

## СТРУКТУРНО- И КАТИОН-ЗАВИСИМЫЙ МЕХАНИЗМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТРИЦИКЛИЧЕСКИХ АНТИДЕПРЕССАНТОВ С NMDA-РЕЦЕПТОРОМ ПО ДАННЫМ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

© 2024 Д.А. Белинская\*, Н.Н. Шестакова

ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,  
194223 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: d\_belinskaya@mail.ru

Поступила в редакцию 27.10.2023

После доработки 14.02.2024

Принята к публикации 15.02.2024

Известно, что некоторые трициклические антидепрессанты (ТЦА), включая амитриптилин (ATL), кломипрамин (CLO) и дезипрамин (DES), эффективны для купирования нейропатической боли. Ранее было установлено, что ATL, CLO и DES способны потенциал-зависимо блокировать трансмембранные глутаматные NMDA-рецепторы (NMDAR), играющие ключевую роль в патогенезе нейропатической боли. Несмотря на схожую структуру, ATL, CLO и DES взаимодействуют с NMDAR с разной эффективностью. Цель представленного исследования – методами компьютерного моделирования изучить связывание ATL, CLO и DES с NMDAR и выявить структурные особенности препаратов, определяющие их ингибиторную активность по отношению к NMDAR. Был проведен молекулярный докинг исследуемых ТЦА в канал NMDAR, методом молекулярной динамики (МД) рассчитаны конформационные изменения полученных комплексов в липидном бислое. Внутри канала NMDAR выявлен один сайт для связывания третичных аминов ATL и CLO (верхний) и два сайта для вторичного амина DES (верхний и нижний), расположенных вдоль оси канала на разном расстоянии от внеклеточной стороны мембраны. Методом МД установлено, что положение DES в нижнем сайте стабилизируется только в присутствии катиона натрия внутри канала NMDAR. За счет одновременного взаимодействия двух атомов водорода своей катионной группы с аминокислотными остатками аспарагина в ионной поре DES прочнее связывается с NMDAR, по сравнению с ATL и CLO, чем могут быть обусловлены его более сильные побочные эффекты. Выдвинуто предположение, что ATL менее эффективно связывается с NMDAR, по сравнению с DES и CLO, из-за меньшей конформационной подвижности. Выявленные особенности структурно- и катион-зависимого механизма взаимодействия ТЦА с NMDAR помогут дальнейшей разработке эффективной и безопасной противоболевой терапии.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** трициклические антидепрессанты, нейропатическая боль, NMDA-рецептор, молекулярный докинг, молекулярная динамика.

DOI: 10.31857/S0320972524030073 EDN: WKAEPJ

### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что некоторые трициклические антидепрессанты (ТЦА) эффективны для управления синдромом нейропатической боли, и их назначают в качестве первой линии противобо-

вой терапии [1, 2]. ТЦА могут взаимодействовать с несколькими молекулярными мишенями в центральной и периферической нервных системах: натриевыми [3], кальциевыми [4, 5], калиевыми каналами [6], адренорецепторами [7, 8], опиоидными [9, 10] и серотониновыми рецепторами [11].

Принятые сокращения: ЛПП – лекарственные психотропные препараты; МД – молекулярная динамика; МК-801 – дизоцилин; ТЦА – трициклические антидепрессанты; ATL – амитриптилин; CLO – кломипрамин; DES – дезипрамин;  $E_{LJ-SR}$  и  $E_{COUL-SR}$  – энергии ван-дер-ваальсовых сил и кулоновских взаимодействий, рассчитанных для близких контактов между атомами; NCX – натрий-кальциевый обменник; NMDAR – ионотропный рецептор глутамата, селективно связывающий N-метил-D-аспартат; RMSD – среднеквадратичные отклонения атомов от их начального положения.

\* Адресат для корреспонденции.

Благодаря этой особенности они обладают плейотропным действием, но при этом и широким спектром побочных эффектов [12]. Весомый вклад в фармакологический профиль ТЦА вносит их способность ингибировать глутаматные NMDA-рецепторы (NMDAR) [13–15], играющие ключевую роль в патогенезе нейропатического болевого синдрома. Ранее методом локальной фиксации потенциала нашей научной группой было показано, что ТЦА амитриптилин (ATL), кломипрамин (CLO) и дезипрамин (DES) способны магни- и потенциал-зависимо блокировать NMDAR [16, 17]. Согласно клиническим данным, эти препараты эффективны для управления синдромом хронической нейропатической боли [18]. Несмотря на схожую структуру, ATL, CLO и DES взаимодействуют с NMDAR с разной эффективностью [16, 17], а также различаются по своей противоболевой эффективности и силе побочных эффектов. Цель представленного исследования – методами компьютерного моделирования изучить связывание ATL, CLO и DES с NMDAR, определить вклад различных взаимодействий в этот процесс, сопоставить результат вычислительных экспериментов с известными экспериментальными данными и выявить структурные особенности препаратов, определяющих их антиглутаматергическую активность.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Подготовка трехмерных моделей.** Трехмерные модели исследованных ТЦА строили и оптимизировали методом минимизации энергии в вакууме с помощью программного пакета Avogadro v1.2.0 [19]. Ациклические атомы азота препаратов принимали протонированными. NMDAR расположен в плазматической мембране и представляет собой тетрамер, в состав которого входят две субъединицы GluN1 и две субъединицы GluN2 (2A, 2B или 2C) [20]. Каждая субъединица состоит из трех доменов: внеклеточный терминальный домен (amino terminal domain, ATD), внеклеточный лиганд-связывающий домен (ligand binding domain, LBD) и трансмембранный домен (transmembrane domain, TBD). На момент написания представленной статьи в базе данных белковых структур (protein databank, PDB) были доступны несколько трехмерных структур тетрамеров NMDAR различных организмов (человек, крыса, африканская лягушка *Xenopus laevis*). При выборе структуры для вычислительных экспериментов мы руководствовались следующими принципами. Во-первых, желательно, чтобы тетрамер NMDAR состоял из субъединиц GluN1 и GluN2B, поскольку именно такой субъединичный состав соответствует экспериментам *in vitro* на первичной культуре

кортикальных нейронов крыс [17, 21]. Во-вторых, в качестве возможных моделей рецептора для вычислительного эксперимента мы отбирали комплексы NMDAR с канальными блокаторами, близкими по структуре к исследуемым ТЦА. Так, наибольший интерес с этой точки зрения представляли комплекс NMDAR африканской лягушки *X. laevis* с блокатором ионного канала дизоципином (МК-801), код 5UN1 [22], и комплекс NMDAR крысы с блокатором мемантином, код 7SAD [23]. Из этих двух структур мы выбрали первую, поскольку, во-первых, она была получена с лучшим разрешением (3,6 Å против 3,96 Å), а, во-вторых, МК-801 содержит в своей структуре такую же трициклическую группу, что и исследуемые ТЦА. Таким образом, в качестве трехмерной модели NMDAR мы использовали структуру 5UN1, полученную методом рентгеноструктурного анализа (РСА) [22], цепи А, В, С и D. В состав этой структуры входят две субъединицы GluN1 (цепи А и С) и две субъединицы GluN2B (цепи В и D) без терминального домена. Здесь и далее нумерация аминокислот соответствует первичной последовательности рецептора, представленной в базе данных UniProt [24]: код A0A1L8F5J9 – для субъединицы GluN1; код A7XY94 – для субъединицы GluN2B. Для моделирования оставили только фрагменты субъединиц рецептора, образующих пору канала: аминокислоты 600–655 субъединиц GluN1 и аминокислоты 598–653 субъединиц GluN2B. С помощью онлайн-сервиса Clustal Omega [25] было проведено выравнивание первичных последовательностей этих фрагментов NMDAR африканской лягушки, крысы и человека, которое показало, что они полностью идентичны (рис. П1, а в Приложении). Поэтому данные, полученные в представленной работе на NMDAR *X. laevis* можно экстраполировать на крысу и человека. Графическое изображение фрагмента NMDAR, используемого для вычислений, представлено на рис. П1, б в Приложении. Недостающие атомы, не «увиденные» методом РСА, добавили с помощью программного пакета VMD v1.9.4a53 [26], затем модель оптимизировали методом минимизации энергии в вакууме с использованием программы NAMD v2.13 [27].

