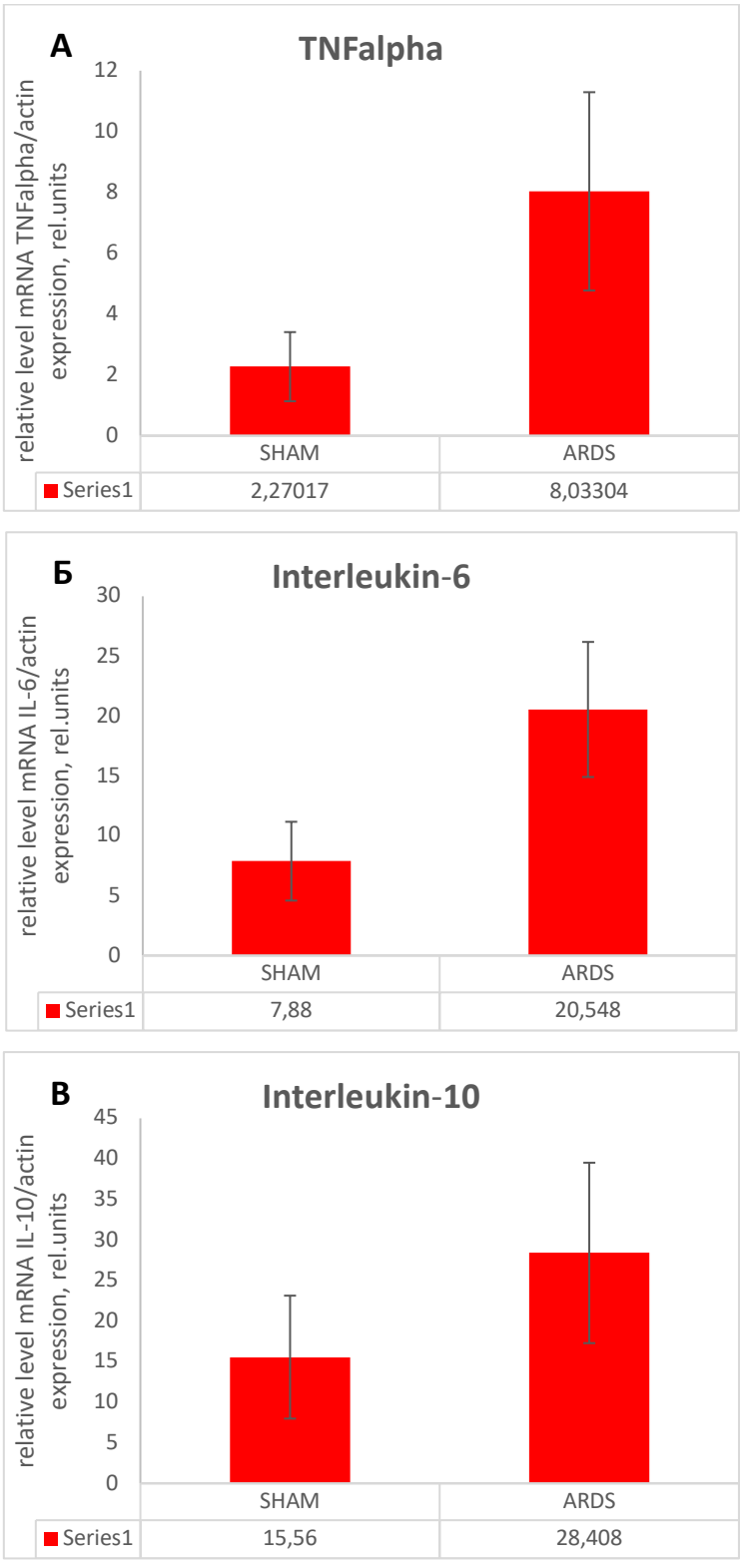


Рисунок 3.30. Відносний рівень експресії генів, що кодують цитокіни TNFα (А), Il-6 (Б), IL-10 (В).

3.2.12. Оцінка ультраструктурних змін у легенях методом світлової мікроскопії

Аналіз отриманого матеріалу показав, що нормовентиляція легень навіть в контрольній групі тварин призводила до зміни архітектоніки легеневої тканини, що проявлялось в потовщенні альвеолярної стінки та зменшенні сумарного об'єму альвеолярного простору за рахунок лейкоцитарної інфільтрації. На окремих ділянках зразків спостерігалось розрихлення та набряк периваскулярної строми, розширення судин з агрегованими еритроцитами, крововиливи та ексудат в альвеолярному просторі, вогнещева руйнація альвеолярних перегородок, виявлялися групи розширених альвеол. Ателектази були відсутні.(Рисунок1. А,В)

Режим гіпервентиляції на фоні введення PolyI:C в значній мірі посилювало зазначені структурні зміни.

Численні вогнищеві геморагії, виникнення яких пов'язане із порушенням проникності судин, а в окремих випадках і руйнуванням судинної стінки, гіперемія судин та агрегація тромбоцитів, периваскулярний та перибронхіальний набряк, лейкоцитарна генералізована інфільтрація, заповнення альвеолярного простору десквамованими альвеоцитами, еритроцитами та лейкоцитами (в складі яких збільшується відсоток нейтрофілів), а на окремих ділянках досліджуваної тканини заповнення альвеол ексудатом та еозин-позитивними утвореннями (гіалінові мембрани), чередування ателектазних ділянок і зон з ознаками енфіземи, фрагментація базальної мембрани окремих бронхіол, часткове злущування бронхіального епітелію, наявність лейкоцитарних інфільтратів в просвіті бронхів свідчать про значні функціональні порушення, пов'язані із кровопостачанням легень, підвищенням альвеолярного поверхневого натягу, та

формуванням численних зон з унеможливленим газообміном. (Рисунок 3.31. C,D,I.F)

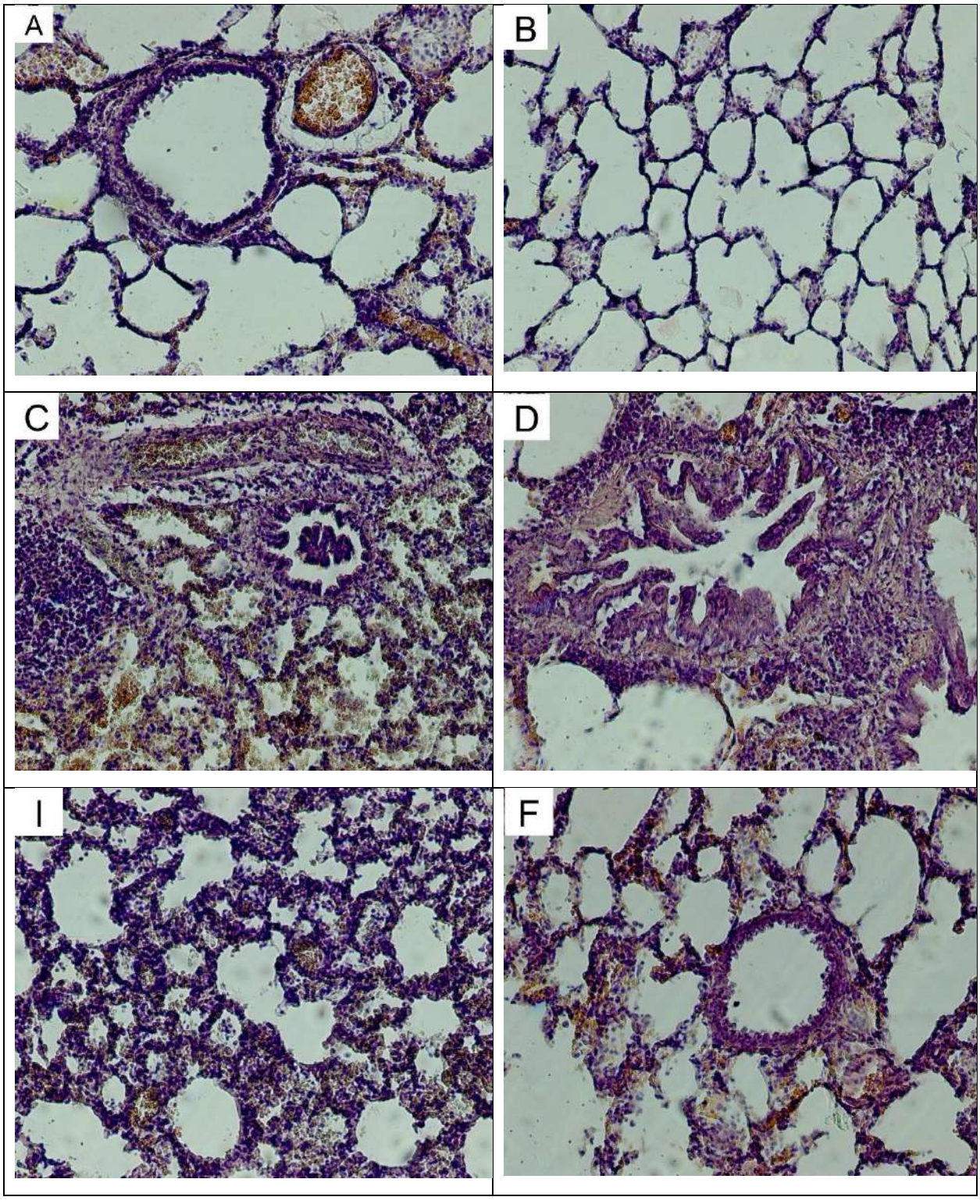


Рисунок 3.31. Гістологічні препарати (гематоксилін-еозин) легеневої тканини експериментальних тварин. А, В - Легені щурів після операції в режимі нормовентиляції із інтратрахеальним введенням фізіологічного

розчину . Периваскулярний набряк, в розширених судинах агреговані еритроцити, альвеоли вогнищево розширені з частковою руйнацією алвеолярних перегородок, незначна інфільтрація лейоцитів Зб.Х100.

C, D, I, F - Легені щурів після операції в режимі гіпервентиляції на фоні ін'єкції PolyI:C. Виражена геморагія, еритроцити щільно заповнюють повітряний простір альвеол, значна лейкоцитарна інфільтрація, як в зоні адвентиції бронхіол, так і в паренхімі легень. Різко скорочені бронхіоли, просвіт бронхіоли, заповнений лейкоцитами та злущеним епітелієм (C, D) Спостерігається значне потовщення міжальвеолярних перегородок та зменшення об'єму альвеолярного простору (I), в окремих альвеолах спостерігаються гіалінові утворення. (F) ЗбХ100.

Застосування інгібіторів протеїнкінази С попереджувало генералізований характер структурних порушень в паренхімі легень піддослідних тварин, що проявлялось в зниженні рівня інтерстиціального набряку, зменшення кількості лейкоцитів, як в повітряному просторі альвеол, так і безпосередньо в між альвеолярних перегородках. Прояви геморагії та гіперемії локально зберігались, проте їх площа на досліджуваних зрізах суттєво знижувалась (Рисунок 3.32, 3.33).

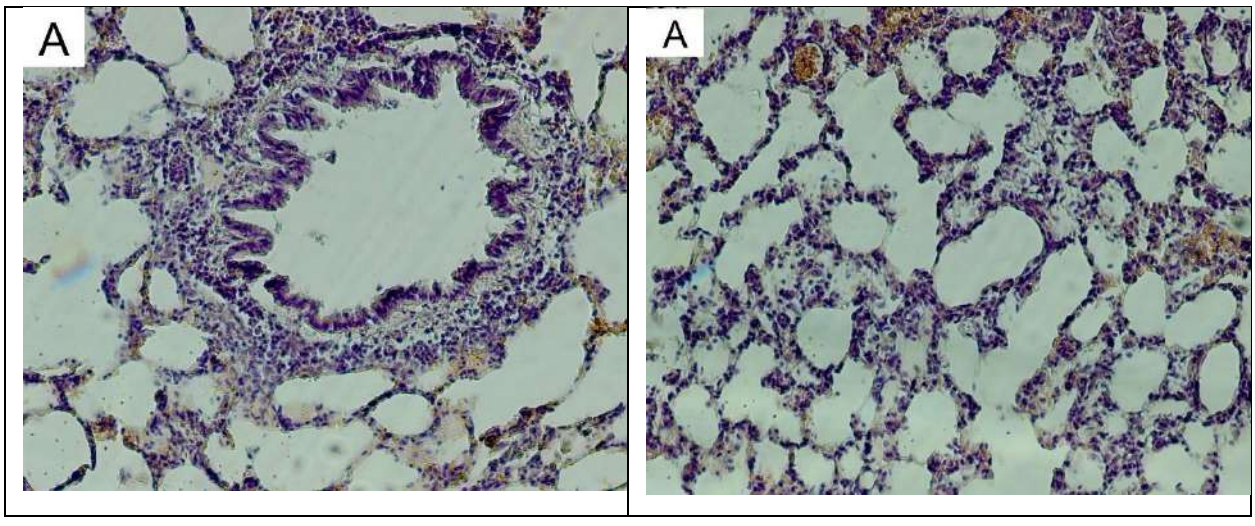


Рис 3.32. Легені щурів після гіпервентиляції та ін’єкції Poly I:C на фоні введення речовини 146528. Збх100

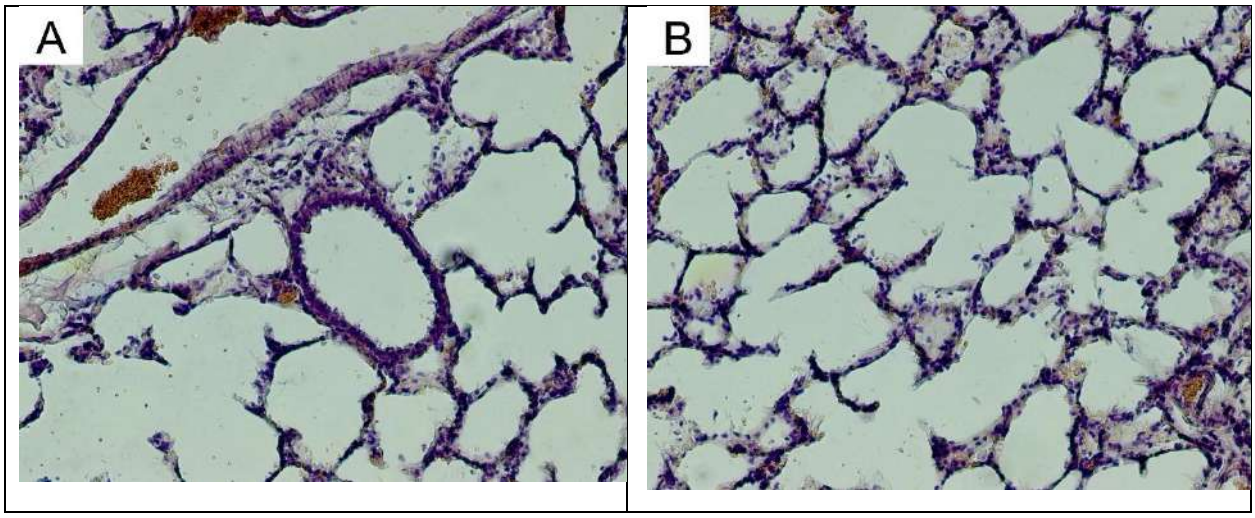


Рис 3.33. Легені щурів після гіпервентиляції та ін’єкції Poly I:C на фоні введення речовини 963975. Збх100

При іммуногістохімічному виявленні нейтрофільних позаклітинних пасток відмічалось значне зменшення їх кількості, як в паренхімі легень, так і в зонах адвентиції бронхіол. Ефект застосування інгібіторів протеїнкінази С проявився і при морфометричніому вивчені тканин.

Морфометричний аналіз тканини легень показав, що режим гіпервентиляції підвищував більшість показників в тій чи іншій мірі. Так, параметри, які характеризують структурні зміни в субмукозному шарі, а саме: %Tao %Wao підвищувались на 35% ($p \leq 0.01$) та 12% (статистично не достовірно) відповідно, а показник %Tat на 16% ($p \leq 0.01$) в порівнянні із такими в контрольній групі. Значення параметрів, які відображають деформацію мукозного шару у випадку показника %Tai, в розрахунку якого враховуються зміни площі просвіту бронхіоли, підвищувався на 5%, ($p \leq 0.01$) в той час як показник %Wai (в розрахунок якого площа просвіту бронхіоли не включається), знижувався на 13% (статистично не достовірно) в порівнянні з контролем. Така різниця пояснюється суттєвим зменшенням площі просвіту бронхіоли при застосуванні режиму гіпервентиляції, що

відображає параметр %Wab, який в дослідах з моделюванням ГРДС по відношенню до контрольних значень знижувався на 10% ($p \leq 0.01$) (Рисунок 3.34).

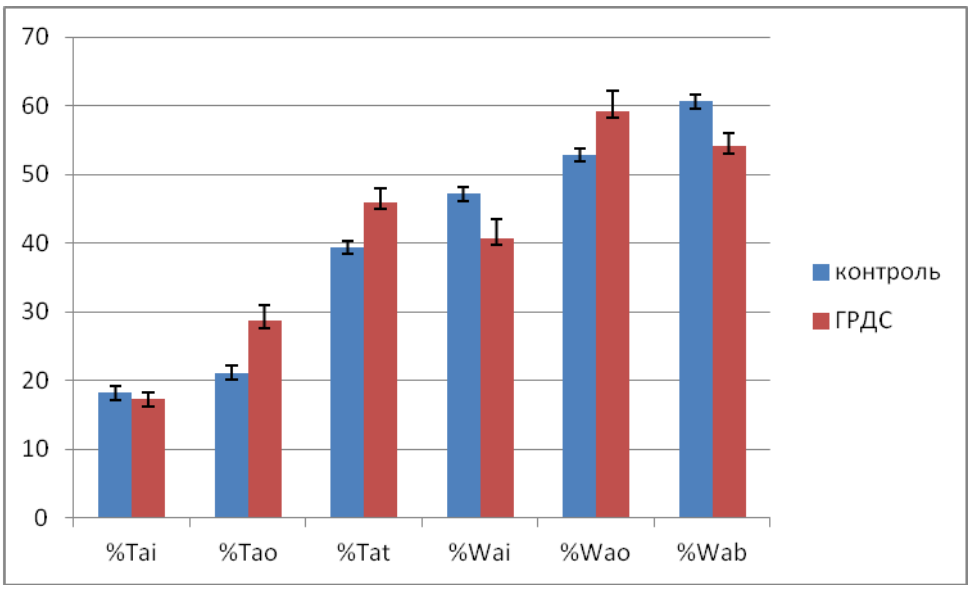


Рисунок 3.34. Морфометричний аналіз параметрів стінок бронхіол в контрольній групі тварин та в групі із моделюванням ГРДС.

Деформація та потовщення стінок бронхіоли відбуваються за рахунок набряку, розрихлення сполучної тканини та лейкоцитарної інфільтрації. Скорочення гладеньких м'язів призводить до звуження просвіту повітроносних шляхів. Інгібітори протеїнкінази С, ефективність яких була проаналізована та доведена в дослідах *in vitro* на культурі нейтрофілів, суттєво змінювали динаміку вищезазначених змін, викликаних застосуванням режиму гіпервентиляції. Так, введення речовини 146528 знижувало такі показники як %Tao, %Wao та %Tat на 20%, 14%, та 6%, а речовина 963975 – на 19%, 10% та 13% відповідно по відношенню до таких в групі із моделюванням ГРДС. Значення показника %Tai у випадку застосування речовини 1 зростало на 17%, а значення %Wai на 20% в порівнянні із групою тварин, які перебували в режимі гіпервентиляції. Застосування речовини 963975 практично не впливає на значення показника %Tai, проте показник %Wai підвищувався в порівнянні із групою ГРДС на 14%, та практично повертався до контрольних значень.

Інгібітори протеїнкінази С збільшували площу просвіту бронхіоли (%Wab) в порівнянні з групою тварин з моделюванням ГРДС, а відповідно, розширювали повітроносні шляхи на 5% у випадку застосування речовини 1 і на 11% у випадку застосування речовини 963975 (рис 3.35).