**Молекулярный докинг.** Подготовленные 3D-модели NMDAR и лигандов использовали для процедуры молекулярного докинга ATL, DES и CLO в пору канала рецептора. Молекулярный докинг проводили с помощью онлайн-версии программы Rosetta [28], алгоритм которой позволяет варьировать конформацию лиганда и конформации аминокислот сайта связывания (гибкий докинг). Для того чтобы охватить все пространство поры канала и не упустить возможные конформации лиганда на границе областей поиска, для каждого лиганда процедуру докинга проводили трижды.

В первом запуске центром области поиска задавали координаты атома азота молекулы МК-801 в структуре 5UN1, во втором запуске – точку, расположенную на 7 Å глубже в поре канала NMDAR (на 7 Å ближе к внутриклеточной стороне мембраны), в третьем запуске – точку, расположенную на 14 Å глубже в поре канала NMDAR (на 14 Å ближе к внутриклеточной стороне мембраны). Радиус области поиска задавали равным 7 Å, для остальных параметров использовали значения по умолчанию. Для каждого запуска процедуры молекулярного докинга число генерируемых возможных конформаций комплекса рецептор–лиганд принимали равным 200. Сгенерированные конформации ранжировали по величине энергии взаимодействия. Для дальнейшего исследования комплексов методом молекулярной динамики (МД) выбирали самые энергетически выгодные конформации.

**Молекулярная динамика в липидном бислое.** Полученные методом молекулярного докинга комплексы ТЦА с NMDAR с помощью онлайн-сервиса CHARMM-GUI Membrane Builder [29] виртуально встраивали в липидный бислой размером 80 × 80 Å, состоящий из молекул 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (POPC). Общее количество молекул POPC составило 156 (83 – в верхнем липидном слое и 73 – в нижнем). Затем к системе виртуально добавили растворитель (воду), толщину слоя воды над и под мембраной задавали равной 15 Å. На заключительном этапе для нейтрализации заряда к системе добавили ионы натрия и хлора, концентрацию NaCl задавали равной 0,15 М. Полученная система на примере комплекса ATL–NMDAR графически изображена на рис. П1, в Приложении. Конформационные изменения комплексов NMDAR с лигандами рассчитывали методом МД с использованием вычислительных ресурсов суперкомпьютерного центра Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого. Использовали программный пакет GROMACS 2019.4 [30] и силовое поле CHARMM36m [31]. Систему, сконструированную с помощью CHARMM-GUI Membrane Builder, оптимизировали методом минимизации энергии и подвергали поэтапной релаксации с постепенным ослаблением ограничений, наложенных на движение атомов. Общая длительность релаксации составила 39 нс. Затем конформационные изменения системы моделировали методом МД без ограничений, длина каждой симуляции составила 100 нс с шагом интегрирования 0,002 пс. В расчетном эксперименте поддерживали постоянную температуру 303 К и постоянное давления 1 бар с помощью термостата V-rescale [32] и баростата Паринелло–Рамана [33]. При межатомном расстоянии больше 1,2 нм кулоновскими взаимодействиями и ван-дер-ваальсовыми силами ме-

жду атомами пренебрегали. Дальние электростатические взаимодействия рассчитывали методом Эвальда [34]. Длины связей в молекулах NMDAR и лигандов поддерживали постоянными с помощью алгоритма LINCS [35].

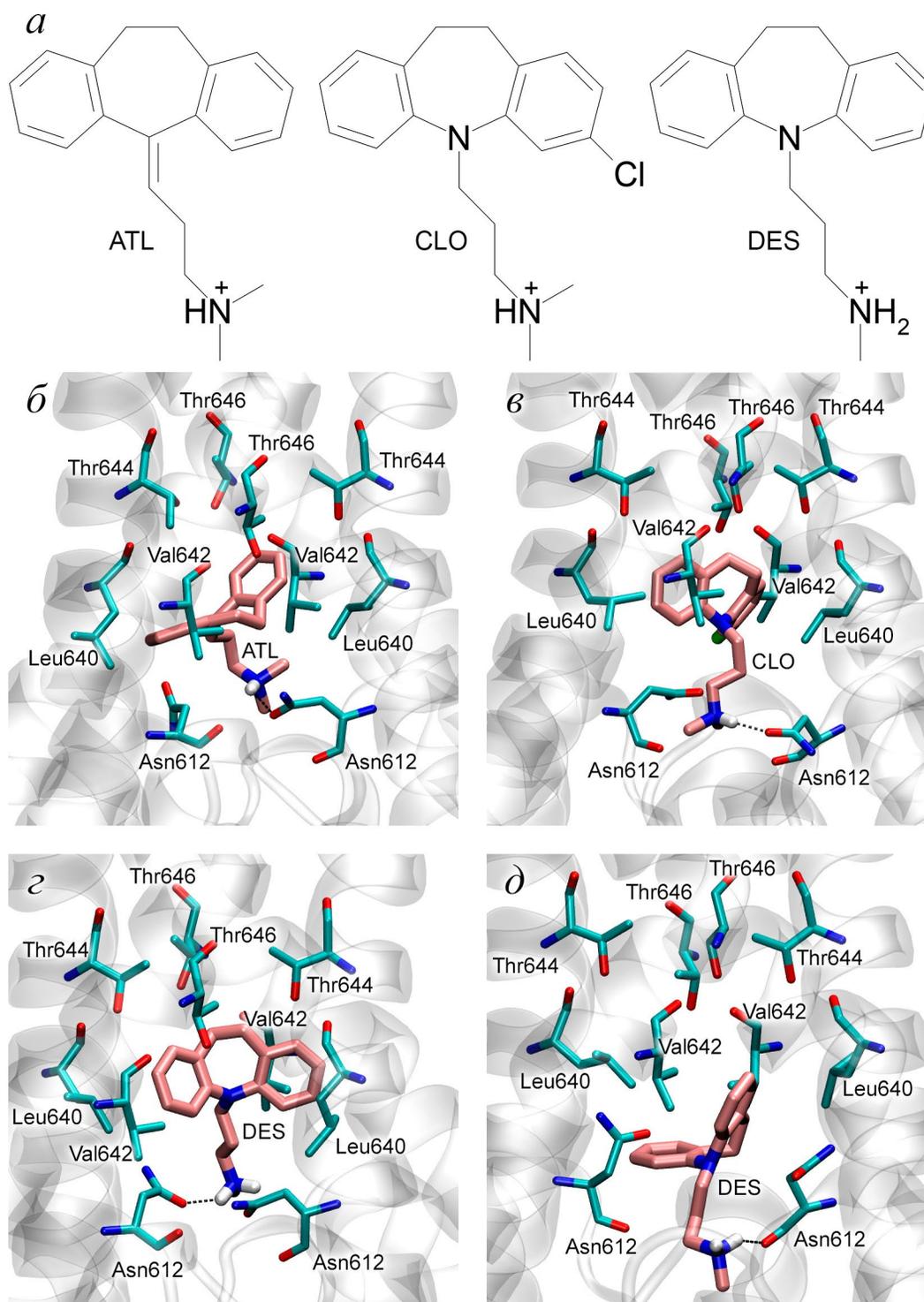
**Расчет энергетических характеристик взаимодействия между ТЦА и NMDAR.** По траекториям МД была рассчитана зависимость от времени параметров  $E_{LJ-SR}$  и  $E_{COUL-SR}$ . Эти характеристики представляют собой энергии ван-дер-ваальсовых сил (потенциал Леннарда-Джонса, LJ) и кулоновских (Coulomb) взаимодействий соответственно, рассчитанных для близких контактов (Short-Range) между атомами ТЦА и NMDAR, а именно для тех пар атомов белка и лиганда, расстояние между которыми не превышает 1,2 нм.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Молекулярный докинг ТЦА в ионную пору NMDAR.** На первом этапе был проведен молекулярный докинг ATL, DES и CLO (рис. 1, а) в ионную пору канала NMDAR.

В случае ATL и CLO процедура молекулярного докинга выявила только одно возможное место связывания этих препаратов внутри NMDAR (рис. 1, б и в). В этом сайте трициклические группы препаратов связываются в окружении аминокислот Val642 и Thr646 субъединиц GluN1 и аминокислот Leu640 и Thr644 субъединиц GluN2B, а атом водорода катионной группы ATL и CLO образует водородную связь с атомом кислорода бокового радикала (Oδ1) аспарагина Asn612 одной из субъединиц GluN2B.

Согласно полученным данным, DES может связываться внутри NMDAR в двух сайтах, расположенных на оси канала рецептора на разном расстоянии от внеклеточной и внутриклеточной сторон плазматической мембраны (рис. 1, г и д). Первый (верхний) сайт соответствует сайту связывания ATL и CLO. В верхнем сайте трициклическая группа DES связывается в окружении аминокислот Val642 и Thr646 субъединиц GluN1 и аминокислот Leu640 и Thr644 субъединиц GluN2B (рис. 1, г). Один из атомов водорода катионной группы DES образует водородную связь (отмечена пунктирной линией) с атомом кислорода Oδ1 бокового радикала аспарагина Asn612 субъединицы GluN2B (рис. 1, г). Во втором (нижнем) сайте (рис. 1, д) азот трициклической группы DES расположен на том же уровне, на котором расположена катионная группа в верхнем положении, а именно в окружении боковых радикалов аспарагинов Asn612 субъединиц GluN2B. В нижнем сайте трициклическая группа DES взаимодействует с Val642 и Leu640, но не с треонинами Thr646



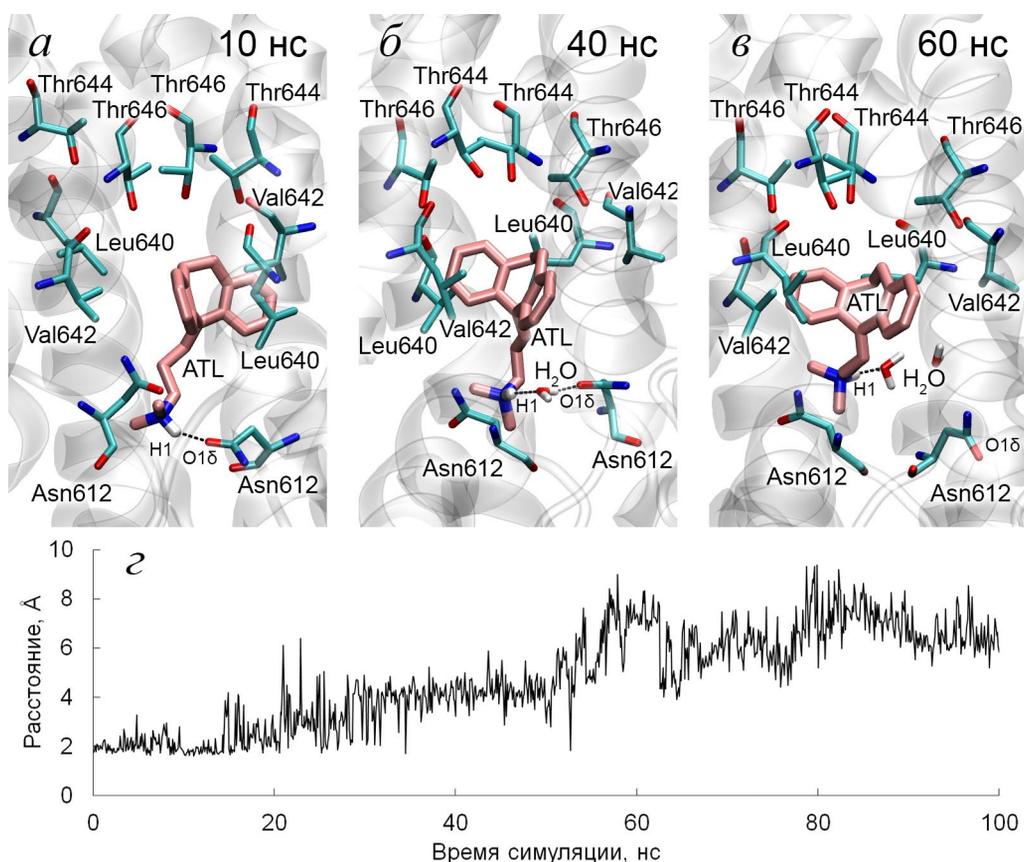
**Рис. 1.** Сaitы связывания ТЦА с NMDAR (по данным молекулярного докинга). *a* – Структуры исследуемых веществ; *b* – единственный (верхний) сайт связывания ATL; *c* – единственный (верхний) сайт связывания CLO; *z* – верхний сайт связывания DES; *д* – нижний сайт связывания DES. Ключевые взаимодействия отмечены пунктирными линиями. Неполарные водороды не показаны для четкости рисунка

и Thr644; один из водородов катионной группы DES образует водородную связь (отмечена пунктирной линией) с атомом кислорода остова Asn612 субъединицы GluN2B.

Таким образом, методом молекулярного докинга мы выявили сaitы связывания ТЦА

в ионной поре NMDAR и установили, что DES (и только DES) может связываться в сaйте, расположенном глубже в ионной поре, ближе к внутренней стороне плазматической мембраны.

**Молекулярная динамика комплексов NMDAR с ТЦА.** Конформационные изменения полученных



**Рис. 2.** Взаимодействие амитриптилина (ATL) с NMDAR (по данным МД). Ключевые взаимодействия отмечены пунктирной линией. *a* – Положение молекулы ATL в сайте после 10 нс симуляции; *б* – положение молекулы ATL в сайте после 40 нс симуляции; *в* – положение молекулы ATL в сайте после 60 нс симуляции; *г* – зависимость от времени расстояния между атомом водорода H1 катионной группы ATL и атомом кислорода O1δ бокового радикала Asn612 одной из субъединиц GluN2B (distH1–O1δ)

комплексов NMDAR с ТЦА были изучены методом МД в липидном бислое. Подготовка системы рецептор/лиганд/мембрана/растворитель подробно описана в разделе «Материалы и методы». Конформационные изменения сайта связывания и движение молекул ТЦА внутри NMDAR были проинспектированы визуально. Дополнительно, по полученным траекториям была рассчитана зависимость от времени среднеквадратичных отклонений (root mean square deviation, RMSD) атомов молекулы ТЦА и  $\text{Ca}$ -атомов молекулы NMDAR от их начального положения. Также для конформационного анализа по полученным траекториям была рассчитана зависимость от времени расстояний между функционально значимыми атомами.

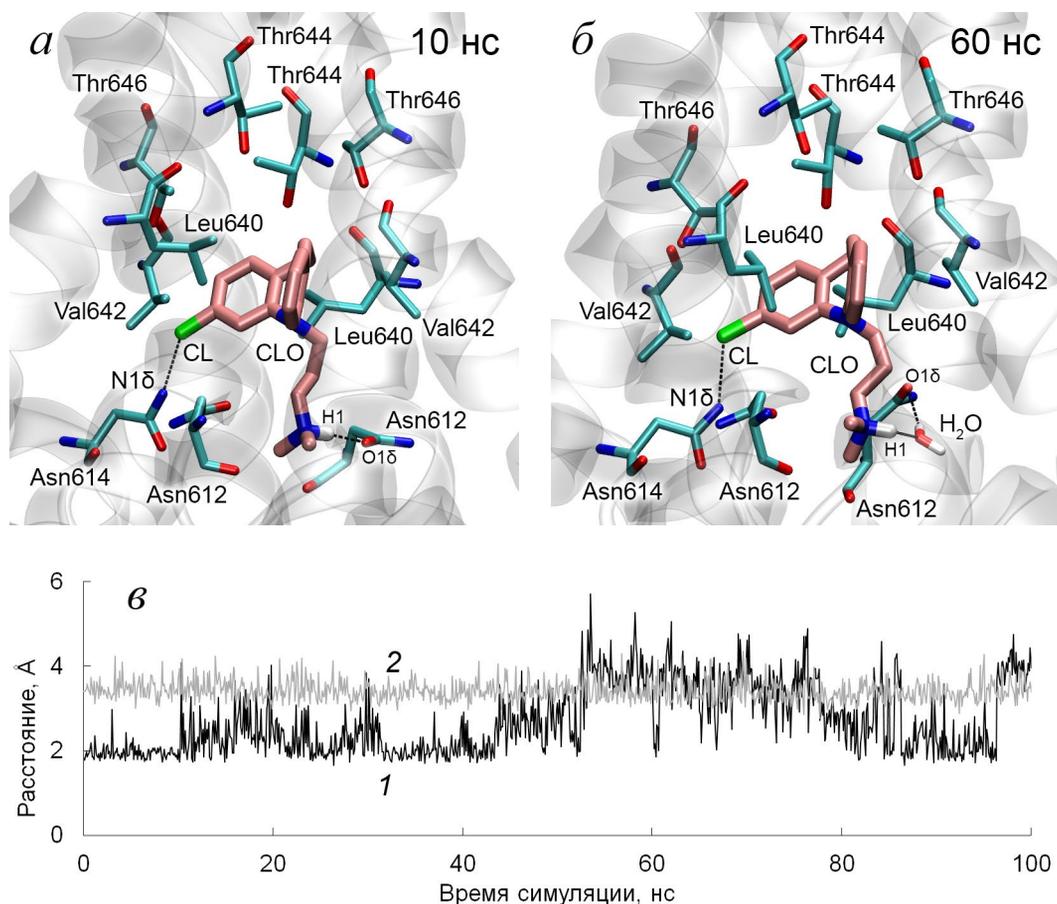
**Амитриптилин.** Визуальная инспекция конформационных изменений комплекса показала, что в течение симуляции молекула ATL меняет свое положение внутри ионной поры. Значение RMSD ATL в течение симуляции возрастает до 1,5 Å (рис. П2 в Приложении), что подтверждает заметное изменение положения молекулы лиганда в сайте связывания. Значение RMSD  $\text{Ca}$ -атомов NMDAR увеличивается в течение первых 5 нс