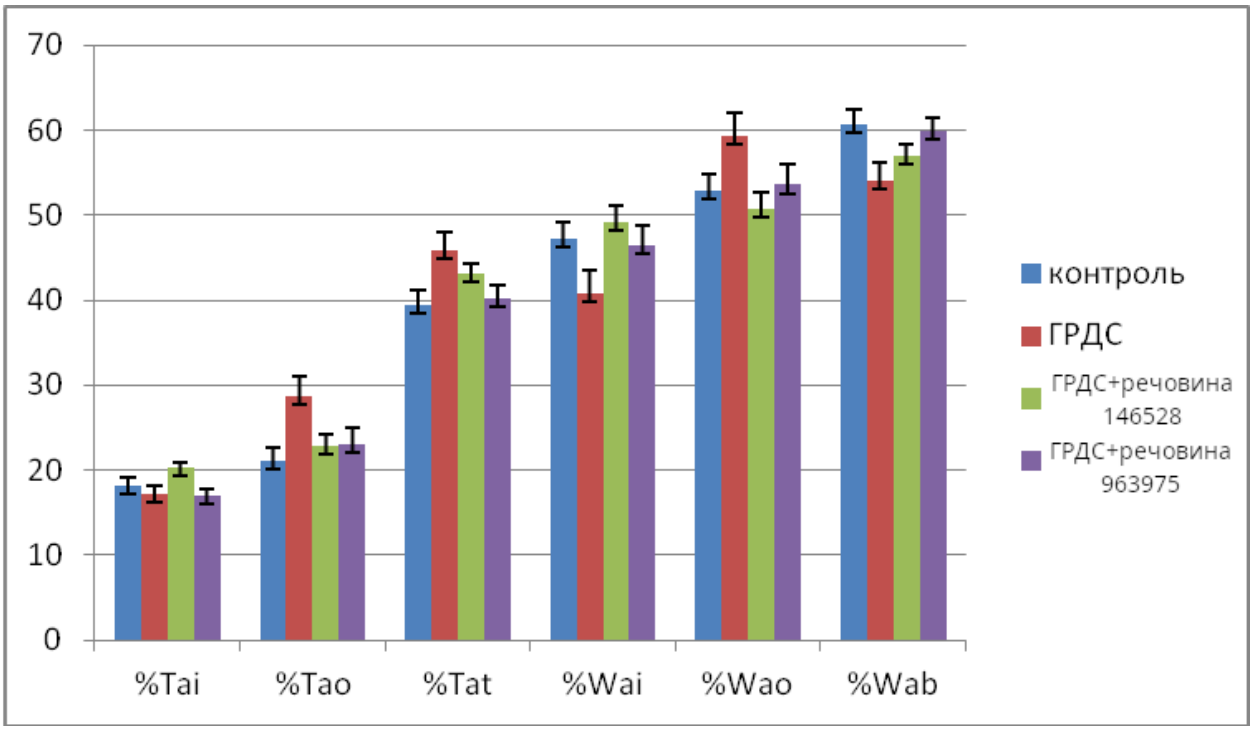


Рисунок 3.35. Морфометричний аналіз параметрів стінок бронхіол в контрольній групі тварин, в групі із моделюванням ГРДС та при застосуванні інгібіторів протеїнкінази С.

Необхідно відмітити, що виходячи із статистичного аналізу структурні зміни, які детектувались у щурів кожної із проаналізованих груп, хоч і були одно направленими, проте мали, в значній мірі, індивідуальний характер. Рисунок (3.36, 3.37, 3.38, 3.39).

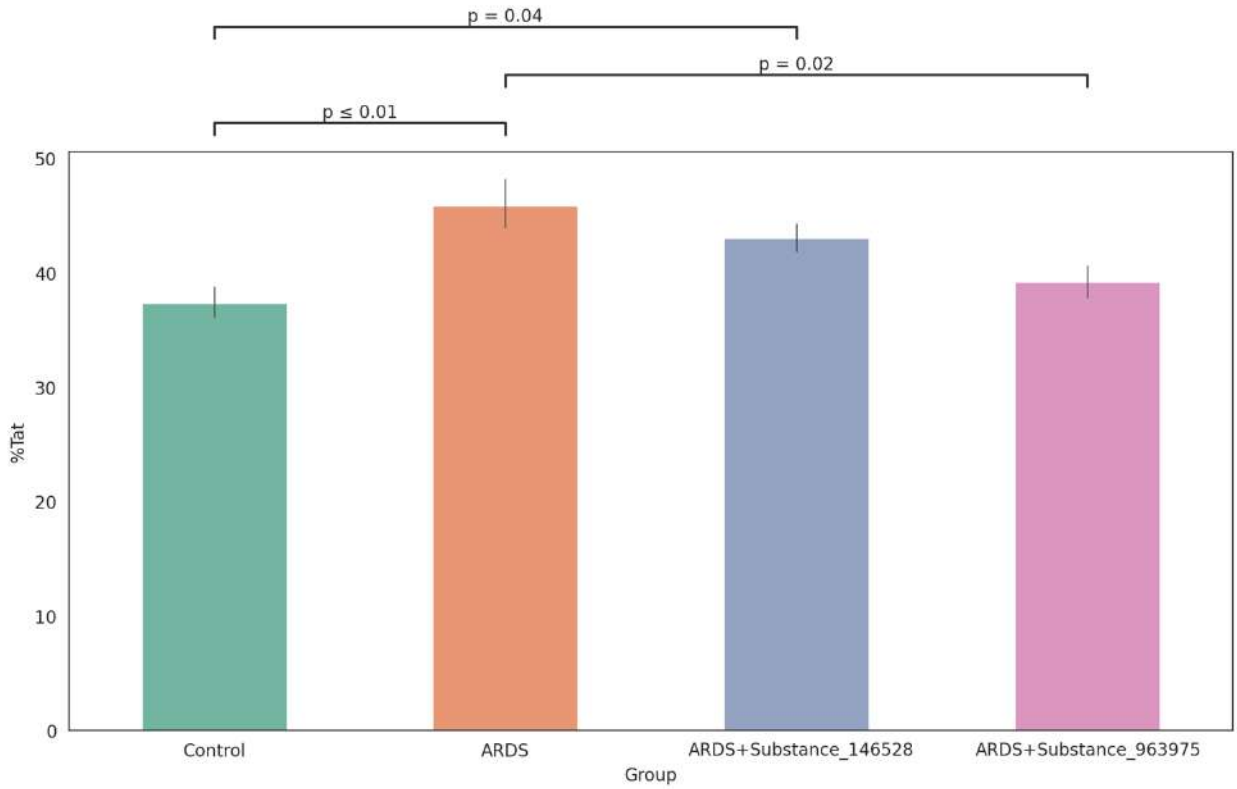


Рисунок 3.36. Порівняння достовірності впливу речовин на показник %Tat при моделюванні ГРДС

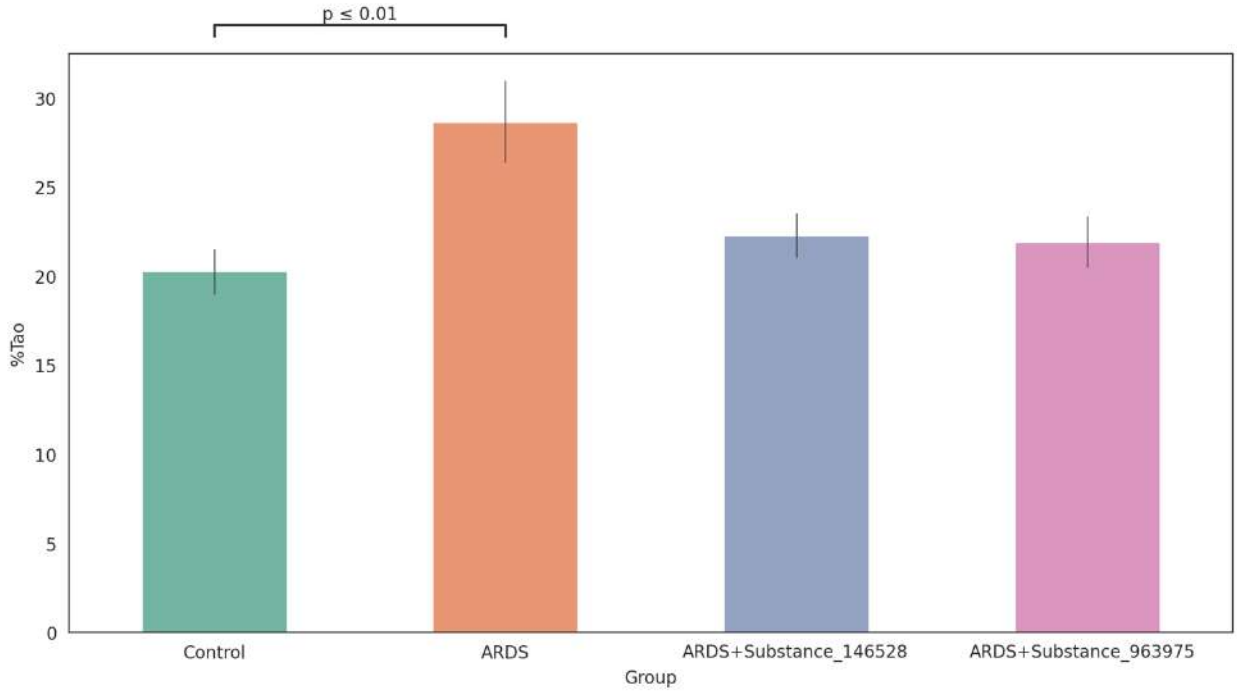


Рисунок 3.37. Порівняння достовірності впливу речовин на показник %Tao при моделюванні ГРДС

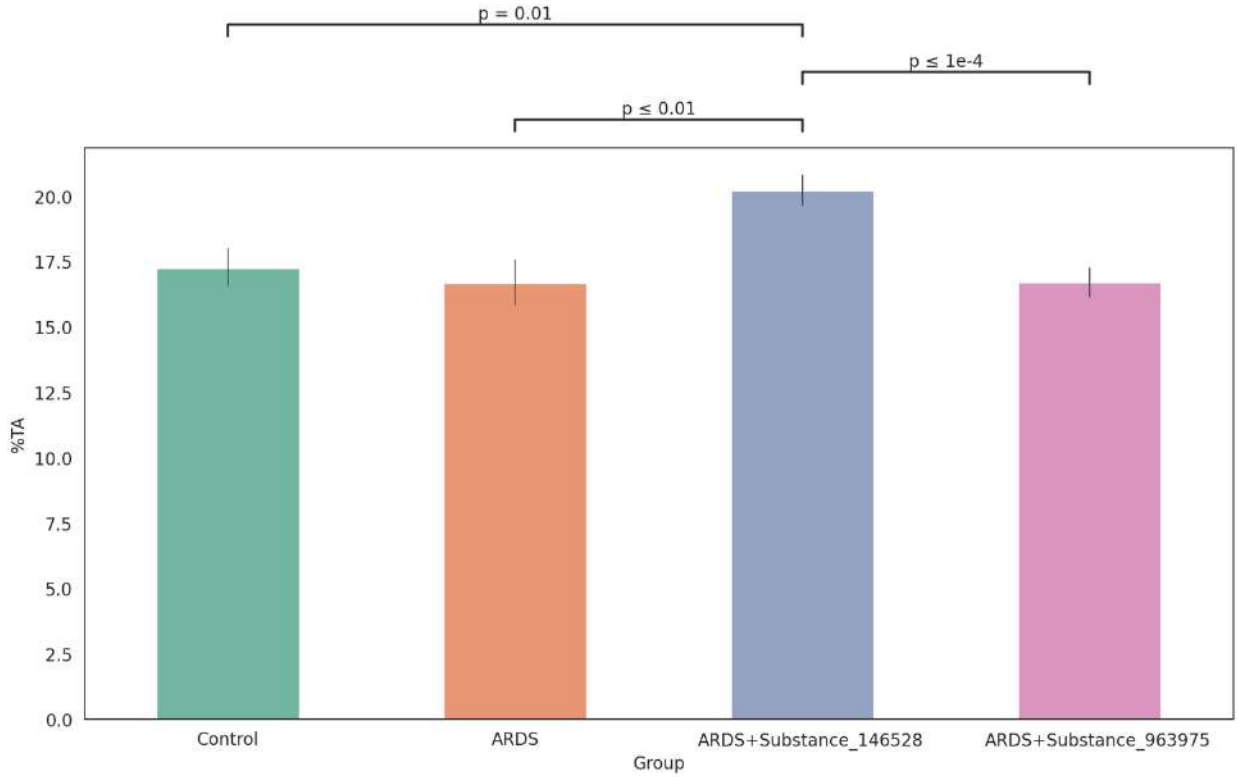


Рисунок 3.38. Порівняння достовірності впливу речовин на показник %Tai при моделюванні ГРДС