симуляции, затем выходит на плато и варьируется в диапазоне 2–3 Å (рис. П2 в Приложении), что указывает на стабилизацию полипептидных цепей молекулы NMDAR.

Результат конформационного анализа комплекса ATL с NMDAR представлен на рис. 2.

Трициклическая группа препарата на протяжении всего периода симуляции остается связанной в окружении алифатических аминокислот Val642 и Thr646 субъединиц GluN1, а также Leu640 и Thr644 субъединиц GluN2B (рис. 2, *a–в*). На протяжении первых 20 нс симуляции атом водорода катионной группы ATL образует стабильную водородную связь с атомом кислорода O1δ бокового радикала аспарагина Asn612 одной из субъединиц GluN2B (рис. 2, *a*), расстояние между атомами составляет около 2 Å (рис. 2, *г*). В период 20–50 нс ATL взаимодействует с Asn612 через молекулу воды (рис. 2, *б*), расстояние между атомами составляет примерно 4 Å (рис. 2, *г*). Затем атомы отдаляются друг от друга (рис. 2, *в* и *г*), ATL и Asn612 теряют связь и не взаимодействуют даже через воду.

В нашей предыдущей работе мы моделировали взаимодействие ATL–NMDAR с помощью других



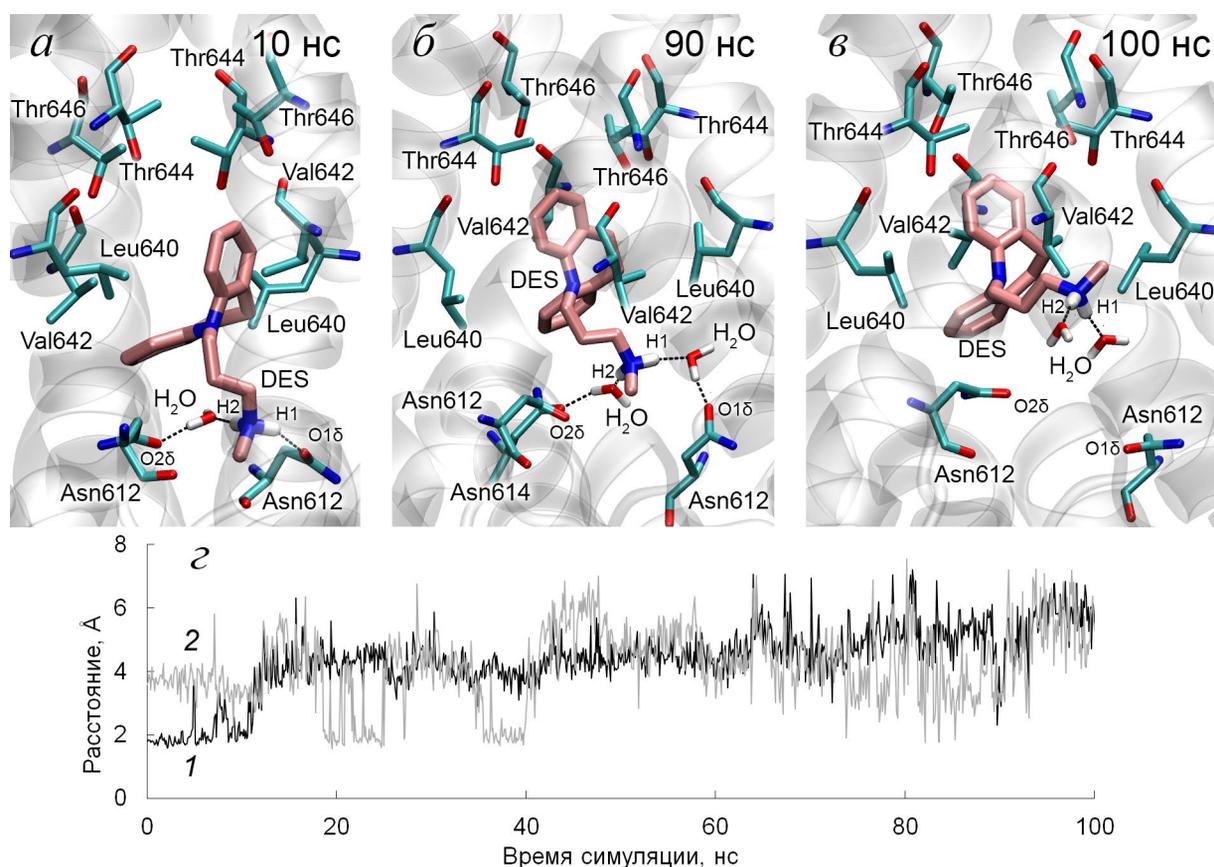
**Рис. 3.** Взаимодействие CLO с NMDAR (по данным МД). *а* – Положение молекулы CLO в сайте после 10 нс симуляции; *б* – положение молекулы CLO в сайте после 60 нс симуляции; *в* – зависимость от времени расстояния между атомом водорода H1 катионной группы CLO и атомом кислорода O18 бокового радикала Asn612 одной из субъединиц GluN2B (distH1–O18, отмечено цифрой 1) и расстояния между атомом хлора лиганда и атомом азота N18 бокового радикала Asn614 одной из субъединиц GluN1 (distCL–N18, отмечено цифрой 2). Ключевые взаимодействия отмечены пунктирной линией. Второстепенные водороды не показаны для четкости рисунка

программ для молекулярного докинга и молекулярной динамики (Autodock Vina 1.1.2 и NAMD) и получили схожий результат [21]. В работе 2019 года мы проверили стабильность комплекса NMDAR–ATL с помощью короткой симуляции (длиной 2 нс) методом МД и выявили, что катионная группа ATL взаимодействует с боковым радикалом аспарагина Asn612 одной из субъединиц GluN2B. В представленном исследовании мы моделировали конформационное поведение ATL в ионной поре NMDAR в течение 100 нс, что позволило более детально изучить конформационную подвижность ATL внутри NMDAR.

**Кломипрамин.** Согласно визуальной инспекции, положение молекулы CLO внутри канала NMDAR стабильно на протяжении 100 нс. Значение RMSD CLO также возрастает в течение первых 5 нс симуляции, затем выходит на плато и колеблется в диапазоне 0,3–0,5 Å (рис. ПЗ в Приложении), что также указывает на стабильное положение молекулы CLO в сайте связывания. Значение RMSD  $\alpha$ -атомов NMDAR увеличивается в течение

первых 5 нс симуляции, затем выходит на плато и варьируется в диапазоне 2–2,5 Å (рис. ПЗ в Приложении), что указывает на стабилизацию полипептидных цепей молекулы NMDAR.