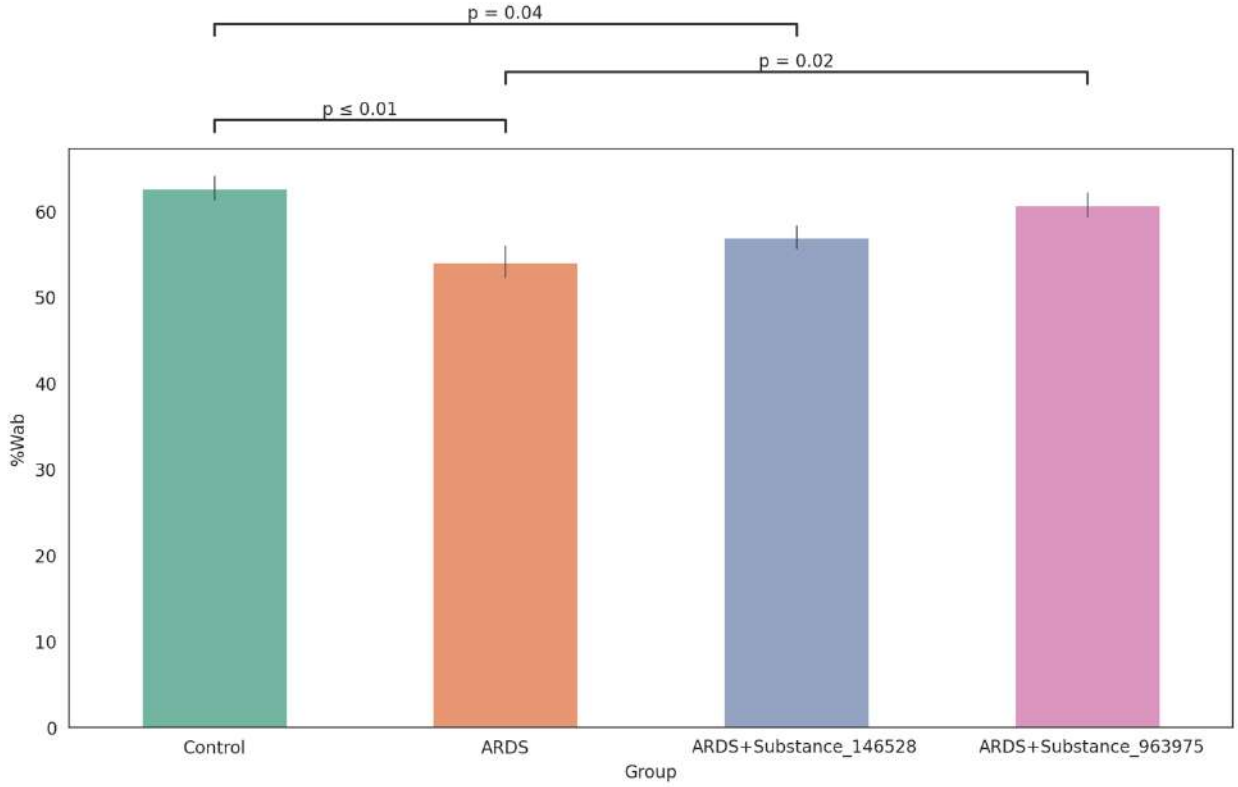


Рисунок 3.39. Порівняння достовірності впливу речовин на показник %Wab при моделюванні ГРДС

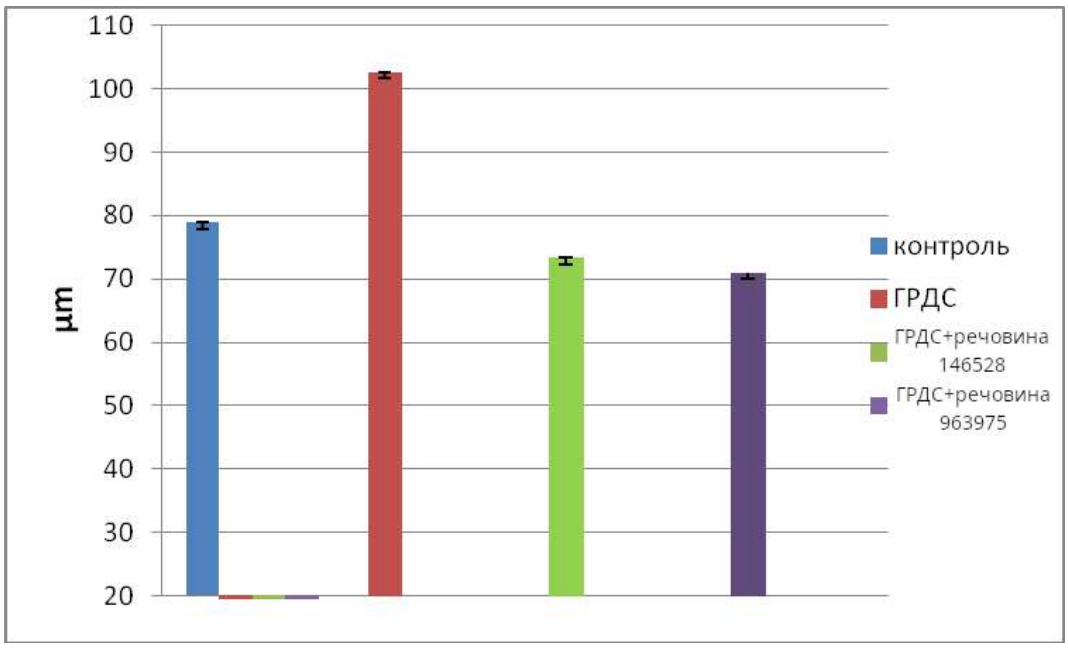


Рисунок 3.40. Товщина міжальвеолярних перегородок в усіх експериментальних групах тварин.

В експериментах із моделюванням ГРДС також спостерігалось значне потовщення стінок альвеол за рахунок інтерстиціального набряку та лейкоцитарної інфільтрації. Відповідно суттєво зменшився об'єм повітряного простору альвеол. Морфометричний аналіз показав, що режим гіпервентиляції підвищував товщину міжальвеолярних перегородок на 30% ($p \leq 1e\text{-}5$) і знижував об'єм альвеол на 17% ($p \leq 1e\text{-}5$) в порівнянні з контролем . Речовини в деякій мірі попереджали цей ефект, знижуючи рівні набряку та лейкоцитарної інфільтрації. Зокрема, застосування речовини 146528 знижувало товщину стінок альвеол на 28% ($p \leq 1e\text{-}5$), у випадку введення речовини 963975 цей показник знижувався на 30% ($p \leq 1e\text{-}5$) в порівнянні із групою з моделюванням ГРДС (Рисунок 40, 42). Суттєво зменшилась кількість нейтрофілів, які містили цитрулінований гістон H3 і вже

сформованих нейтрофільних позаклітинних пасток. Об'єм альвеол зростав на 45% (p≤1e-5) і 46%(p≤1e-5) відповідно (рис 3.41, 3.43).