Результат конформационного анализа комплекса CLO с NMDAR представлен на рис. 3. Трициклическая группа препарата на протяжении всего периода симуляции остается связанной в окружении алифатических аминокислот Val642 и Thr646 субъединиц GluN1, а также Leu640 и Thr644 субъединиц GluN2B (рис. 3, *а* и *б*). На протяжении симуляции атом водорода H1 катионной группы CLO либо образует стабильную водородную связь с атомом кислорода O18 бокового радикала аспарагина Asn612 одной из субъединиц GluN2B (рис. 3, *а*; периоды симуляции 0–50 и 80–95 нс на рис. 3, *в*), либо взаимодействует с Asn612 через молекулу воды (рис. 3, *б*; периоды симуляции 50–80 и 95–100 нс на рис. 3, *в*). Атом хлора на протяжении всей симуляции держится вблизи атома азота N18 бокового радикала Asn614 одной из субъединиц GluN1 (рис. 3, *а–в*), среднее расстояние между



**Рис. 4.** Взаимодействие DES с верхним сайтом NMDAR (по данным МД). *а* – Положение молекулы DES в сайте после 10 нс симуляции; *б* – положение молекулы DES в сайте после 90 нс симуляции; *в* – положение молекулы DES в сайте после 100 нс симуляции; *г* – зависимость от времени расстояния между атомами водорода H1 и H2 катионной группы DES и атомами кислорода O18 и O28 боковых радикалов Asn612 субъединиц GluN2B (distH1–O18 и distH2–O28, отмечены цифрами 1 и 2 соответственно). Ключевые взаимодействия отмечены пунктирной линией. Второстепенные водороды не показаны для четкости рисунка

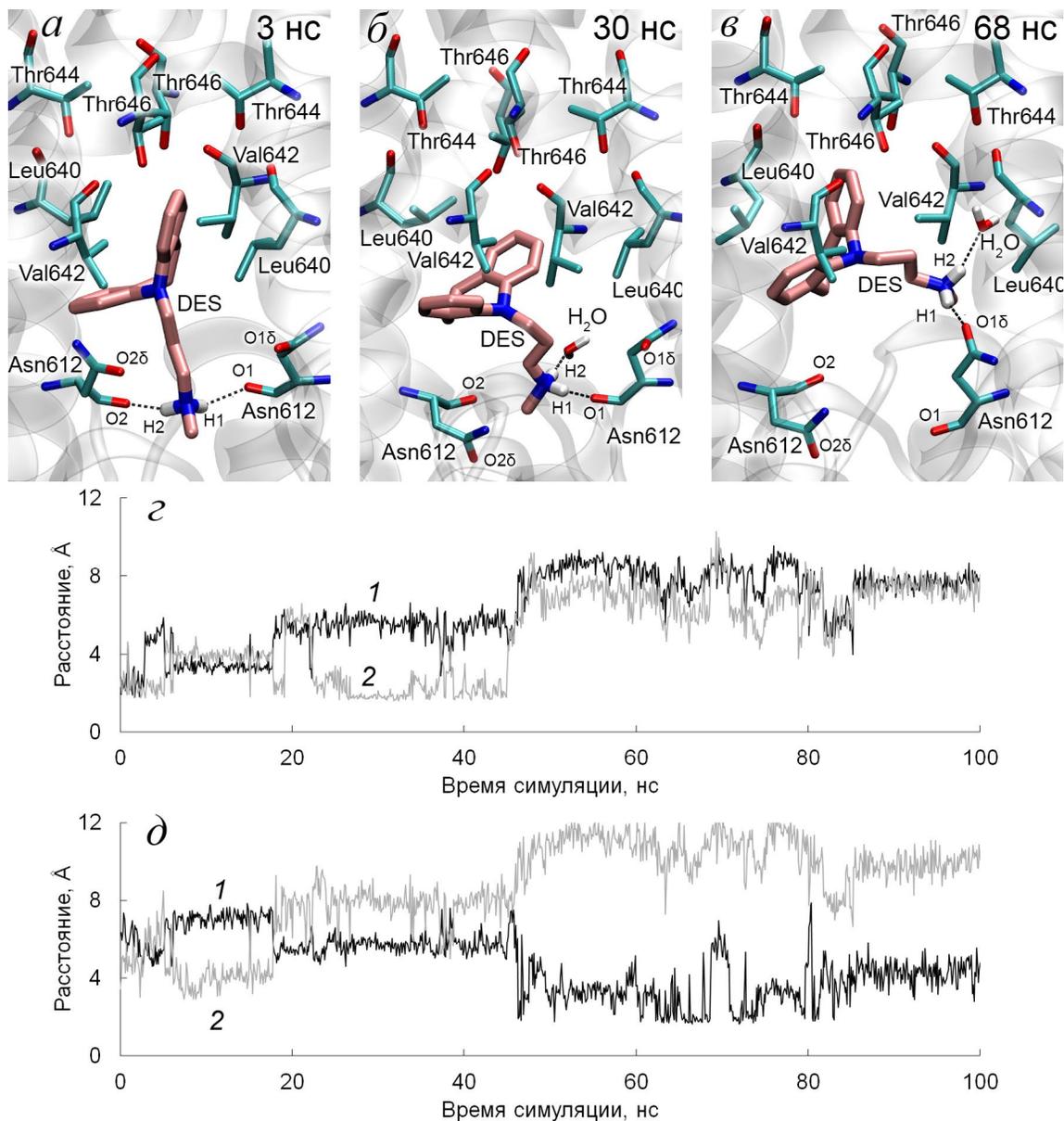
этим атомами составляет 3,4 Å. По всей видимости, в данном случае между хлором и азотом образуется галогенная связь, максимальное расстояние для ее образования составляет 3,6 Å [36]. Интересно отметить, что атом азота трициклической группы не образует никаких близких контактов ни с окружающими аминокислотами, ни с молекулами воды.

**Дезипрамин в верхнем сайте.** Визуальная инспекция конформационных изменений комплекса показала, что положение молекулы DES в верхнем лиганд-связывающем сайте NMDAR менее стабильно по сравнению с CLO. Значение RMSD DES в течение симуляции возрастает до 1,5 Å (рис. П4 в Приложении), что указывает на изменение положения молекулы лиганда в процессе симуляции. Значение RMSD Ca-атомов NMDAR увеличивается в течение первых 10 нс симуляции, затем выходит на плато и варьируется в диапазоне 2–2,5 Å (рис. П4 в Приложении), что указывает на стабилизацию полипептидных цепей молекулы NMDAR.

Результат конформационного анализа комплекса DES с верхним сайтом NMDAR представлен на рис. 4.

Трициклическая группа препарата на протяжении всего периода симуляции остается связанной в окружении алифатических аминокислот Val642 и Thr646 субъединиц GluN1 и Leu640 и Thr644 субъединиц GluN2B (рис. 4, *а–в*). В промежутках 0–10, 20–25 и 35–40 нс один из атомов водорода (H1) катионной группы DES образует стабильную водородную связь с атомом кислорода O18 бокового радикала аспарагина Asn612 одной из субъединиц GluN2B, одновременно с этим второй атом водорода (H2) катионной группы связан с атомом кислорода O28 бокового радикала аспарагина Asn612 второй субъединицы GluN2B (рис. 4, *а* и *г*). В остальное время оба атома водорода катионной группы DES взаимодействуют с окружающими аминокислотами через одну молекулу воды (рис. 4, *б* и *г*). И лишь после 90 нс симуляции катионная группа теряет связь с аспарагинами ионной поры и не взаимодействует с ними даже через воду (рис. 4, *в* и *г*).