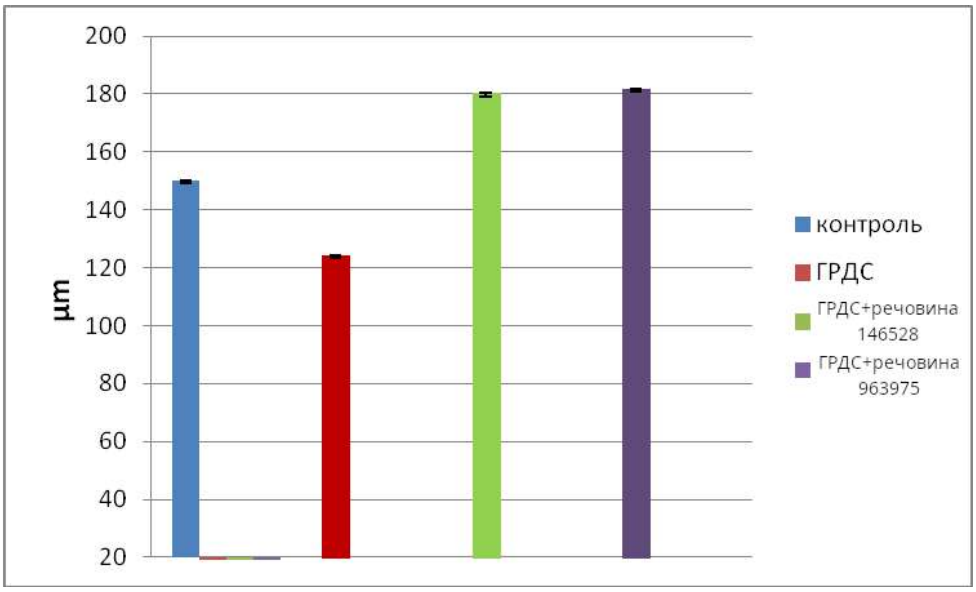


Рисунок 3.41. Об’єм повітряного простору альвеол в усіх експериментальних групах

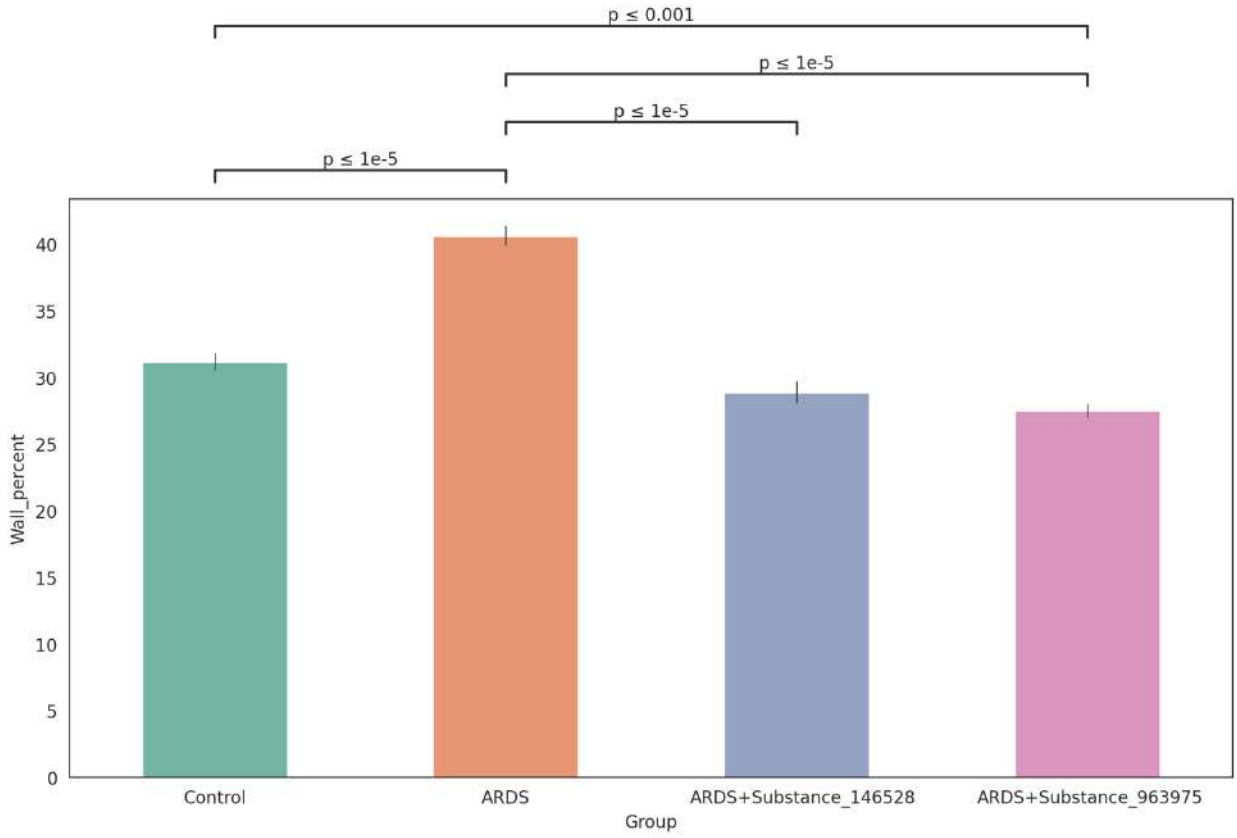


Рисунок 3.42. Порівняння достовірності впливу речовин на товщину стінок альвеол при моделюванні ГРДС.

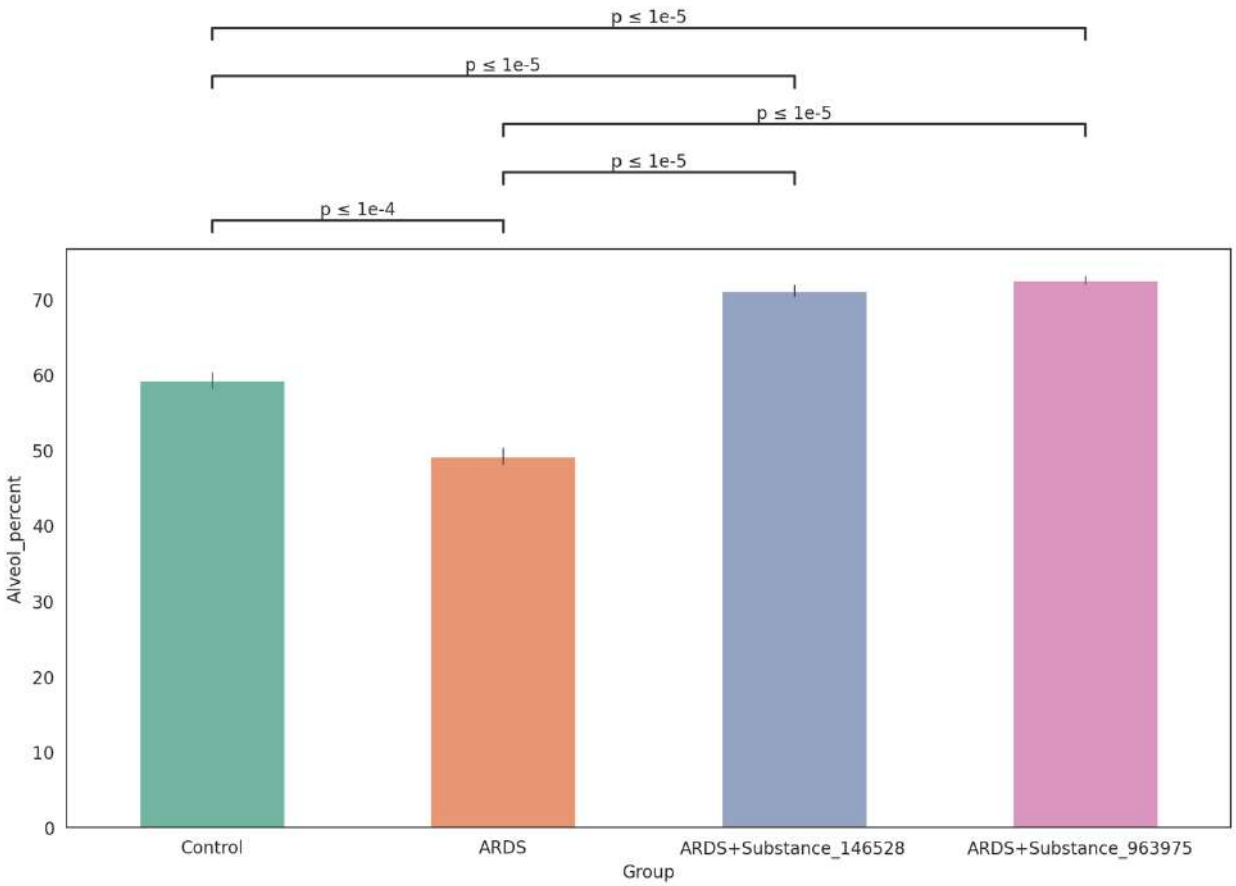


Рисунок 3.43. Порівняння достовірності впливу речовин на об’єм повітряного простору альвеол при моделюванні ГРДС.

Таким чином, режим гіпервентиляції протягом 4 годин призводить до значних пошкоджень в структурі паренхіми легень експериментальних щурів. Ці зміни відображають суттєві порушення мікроциркуляції в тканинах, порушення проникності та руйнування стінок судин, вказують на розвиток запальних процесів і значне зниження функціонального потенціалу органу в цілому. Застосування інгібіторів протеїнкінази С попереджувало ці структурні зміни, особливо це стосується речовини 963975, яка, як показала морфометрія, повертала більшість проаналізованих показників практично до контрольних значень.

ВИСНОВКИ

1. Оптимізовано ліганд-орієнтовані фармакофорні моделі інгібіторів протеїнкінази PKCB людини. Побудовано 58 фармакофорних моделей зі здатністю ідентифікувати активні інгібітори з тестової вибірки більше 60%. За результатами фармакофорного скринінгу колекції більше 150000 лігандів відносно них відібрано 4500 сполук.

2. Проведено аналіз 150000 комплексів, отриманих молекулярним докінгом колекції більше 150000 лігандів в АТФ-зв'язуючий сайт PKCB і відібрано 300 сполуку, що були накладені на результати фармакофорного моделювання. Таким чином для біохімічного тестування відібрано 48 кращих сполук по обох скринінгах.

3. Моделювання ГРДС за допомогою інтратрахеального введення PolyI:C і гіпервентиляції призводить до збільшення опору верхніх дихальних шляхів, а також зменшення їх розтяжності і зниження тканинної еластичності.

4. Даний вплив супроводжувався змінами концентрації вільної ДНК у бронхолегеневому лаважі, а також у плазмі крові щурів із ГРДС порівняно із щурами з вдаваним втручанням, що пов'язано із збільшенням формування нейтрофільних екстрацелюлярних пасток.

5. При моделюванні ГРДС підвищувався рівень NETозу у виділених нейтрофільних гранулоцитах дослідних тварин, крім того, їх стимуляція давала більш виражений NETоз порівняно з контрольною групою.

6. Рівень експресії генів, що кодують TNF-α, IL-6, IL-10 достовірно підвищувався в моделі ГРДС

7. Всі вищезазначені зміни супроводжувалися значними відмінностями морфологічної картини тканин легень, що мали особливості,

характерні для початкових стадій розвитку гострого респіраторного дистрес синдрому.

8. Визначено ефективність впливу трьох низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази С бета (PKCB) як ключового ферменту активації нейтрофільних гранулоцитів із утворенням NETs.

9. Відібрані речовини демонстрували відсутність цитотоксичності та наявність дозозалежності в активності щодо протеїнкінази С-бета

10. На моделі гострого респіраторного дистрес синдрому показано зниження відповіді нейтрофільних гранулоцитів у вигляді НЕТозу (як спонтанного, так і індукованого).

11. Взяті разом, отримані результати свідчать про те, що відібрані речовини є перспективними кандидатами для подальшого дослідження їх якостей для можливого використання в фармакології і затвердження у якості медичних препаратів з властивістю пригнічення протеїнкінази С.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Haitao Li, Xiaoting Zhou, Hongyi Tan, Yongbin Hu et al. Neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of acid-aspiration-induced ALI/ARDS // Oncotarget. 2017 Nov 28;9(2):1772-1784.

2. E Lefrançais, Beñat Mallavia, Hanjing Zhuo, Carolyn S Calfee et al. Maladaptive role of neutrophil extracellular traps in pathogen-induced lung injury // JCI Insight. 2018 Feb 8;3(3).

3. G. Bellani, John G. Laffey, Tài Pham, et al. Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries // JAMA. 2016; 315(8): 788-800.

4. Peter G Gibson, Ling Qin and Ser Hon Puah. COVID-19 acute respiratory distress syndrome (ARDS): clinical features and differences from typical pre-COVID-19 ARDS/ Med J Aust 2020; 213 (2): 54-56.

5. Koichi Yuki, Miho Fujiogi, S Koutsogiannaki. COVID-19 pathophysiology: A reviewClin Immunol, 2020 Jun; 215: 108427.

6. Yu Zuo, Srilakshmi Yalavarthi, Hui Shi. Neutrophil extracellular traps in COVID-19/ JCI insight 10.1172/jci.insight.138999

7. Chao Song, Haitao Li, Yi Li. NETs promote ALI/ARDS inflammation by regulating alveolar macrophage polarization / Exp Cell Res. 2019 Sep 15;382(2):111486.

8. W. Ortmann, E. Kolaczkowska. Age is the work of art? Impact of neutrophil and organism age on neutrophil extracellular trap formation // Cell Tissue Res. 2018 Mar;371(3):473-488.

9. Obama T, Itabe H. Neutrophils as a Novel Target of Modified Low-Density Lipoproteins and an Accelerator of Cardiovascular Diseases // Int J Mol Sci. 2020 Nov 5;21(21):8312.

10. Huan Wang, Li-Li Sha, Tian-Tian Ma, Lu-Xia Zhang, Min Chen, and Ming-Hui Zhao. Circulating Level of Neutrophil Extracellular Traps Is Not

a Useful Biomarker for Assessing Disease Activity in Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis // PLoS One. 2016; 11(2): e0148197.

11. Chun, C.D., Liles, W.C., Frevert, C.W. et al. Mechanical ventilation modulates Toll-like receptor-3-induced lung inflammation via a MyD88-dependent, TLR4-independent pathway: a controlled animal study // BMC Pulm Med 10, 57 (2010). https://doi.org/10.1186/1471-2466-10-57.

12. Robert D Gray, Christopher D Lucas, Annie Mackellar, Adriano G Rossi. Activation of conventional protein kinase C (PKC) is critical in the generation of human neutrophil extracellular traps // Journal of Inflammation, 2013, 10(1):12.

13. Thiago DeSouza-Vieira, Anderson Guimarães-Costa, Natalia C Rochael, Maria N Lira, Michelle T Nascimento, Phillipe de Souza Lima-Gomez, Rafael M Mariante, Pedro M Persechini, Elvira M Saraiva. Neutrophil extracellular traps release induced by Leishmania: role of PI3Kγ, ERK, PI3Kσ, PKC, and [Ca2+] //J Leukoc Biol, 2016 Oct;100(4):801-810. doi: 10.1189/jlb.4A0615-261RR. Epub 2016 May 6.

14. Grodsky, N., Li, Y., Bouzida, D., Love, R., Jensen, J., Nodes, B., … Grant, S. (2006). Structure of the Catalytic Domain of Human Protein Kinase C β II Complexed with a Bisindolylmaleimide Inhibitor. Biochemistry, 45(47), 13970–13981. https://doi.org/10.1021/bi061128h

15. Bertram A, Ley K. Protein kinase C isoforms in neutrophil adhesion and activation //Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2011 Apr;59(2):79-87. doi: 10.1007/s00005-011-0112-7. Epub 2011 Feb 6. PMID: 21298489 Review.

16. Jeffrey R Strich, Marcos J Ramos-Benitez, Davide Randazzo, Sydney R Stein, Ashley Babyak, Richard T Davey, Anthony F Suffredini, Richard W Childs, Daniel S Chertow. Fostamatinib Inhibits Neutrophils Extracellular Traps Induced by COVID-19 Patient Plasma: A Potential Therapeutic // The Journal of Infectious Diseases, Volume 223, Issue 6, 15 March

2021, Pages 981–984, https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa789

17. Mengting Qin and Zhongpeng Qiu. Changes in TNF-α, IL-6, IL-10 and VEGF in rats with ARDS and the effects of dexamethasone // Exp Ther Med. 2019 Jan; 17(1): 383–387.

18. Deme Swaroopa, Kakarla Bhaskar,1 T. Mahathi, Shivakrishna Katkam,2 Y. Satyanarayana Raju, Naval Chandra, and Vijay Kumar Kutala. Association of serum interleukin-6, interleukin-8, and Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II score with clinical outcome in patients with acute respiratory distress syndrome // Indian J Crit Care Med. 2016 Sep; 20(9): 518–525.

19. Shan Lang, Libing Li, Xuning Wang, Jianxin Wang. CXCL10/IP-10 Neutralization Can Ameliorate Lipopolysaccharide-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome in Rats// PLoS ONE, 2017, 12(1) :e0169100

20. Z. Chen, Y. Hu, T. Xiong, C. Chen, X.-X. Su, Y. Huang, L. Zhang. IL-10 promotes development of acute respiratory distress syndrome via inhibiting differentiation of bone marrow stem cells to alveolar type 2 epithelial cells // European Review for Medical and Pharmacological Sciences 2018; 22: 6085-6092

Додаток А

Таблиця А.1 – Параметри валідованих фармакофорних моделей інгібіторів протеїнкінази PKCB по напрямах 5, 6, 8, 9

Модель	Тип фарм. точки	X	Y	Z	Вага	R, Å
PKCb_5-5combf-1_48_m	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1
	Ar	36,269	55,762	31,754	9	1,3
	Ar	39,852	56,867	36,836	7	1,5
	Acc	36,571	57,457	38,996	7	1,2
	Don	34,967	56,551	37,469	9	1,2
PKCb_5-5combf-1_56_m	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1
	Ar	36,269	55,762	31,754	9	1,3
	Ar	39,852	56,867	36,836	7	1,6
	Acc	36,571	57,457	38,996	7	1
	Don	34,967	56,551	37,469	9	1,2
PKCb_5-5combf-1_60_m	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1
	Ar	36,269	55,762	31,754	9	1,3
	Ar	39,852	56,867	36,836	7	1,6
	Acc	36,571	57,457	38,996	7	1,1
	Don	34,967	56,551	37,469	9	1,2
PKCb_5-5combf-1_632_m	Hyd	38,843	53,863	35,349	1,201	1,2
	Ar	36,269	55,762	31,754	1,442	1,4
	Ar	39,852	56,867	36,836	1,383	1,6
	Acc	36,571	57,457	38,996	1,383	1
	Don	34,967	56,551	37,469	1,442	1,2
PKCb_5-5combf-15_256_m	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1
	Ar	37,38	54,957	33,464	6	1,6

	Ar	40,551	57,41	34,807	4	1,6
	Acc	36,571	57,457	38,996	7	1,2
	Acc	34	55,532	35,483	7	1,2
PKCb_5-5combf-15_511_m	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,1
	Ar	37,38	54,957	33,464	6	1,6
	Ar	40,551	57,41	34,807	4	1,6
	Acc	36,571	57,457	38,996	7	1,2
	Acc	34	55,532	35,483	7	1,1
PKCb_5-5combf-15_748	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,2
	Ar	37,38	54,957	33,464	6	1,6
	Ar	40,551	57,41	34,807	4	1,5
	Acc	36,571	57,457	38,996	7	1,1
	Acc	34	55,532	35,483	7	1,2
PKCb_5-5combf-15_764	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,2
	Ar	37,38	54,957	33,464	6	1,6
	Ar	40,551	57,41	34,807	4	1,6
	Acc	36,571	57,457	38,996	7	1,1
	Acc	34	55,532	35,483	7	1,2
PKCb_5-5combf-15_768	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,2
	Ar	37,38	54,957	33,464	6	1,6
	Ar	40,551	57,41	34,807	4	1,6
	Acc	36,571	57,457	38,996	7	1,2
	Acc	34	55,532	35,483	7	1,2
PKCb_5-5combf-17_967_m	Hyd	38,843	53,863	35,349	1,732	1,3
	Ar	36,269	55,762	31,754	3	1,6
	Ar	39,852	56,867	36,836	2,646	1,3
	Don	34,967	56,551	37,469	3	1
	Acc	34	55,532	35,483	2,646	1,1

PKCb_5-5combf-17_968_m	Hyd	38,843	53,863	35,349	1,732	1,3
	Ar	36,269	55,762	31,754	3	1,6
	Ar	39,852	56,867	36,836	2,646	1,3
	Don	34,967	56,551	37,469	3	1
	Acc	34	55,532	35,483	2,646	1,2
PKCb_5-5combf-17_975_m	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,3
	Ar	36,269	55,762	31,754	9	1,6
	Ar	39,852	56,867	36,836	7	1,3
	Don	34,967	56,551	37,469	9	1,2
	Acc	34	55,532	35,483	7	1,1
PKCb_5-5combf-17_984_m	Hyd	38,843	53,863	35,349	1,732	1,3
	Ar	36,269	55,762	31,754	3	1,6
	Ar	39,852	56,867	36,836	2,646	1,4
	Don	34,967	56,551	37,469	3	1
	Acc	34	55,532	35,483	2,646	1,2
PKCb_5-5combf-19_807_m	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,3
	Ar	37,38	54,957	33,464	6	1,3
	Ar	39,852	56,867	36,836	7	1,5
	Don	34,967	56,551	37,469	9	1
	Acc	34	55,532	35,483	7	1,1
PKCb_5-5combf-19_811_m	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,3
	Ar	37,38	54,957	33,464	6	1,3
	Ar	39,852	56,867	36,836	7	1,5
	Don	34,967	56,551	37,469	9	1,1
	Acc	34	55,532	35,483	7	1,1
PKCb_5-5combf-19_823_m	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,3
	Ar	37,38	54,957	33,464	6	1,3
	Ar	39,852	56,867	36,836	7	1,6

	Don	34,967	56,551	37,469	9	1
	Acc	34	55,532	35,483	7	1,1
PKCb_5-5combf-19_893_m	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,3
	Ar	37,38	54,957	33,464	6	1,4
	Ar	39,852	56,867	36,836	7	1,6
	Don	34,967	56,551	37,469	9	1,2
	Acc	34	55,532	35,483	7	0,9
PKCb_5-5combf-21_13	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1
	Ar	36,269	55,762	31,754	9	1,3
	Ar	40,551	57,41	34,807	4	1,3
	Don	34,967	56,551	37,469	9	1,2
	Acc	34	55,532	35,483	7	0,9
PKCb_5-5combf-21_14	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1
	Ar	36,269	55,762	31,754	9	1,3
	Ar	40,551	57,41	34,807	4	1,3
	Don	34,967	56,551	37,469	9	1,2
	Acc	34	55,532	35,483	7	1
PKCb_5-5combf-21_29	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1
	Ar	36,269	55,762	31,754	9	1,3
	Ar	40,551	57,41	34,807	4	1,4
	Don	34,967	56,551	37,469	9	1,2
	Acc	34	55,532	35,483	7	0,9
PKCb_5-5combf-21_77	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1
	Ar	36,269	55,762	31,754	9	1,4
	Ar	40,551	57,41	34,807	4	1,3
	Don	34,967	56,551	37,469	9	1,2
	Acc	34	55,532	35,483	7	0,9
	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,1