**Дезипрамин в нижнем сайте.** Положение молекулы DES в нижнем сайте NMDAR также нестабильно. Значение RMSD DES в течение симуляции

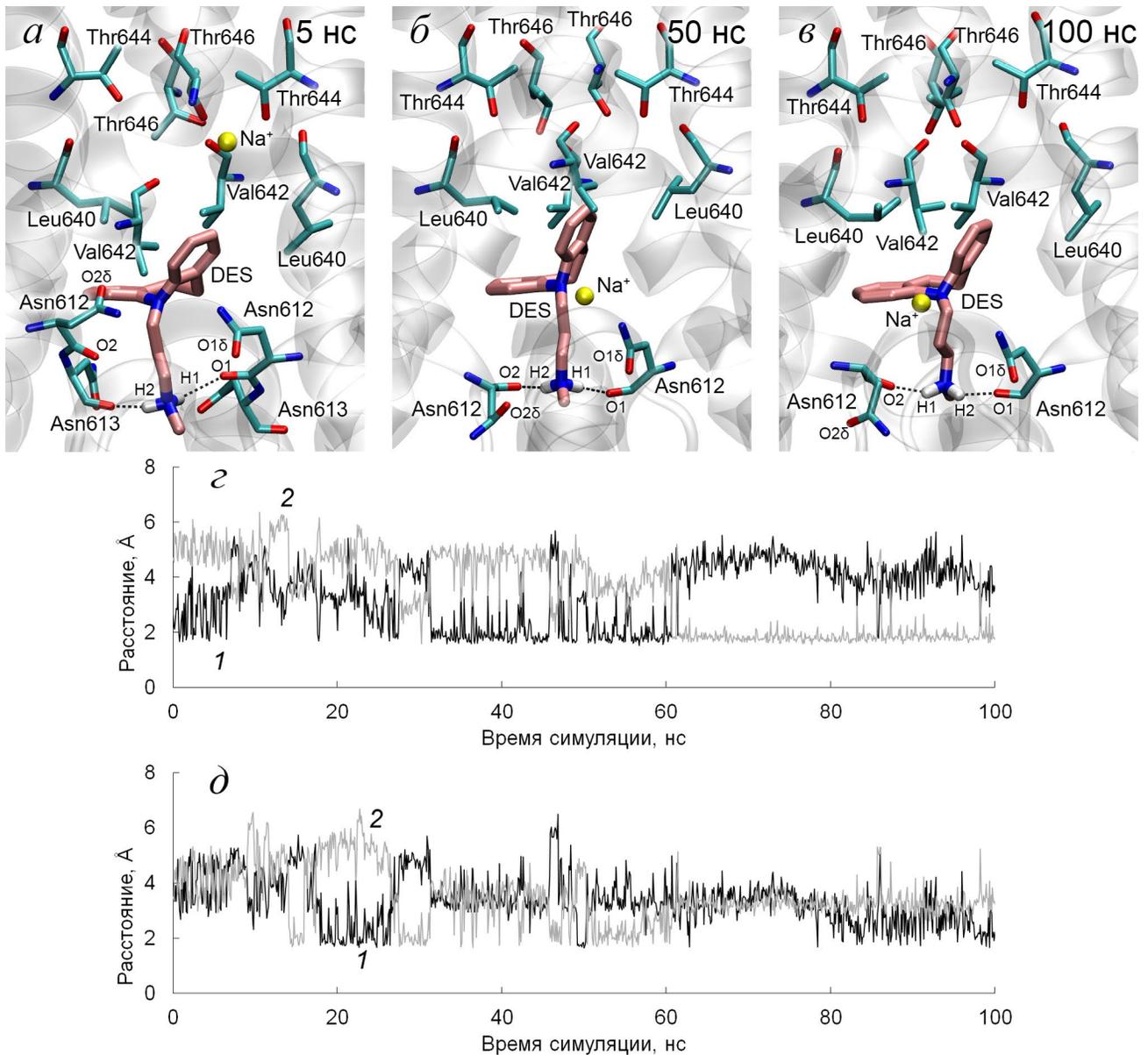


**Рис. 5.** Взаимодействие DES с нижним сайтом NMDAR (по данным МД). *а* – Положение молекулы DES в сайте после 3 нс симуляции; *б* – положение молекулы DES в сайте после 30 нс симуляции; *в* – положение молекулы DES в сайте после 68 нс симуляции; *з* – зависимость от времени расстояния между атомами водорода H1 и H2 катионной группы DES и атомами кислорода O1 и O2 остова аминокислотных остатков Asn612 субъединиц GluN2B (distH1–O1 и distH2–O2, отмечены цифрами 1 и 2 соответственно); *д* – зависимость от времени расстояния между атомами водорода H1 и H2 катионной группы DES и атомами кислорода O18 и O28 боковых радикалов аминокислотных остатков Asn612 субъединиц GluN2B (distH1–O18 и distH2–O28, отмечены цифрами 1 и 2 соответственно). Ключевые взаимодействия отмечены пунктирной линией. Второстепенные водороды не показаны для четкости рисунка

возрастает до 1,5 Å (рис. П5 в Приложении), что указывает на изменение положения молекулы лиганда в сайте связывания. Значение RMSD Ca-атомов NMDAR увеличивается в течение первых 10 нс симуляции, затем выходит на плато и варьируется в диапазоне 1,5–2,0 Å (рис. П5 в Приложении), что указывает на стабилизацию полипептидных цепей молекулы NMDAR.

Результат конформационного анализа комплекса DES с NMDAR представлен на рис. 5. Трици-

клическая группа препарата в течение симуляции взаимодействует с алифатическими аминокислотами Val642 и Thr646 субъединиц GluN1, а также аминокислотами Leu640 и Thr644 субъединиц GluN2B (рис. 5, *а–в*). В промежутке 0–3 нс оба атома водорода катионной группы DES образуют водородные связи с атомами кислорода остова аминокислотных остатков Asn612 субъединиц GluN2B (рис. 5, *а* и *з*). Затем после переходного периода (3–21 нс, катионная группа находится на



**Рис. 6.** Взаимодействие DES с нижним сайтом NMDAR в присутствии катиона натрия в ионной поре (по данным МД). *а* – Положение молекулы DES в сайте после 5 нс симуляции; *б* – положение молекулы DES в сайте после 50 нс симуляции; *в* – положение молекулы DES в сайте после 100 нс симуляции; *г* – зависимость от времени расстояния между атомом водорода H1 катионной группы DES и атомами кислорода O1 и O2 остова аминокислотных остатков Asn612 субъединиц GluN2B (distH1–O1 и distH1–O2, отмечены цифрами 1 и 2 соответственно); *д* – зависимость от времени расстояния между атомом водорода H2 катионной группы DES и атомами кислорода O1 и O2 остова аминокислотных остатков Asn612 субъединиц GluN2B (distH2–O1 и distH2–O2, отмечены цифрами 1 и 2 соответственно). Ключевые взаимодействия отмечены пунктирной линией. Второстепенные водороды не показаны для четкости рисунка

уровне кислорода остова Asn612, но водородных связей нет) в промежутке 21–45 нс один из водородов катионной группы DES сохраняет водородную связь с атомом кислорода остова Asn612 одной из субъединиц GluN2B; второй же атом водорода эту связь теряет и взаимодействует только с молекулой воды (рис. 5, б и г). В этом же промежутке молекула DES постепенно продвигается по направлению к верхнему сайту. После 45 нс симуляции молекула DES полностью переходит в

верхний сайт, связь с кислородом остова Asn612 теряется, но один из атомов водорода катионной группы образует водородную связь с кислородом бокового радикала Asn612 одной из субъединиц GluN2B (рис. 5, в–д). После 80 нс симуляции катионная группа теряет связь с аспарагинами ионной поры (рис. 5, д) и не взаимодействует с ними даже через воду.

**Дезипрамин в нижнем сайте в присутствии Na<sup>+</sup> в ионной поре.** Согласно экспериментальным

данным, полученным ранее нашей научной группой методом фиксации потенциала, DES глубже проникает в ионную пору NMDAR по сравнению с CLO и ATL [17]. Методом докинга мы выявили, что один из сайтов DES находится глубже внутри ионной поры, ближе к внутриклеточной стороне мембраны. Однако, согласно данным МД, положение молекулы DES в этом сайте нестабильно. В наших ранних работах мы показали, что трициклическая группа лекарственных психотропных препаратов (ЛПП), обладающих противоболевой активностью, имеет V-образную конформацию [37], и высказали предположение, что такая структура может связывать катион натрия и кальция через пи-катионное взаимодействие. Отсюда логично вытекает гипотеза, что положение молекулы DES в нижнем сайте может быть стабилизировано катионом натрия или кальция. Чтобы проверить эту гипотезу, мы запустили расчет конформационных изменений комплекса DES с нижним сайтом методом МД, предварительно поместив катион натрия в ионную пору NMDAR возле трициклической группы DES.

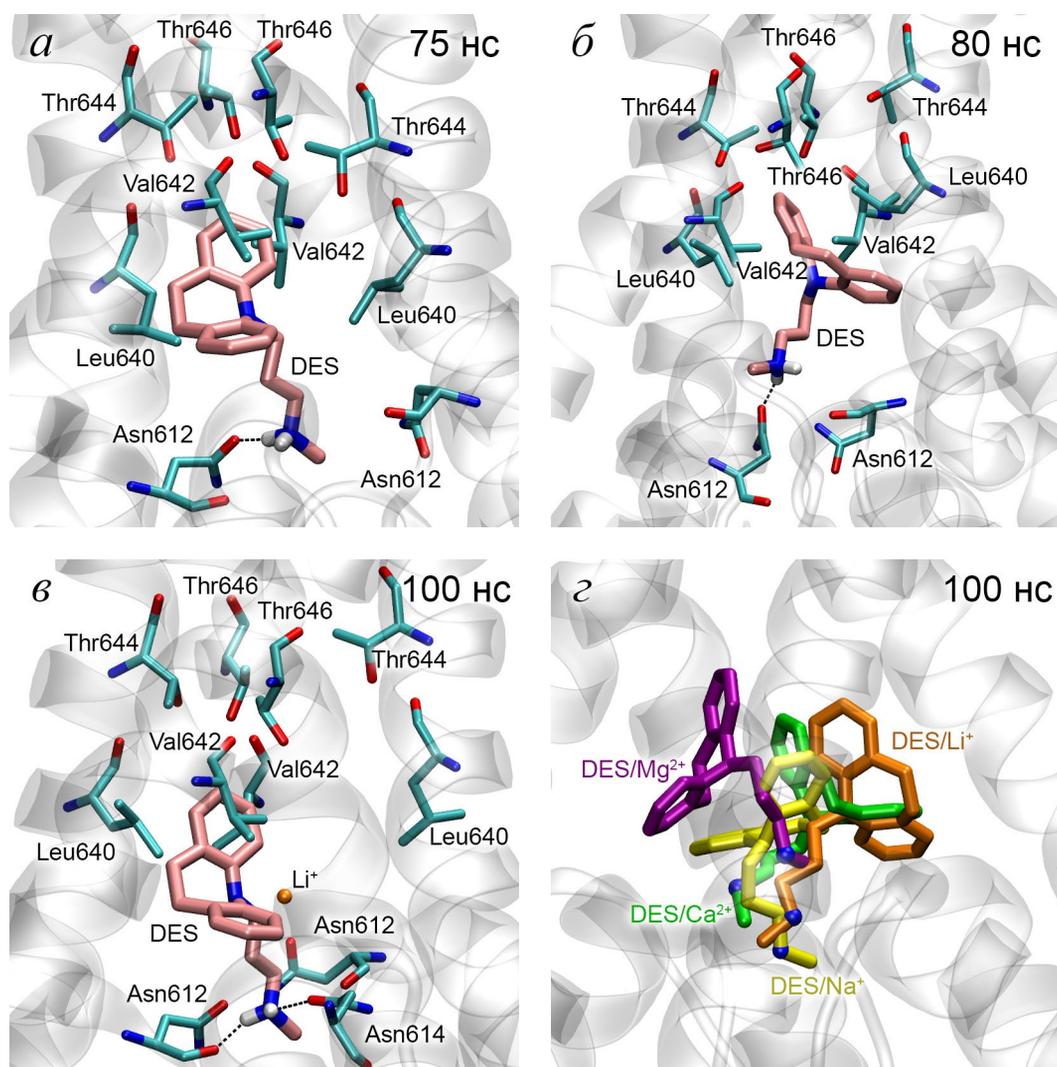
Согласно полученным расчетным данным, в случае присутствия катиона натрия внутри рецептора положение молекулы DES более стабильно внутри канала NMDAR, чем без него. Значение RMSD DES в первые 60 нс симуляции варьируется в диапазоне 0,4–1,2 Å, затем оставшиеся 40 нс симуляции – незначительно колеблется в районе 0,8 Å (рис. П6 в Приложении), что указывает на стабилизацию положения молекулы лиганда в сайте связывания. Значение RMSD Ca-атомов NMDAR увеличивается в течение первых 20 нс симуляции, затем выходит на плато и незначительно колеблется возле своего среднего значения 2,5 Å (рис. П6 в Приложении), что указывает на стабилизацию полипептидных цепей молекулы NMDAR.

Результат конформационного анализа комплекса DES с нижним сайтом NMDAR в присутствии катиона натрия представлен на рис. 6. Трициклическая группа препарата на протяжении всего периода симуляции остается связанной в окружении алифатических аминокислот Val642 субъединиц GluN1 и Leu640 субъединиц GluN2B (рис. 6, а–в). В течение первых 15 нс симуляции молекула дезипрамина еще глубже погружается в ионную пору, по сравнению с конформацией, полученной методом молекулярного докинга (рис. 1, д): в течение этих 15 нс один из атомов водорода взаимодействует с кислородом остова аспарагина Asn613 одной из субъединиц GluN2B (Asn613 расположен ближе к внутриклеточной стороне мембраны по сравнению с Asn612; рис. 6, а). Затем, на протяжении оставшегося периода симуляции оба атома водорода катионной группы DES (H1 и H2) попеременно

образуют водородные связи с атомами кислорода остова аминокислотных остатков Asn612 (O1 и O2): происходит вращение катионной группы вокруг связи C–N, и отдельно взятый атом водорода взаимодействует то с одной, то с другой субъединицей GluN2B (рис. 6, б–д). На рис. 6, б и в показано положение молекулы DES в сайте с одного и того же ракурса; видно, что в разные моменты симуляции метильный заместитель катионной группы направлен то в одну, то в другую сторону, что указывает на вращение катионной группы вокруг оси ионной поры. На рис. 6, г и д также можно увидеть, что после первых 15 нс симуляции каждый атом водорода катионной группы почти все время взаимодействует с одним из атомов кислорода остова Asn612, за исключением моментов конформационных переходов (поворота катионной группы).

Таким образом, согласно полученным данным, катион натрия в ионной поре стабилизирует связывание дезипрамина с нижним сайтом. Интересно отметить, что вопреки ожиданиям, катион натрия взаимодействует не с трициклической группой DES, а с атомами кислорода Asn614 одной из субъединиц GluN1 и Asn612 одной из субъединиц GluN2B, работая, таким образом, в качестве буфера между отрицательно заряженным азотом трициклической группы препарата и отрицательно заряженными кислородами аспарагинов (выше мы выдвинули предположение, что именно из-за близости азота DES и атомов кислорода аспарагинов дезипрамин не может удерживаться в нижнем сайте).

**Дезипрамин в нижнем сайте в присутствии Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> и Li<sup>+</sup> в ионной поре.** Аналогичный расчет мы провели для катионов кальция, магния и лития. Эти ионы были выбраны по следующим причинам. Катионы кальция, как и катионы натрия, могут проходить через ионную пору NMDAR, катион магния закрывает канал рецептора в неактивном состоянии, а литий известен своим нейропротекторным эффектом против эксайто-токсичности, опосредованной NMDAR. Результат вычислительного эксперимента представлен на рис. 7. Катион кальция выходит из ионной поры еще на стадии оптимизации системы, однако значительную часть времени симуляции остается связанным возле концевых аминокислот модели NMDAR (Leu655 субъединицы GluN1 и Gln653 субъединицы GluN2B) с внешней стороны плазматической мембраны (рис. П7, а в Приложении). В присутствии катиона кальция молекула DES в процессе симуляции переходит из нижнего сайта в верхний, и на протяжении большей части симуляции катионная группа DES взаимодействует с Asn612 одной из субъединиц GluN2B (рис. 7, а). Катион магния выходит из ионной поры NMDAR



**Рис. 7.** Взаимодействие дезипрамина (DES) с нижним сайтом NMDAR в присутствии катионов кальция, магния и лития в ионной поре (по данным МД). *а* – Положение молекулы DES в присутствии катиона кальция после 75 нс симуляции (катион кальция выходит из ионной поры в процессе оптимизации системы и не отображен на рисунке); *б* – положение молекулы DES в присутствии катиона магния после 80 нс симуляции (катион магния выходит из ионной поры после 47 нс симуляции и не отображен на рисунке); *в* – положение молекулы DES в присутствии катиона лития после 100 нс симуляции; *з* – выравнивание конечных конформаций DES после 100 нс в присутствии катионов натрия, кальция, магния и лития в ионной поре. Ключевые взаимодействия отмечены пунктирной линией. Второстепенные атомы водородов не отображены для четкости рисунка

после 47 нс симуляции и оставшееся время не взаимодействует с рецептором (рис. П7, б в Приложении). Молекула DES в процессе симуляции также переходит из нижнего сайта в верхний, на протяжении большей части симуляции катионная группа DES взаимодействует с Asn612 одной из субъединиц GluN2B (рис. 7, б). Катион лития в процессе симуляции остается связанным внутри ионной поры (рис. 7, в), молекула DES частично переходит из нижнего сайта в верхний. Один из атомов водорода катионной группы препарата в течение всей симуляции взаимодействует с атомом кислорода остова Asn612 одной из субъединиц GluN2B, другой атом водорода – с боковым радикалом Asn614 одной из субъединиц GluN1 (рис. 7, в).