PKCb_5-5combf-21_285	Ar	36,269	55,762	31,754	9	1,3
	Ar	40,551	57,41	34,807	4	1,4
	Don	34,967	56,551	37,469	9	1,2
	Acc	34	55,532	35,483	7	0,9
PKCb_5-5combf-23_517_m	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,2
	Ar	37,38	54,957	33,464	6	1,3
	Ar	40,551	57,41	34,807	4	1,3
	Don	34,967	56,551	37,469	9	1
	Acc	34	55,532	35,483	7	0,9
PKCb_5-5combf-23_581_m	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,2
	Ar	37,38	54,957	33,464	6	1,4
	Ar	40,551	57,41	34,807	4	1,3
	Don	34,967	56,551	37,469	9	1
	Acc	34	55,532	35,483	7	0,9
PKCb_5-5combf-23_645_m	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,2
	Ar	37,38	54,957	33,464	6	1,5
	Ar	40,551	57,41	34,807	4	1,3
	Don	34,967	56,551	37,469	9	1
	Acc	34	55,532	35,483	7	0,9
PKCb_5-5combf-23_721_m	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,2
	Ar	37,38	54,957	33,464	6	1,6
	Ar	40,551	57,41	34,807	4	1,4
	Don	34,967	56,551	37,469	9	0,9
	Acc	34	55,532	35,483	7	0,9
PKCb_5-5combf-23_977_m	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,3
	Ar	37,38	54,957	33,464	6	1,6
	Ar	40,551	57,41	34,807	4	1,4
	Don	34,967	56,551	37,469	9	0,9

	Acc	34	55,532	35,483	7	0,9
PKCb_5-5combf-24_946	Don	43,058	53,583	32,651	5	1,2
	Ar	37,38	54,957	33,464	6	1,5
	Ar	40,551	57,41	34,807	4	1,6
	Don	34,967	56,551	37,469	9	0,9
	Acc	34	55,532	35,483	7	1
PKCb_5-5combf-24_947	Don	43,058	53,583	32,651	5	1,2
	Ar	37,38	54,957	33,464	6	1,5
	Ar	40,551	57,41	34,807	4	1,6
	Don	34,967	56,551	37,469	9	0,9
	Acc	34	55,532	35,483	7	1,1
PKCb_5-5combf-24_948	Don	43,058	53,583	32,651	5	1,2
	Ar	37,38	54,957	33,464	6	1,5
	Ar	40,551	57,41	34,807	4	1,6
	Don	34,967	56,551	37,469	9	0,9
	Acc	34	55,532	35,483	7	1,2
PKCb_5-5combf-24_1010	Don	43,058	53,583	32,651	5	1,2
	Ar	37,38	54,957	33,464	6	1,6
	Ar	40,551	57,41	34,807	4	1,6
	Don	34,967	56,551	37,469	9	0,9
	Acc	34	55,532	35,483	7	1
PKCb_5-5combf-24_1011	Don	43,058	53,583	32,651	5	1,2
	Ar	37,38	54,957	33,464	6	1,6
	Ar	40,551	57,41	34,807	4	1,6
	Don	34,967	56,551	37,469	9	0,9
	Acc	34	55,532	35,483	7	1,1
PKCb_6-5combf-10_895	Don	43,058	53,583	32,651	5	1,2
	Ar	37,38	54,957	33,464	6	1,4

	Ar	39,852	56,867	36,836	7	1,6
	Acc	36,571	57,457	38,996	7	1,2
	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,2
PKCb_6-5combf-10_896	Don	43,058	53,583	32,651	5	1,2
	Ar	37,38	54,957	33,464	6	1,4
	Ar	39,852	56,867	36,836	7	1,6
	Acc	36,571	57,457	38,996	7	1,2
	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,3
PKCb_6-5combf-11_208_m	Don	43,058	53,583	32,651	5	0,9
	Ar	36,269	55,762	31,754	9	1,6
	Ar	40,551	57,41	34,807	4	1,3
	Acc	36,571	57,457	38,996	7	1,2
	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,3
PKCb_6-5combf-11_224	Don	43,058	53,583	32,651	5	0,9
	Ar	36,269	55,762	31,754	9	1,6
	Ar	40,551	57,41	34,807	4	1,4
	Acc	36,571	57,457	38,996	7	1,2
	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,3
PKCb_6-5combf-11_240_m	Don	43,058	53,583	32,651	5	0,9
	Ar	36,269	55,762	31,754	9	1,6
	Ar	40,551	57,41	34,807	4	1,5
	Acc	36,571	57,457	38,996	7	1,2
	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,3
PKCb_6-5combf-16_947	Don	43,058	53,583	32,651	5	1,2
	Ar	37,38	54,957	33,464	6	1,5
	Ar	40,551	57,41	34,807	4	1,6
	Don	34,967	56,551	37,469	9	0,9
	Acc	34	55,532	35,483	7	1,1

PKCb_6-5combf-16_1011	Don	43,058	53,583	32,651	5	1,2
	Ar	37,38	54,957	33,464	6	1,6
	Ar	40,551	57,41	34,807	4	1,6
	Don	34,967	56,551	37,469	9	0,9
	Acc	34	55,532	35,483	7	1,1
PKCb_8-5combf-4_1111	Ar	35,931	56,396	36,851	9	1,4
	Hyd	37,38	54,957	33,464	6	1,3
	Hyd	40,551	57,41	34,807	4	1,4
	Acc	36,571	57,457	38,996	7	1,1
	Don	34,967	56,551	37,469	9	0,9
PKCb_8-5combf-4_1477	Ar	35,931	56,396	36,851	9	1,5
	Hyd	37,38	54,957	33,464	6	1,1
	Hyd	40,551	57,41	34,807	4	1,4
	Acc	36,571	57,457	38,996	7	0,9
	Don	34,967	56,551	37,469	9	1
PKCb_8-5combf-4_1736	Ar	35,931	56,396	36,851	9	1,5
	Hyd	37,38	54,957	33,464	6	1,3
	Hyd	40,551	57,41	34,807	4	1,4
	Acc	36,571	57,457	38,996	7	1,1
	Don	34,967	56,551	37,469	9	0,9
PKCb_8-5combf-4_1978	Ar	35,931	56,396	36,851	9	1,6
	Hyd	37,38	54,957	33,464	6	1
	Hyd	40,551	57,41	34,807	4	1,4
	Acc	36,571	57,457	38,996	7	0,9
	Don	34,967	56,551	37,469	9	1,1
PKCb_8-5combf-4_2986	Ar	35,931	56,396	36,851	9	1,7
	Hyd	37,38	54,957	33,464	6	1,3
	Hyd	40,551	57,41	34,807	4	1,4

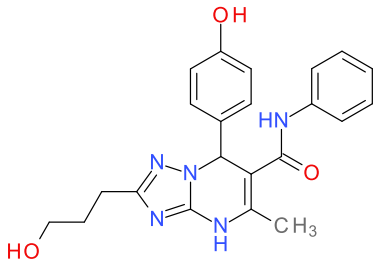
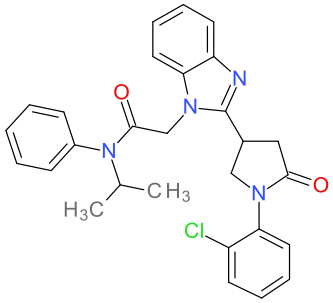
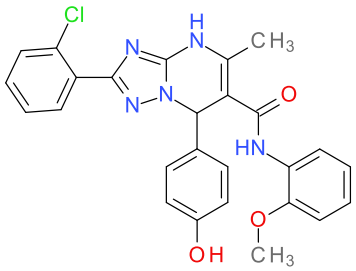
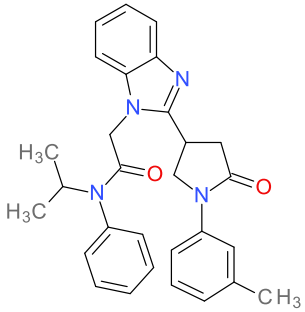
	Acc	36,571	57,457	38,996	7	1,1
	Don	34,967	56,551	37,469	9	0,9
PKCb_8-5combf-18_41_m	Ar	35,931	56,396	36,851	9	1,3
	Hyd	37,38	54,957	33,464	6	1
	Hyd	39,852	56,867	36,836	7	1,1
	Don	34,967	56,551	37,469	9	1,2
	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1
PKCb_8-5combf-18_46_m	Ar	35,931	56,396	36,851	9	1,3
	Hyd	37,38	54,957	33,464	6	1
	Hyd	39,852	56,867	36,836	7	1,1
	Don	34,967	56,551	37,469	9	1,3
	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1
PKCb_8-5combf-18_66_m	Ar	35,931	56,396	36,851	9	1,3
	Hyd	37,38	54,957	33,464	6	1
	Hyd	39,852	56,867	36,836	7	1,2
	Don	34,967	56,551	37,469	9	1,2
	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1
PKCb_8-5combf-18_71_m	Ar	35,931	56,396	36,851	9	1,3
	Hyd	37,38	54,957	33,464	6	1
	Hyd	39,852	56,867	36,836	7	1,2
	Don	34,967	56,551	37,469	9	1,3
	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1
PKCb_8-5combf-18_321	Ar	35,931	56,396	36,851	9	1,3
	Hyd	37,38	54,957	33,464	6	1,2
	Hyd	39,852	56,867	36,836	7	1,2
	Don	34,967	56,551	37,469	9	1,3
	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1
	Ar	35,931	56,396	36,851	9	1,3

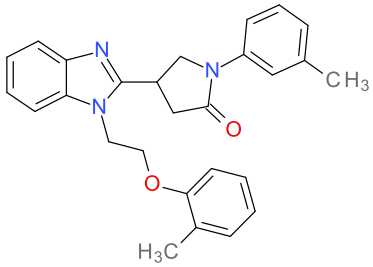
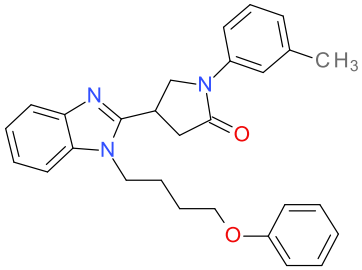
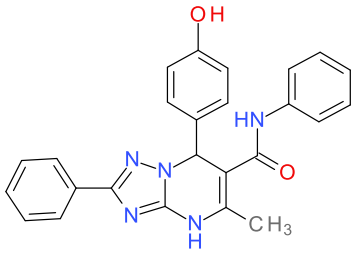
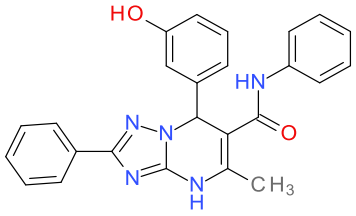
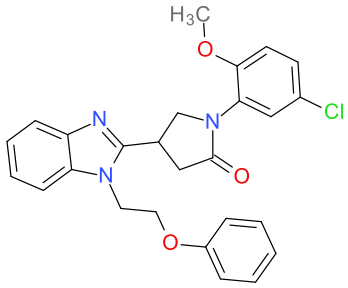
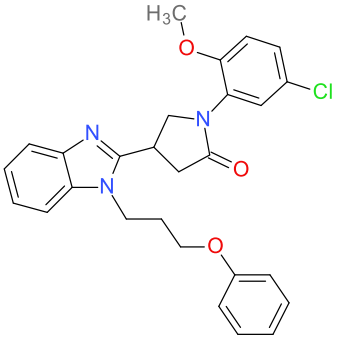
PKCb_8-5combf-20_605_m	Hyd	37,38	54,957	33,464	6	1,4
	Hyd	40,551	57,41	34,807	4	1,4
	Don	34,967	56,551	37,469	9	0,9
	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,4
PKCb_8-5combf-20_610_m	Ar	35,931	56,396	36,851	9	1,3
	Hyd	37,38	54,957	33,464	6	1,4
	Hyd	40,551	57,41	34,807	4	1,4
	Don	34,967	56,551	37,469	9	1
	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,4
PKCb_8-5combf-20_1109_m	Ar	35,931	56,396	36,851	9	1,4
	Hyd	37,38	54,957	33,464	6	1,3
	Hyd	40,551	57,41	34,807	4	1,4
	Don	34,967	56,551	37,469	9	1
	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,3
PKCb_8-5combf-20_1230_m	Ar	35,931	56,396	36,851	9	1,4
	Hyd	37,38	54,957	33,464	6	1,4
	Hyd	40,551	57,41	34,807	4	1,4
	Don	34,967	56,551	37,469	9	0,9
	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,4
PKCb_9-5combf-8_3071_m	Hyd	35,931	56,396	36,851	9	1,4
	Hyd	37,38	54,957	33,464	6	1,4
	Hyd	40,551	57,41	34,807	4	1,2
	Acc	36,571	57,457	38,996	7	1,3
	Acc	34	55,532	35,483	7	0,9
PKCb_9-5combf-9_1747_m	Hyd	35,931	56,396	36,851	9	1,2
	Hyd	36,269	55,762	31,754	9	1,3
	Hyd	39,852	56,867	36,836	7	1,4
	Acc	36,571	57,457	38,996	7	1,3

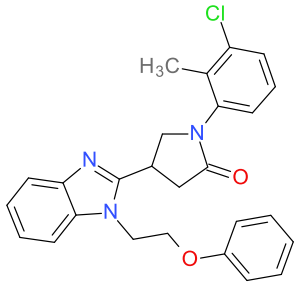
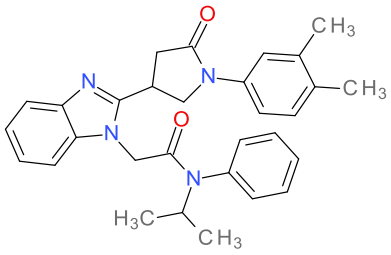
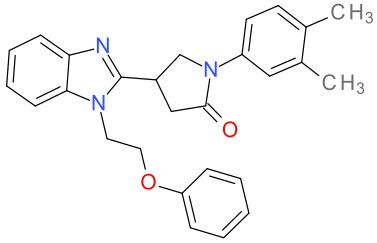
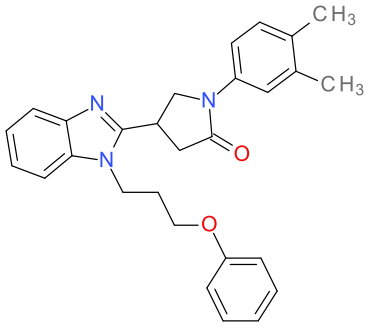
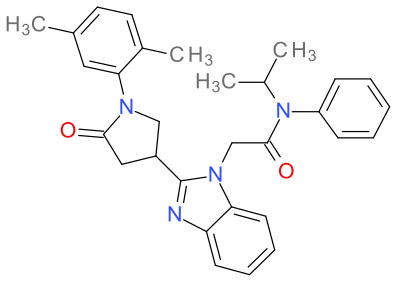
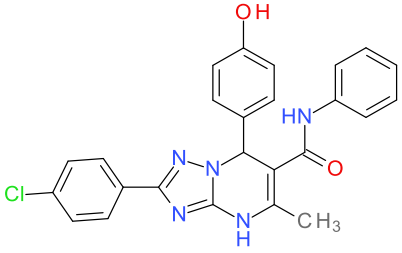
	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,1
PKCb_9-5combf-18_2664_m	Hyd	35,931	56,396	36,851	9	1,4
	Hyd	37,38	54,957	33,464	6	1,1
	Hyd	39,852	56,867	36,836	7	1,1
	Don	34,967	56,551	37,469	9	1,1
	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,3
PKCb_9-5combf-18_2810	Hyd	35,931	56,396	36,851	9	1,4
	Hyd	37,38	54,957	33,464	6	1,2
	Hyd	39,852	56,867	36,836	7	1,2
	Don	34,967	56,551	37,469	9	1
	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,4
PKCb_9-5combf-20_1213_m	Hyd	35,931	56,396	36,851	9	1,1
	Hyd	37,38	54,957	33,464	6	1,4
	Hyd	40,551	57,41	34,807	4	1,3
	Don	34,967	56,551	37,469	9	1,1
	Hyd	38,843	53,863	35,349	3	1,2

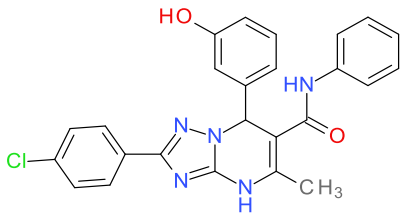
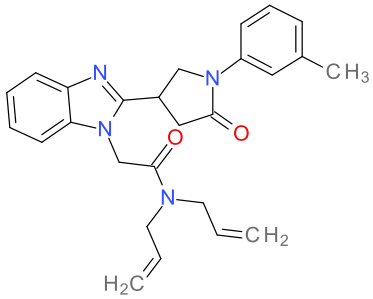
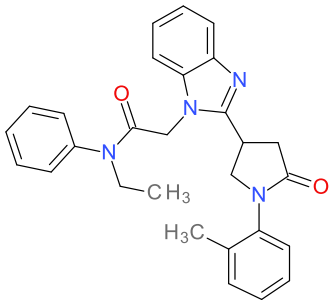
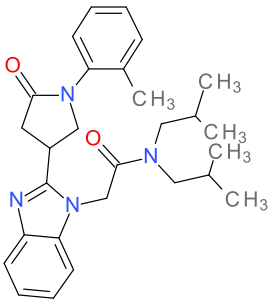
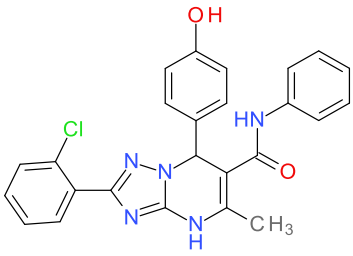
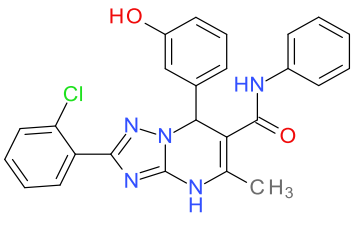
Додаток Б

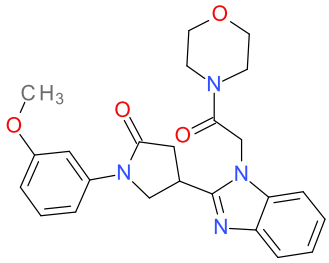
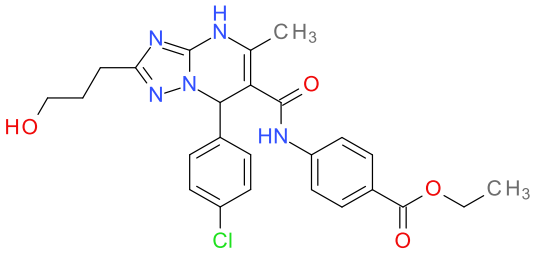
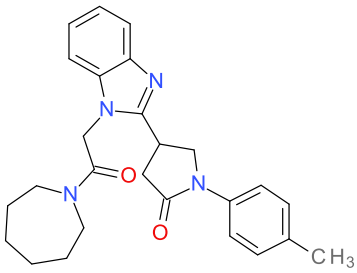
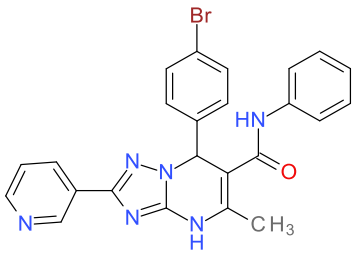
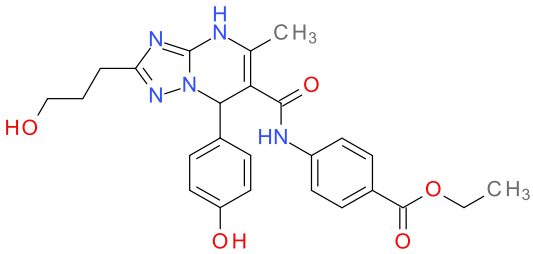
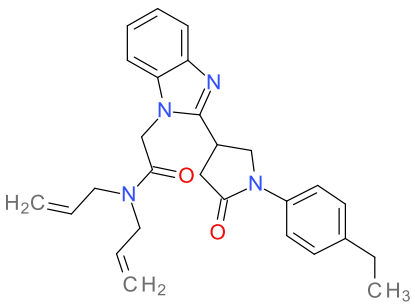
Таблиця Б.1 – Структури сполук відібраних після накладання результатів молекулярного докінгу та фармакофорного скринінгу

№	Номер сполуки	Структура
1	272030	
2	826209	
3	412247	
4	786436	

5	786437	
6	786440	
7	146528	
8	146555	
9	826603	
10	826611	

11	826627	
12	790668	
13	790669	
14	790673	
15	790714	
16	271831	

17	271832	
18	963842	
19	963861	
20	963863	
21	271871	
22	271872	

23	963893	
24	274901	
25	963924	
26	271924	
27	274927	
28	963975