На рис. 7, з представлено выравнивание конформаций комплексов NMDAR с DES после 100 нс симуляции в присутствии различных ионов. Глубже всего молекула DES связана в ионной поре в присутствии Na<sup>+</sup>, чуть выше – в присутствии Li<sup>+</sup>, еще выше – в присутствии Ca<sup>2+</sup>, и ближе всего к внешней стороне плазматической мембраны препарат находится в присутствии Mg<sup>2+</sup>. Таким образом, однозарядные катионы (Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>) в большей степени способствуют удержанию молекулы DES в нижнем сайте, чем двухзарядные (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>). При этом внутри каждой группы более тяжелый катион прочнее удерживает DES внутри ионной поры (натрий тяжелее лития и кальций тяжелее магния). По всей видимости, такой эффект обусловлен

Усредненные значения энергетических характеристик взаимодействия ТЦА с NMDAR

Препарат	$E_{LJ-SR}$ , ккал/моль	$E_{COUL-SR}$ , ккал/моль
ATL (верхний сайт)	-31,6	-12,2
CLO (верхний сайт)	-40,8	-29,1
DES (верхний сайт)	-29,3	-7,0
DES (нижний сайт)	-30,1	-10,9
DES (нижний сайт) + Na <sup>+</sup>	-29,2	-36,1

Примечание.  $E_{LJ-SR}$  и  $E_{COUL-SR}$  – энергии ван-дер-ваальсовых сил и кулоновских взаимодействий, рассчитанных для близких контактов между атомами ТЦА и NMDAR.

их гидратацией. Так, изначально катионы металлов были помещены в ионный канал без гидратной оболочки. Однако уже в процессе релаксации системы катионы Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> связывали молекулы воды, и к началу симуляции катион натрия был окружен двумя, катион лития – двумя, катион кальция – девятью, катион магния – семью молекулами воды. В процессе симуляции катион натрия удерживал 5–6 молекул H<sub>2</sub>O, лития – 4 молекулы, кальция – 7–8 молекул в несвязанном состоянии и 5 молекул – после связывания с концевыми аминокислотами NMDAR, магния – 7–8 молекул воды. Таким образом, из всех рассмотренных катионов магний наиболее прочно удерживает гидратную оболочку, с которой он покидает ионный канал. В некоторых структурах NMDAR, полученных экспериментально, присутствуют двухвалентные металлы. Так, структура 5UN1 [22] содержит катион магния, а структура 5H8N [38] – катион кальция. В обоих случаях катионы взаимодействуют с лиганд-связывающим доменом NMDAR, который в представленной работе был удален для ускорения моделирования. Будут ли ионы кальция и магния, связанные с LBD, оказывать эффект на взаимодействии ТЦА с NMDAR – еще предстоит выяснить в последующих вычислительных экспериментах с усложнением модели.

**Оценка энергетических характеристик взаимодействия ТЦА с NMDAR.** На заключительном этапе мы оценили энергетические характеристики взаимодействия ТЦА с NMDAR. Зависимость  $E_{LJ-SR}$  и  $E_{COUL-SR}$  от времени в виде скользящего среднего за период 5 нс представлена на рис. П8 в Приложении. В таблице представлены средние значения  $E_{LJ-SR}$  и  $E_{COUL-SR}$  за период симуляции 50–100 нс.

Согласно полученным данным, среднее значение энергии ван-дер-ваальсовых сил практически одинаково для всех препаратов (таблица) и слабо меняется в течение симуляции (рис. П8, а в При-

ложении). Исключение составляет лишь CLO, массивный атом хлора которого усиливает эффективность стерических взаимодействий. Энергия электростатических взаимодействий в случае ATL в верхнем сайте, DES в верхнем сайте и DES в нижнем сайте без Na<sup>+</sup> постепенно возрастает с поэтапной потерей водородных связей между препаратом и аспарагинами ионного канала (рис. П8, б в Приложении). В комплексах NMDAR с CLO в верхнем сайте и с DES в нижнем сайте в присутствии Na<sup>+</sup> близкий контакт между атомами водородов препаратов и аспарагинами NMDAR сохраняется дольше (в случае CLO молекулу лиганда удерживает галогенная связь, в случае DES – катион натрия), поэтому электростатические взаимодействия сильны на протяжении всей симуляции (рис. П8, б в Приложении). За счет этого среднее значение  $E_{COUL-SR}$  для CLO и DES существенно ниже по сравнению с ATL (таблица), что согласуется с экспериментальными данными о том, что ATL – более слабый блокатор NMDAR.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На заключительном этапе мы сопоставили известные экспериментальные данные о взаимодействии ATL, CLO и DES с NMDAR с результатами компьютерного моделирования, представленными в данной работе. Ранее методом локальной фиксации потенциала (patch-clamp) нашей научной группой были определены количественные характеристики взаимодействия ATL, CLO и DES с NMDAR. Так, на пирамидальных нейронах крыс, выделенных из поля CA1 гиппокампа, было установлено, что IC<sub>50</sub> для ATL и DES составляют соответственно 14,0 и 1,4 мкМ в безмагниевой среде при мембранном потенциале –80 мВ; 570 и 6,8 мкМ – в безмагниевой среде при мембранном потенциале –30 мВ; 110 и 15 мкМ – в присутствии 1 мМ Mg<sup>2+</sup> при мембранном потенциале –30 мВ [16]. На первичной культуре кортикальных нейронов крыс было установлено, что в бескальциевой среде при мембранном потенциале –70 мВ значения IC<sub>50</sub> для ATL, CLO и DES составляют 106, 24 и 8 мкМ соответственно, а при нулевом потенциале – 321, 91 и 60 мкМ соответственно [17, 21]. Таким образом, независимо от условий эксперимента вторичный амин DES эффективнее взаимодействует с NMDAR, по сравнению с третичными аминами ATL и CLO [16, 17], причем разница между DES и CLO менее существенная, чем между DES и ATL.

Оценочные значения энергетических характеристик связывания ATL, CLO и DES с NMDAR, полученные *in silico* (таблица) в целом согласуются с экспериментальными данными. В представленной

работе мы показали, что более высокая аффинность NMDAR к DES по сравнению с другими ТЦА, обусловливается тем, что за счет одновременного взаимодействия двух атомов водорода катионной группы DES с Asn612 субъединиц GluN2B (с атомами кислорода боковых радикалов в верхнем сайте или атомами кислорода остова в нижнем сайте) он прочнее удерживается внутри поры канала NMDA-рецептора. CLO благодаря галогенной связи между атомом хлора препарата и боковым радикалом Asn614 одной из субъединиц GluN1 прочнее связывается с NMDAR по сравнению с ATL.

Проведенные ранее электрофизиологические эксперименты выявили, что CLO и DES, имеющие атом азота в составе трициклической группы, существенно эффективнее взаимодействует с NMDAR по сравнению с ATL [16, 17]. Согласно нашим расчетам, атом азота трициклической группы CLO и DES не образует каких-либо близких контактов внутри ионной поры NMDAR ни с соседними аминокислотами, ни с молекулами воды, таким образом, не оказывая видимого влияния на эффективность взаимодействия. Этому несоответствию экспериментальных и расчетных данных может быть несколько объяснений. Во-первых, отрицательно заряженный атом азота может способствовать более эффективному закориванию CLO и DES на поверхности рецептора (возле некоторой, пока неустановленной, положительно заряженной группы). Однако это предположение не объясняет тот факт, что эффективность канального блока мепантина, не имеющего в своей структуре отрицательно заряженного атома азота, сопоставима с эффективностью DES [39]. Во-вторых, дополнительный отрицательно заряженный атом в трициклической группе (вместе с положительно заряженной «хвостовой» группой) влияет на величину дипольного момента CLO и DES, позволяя им быстрее продвигаться к сайту связывания. С помощью программы Avogadro v1.2.0 [19] мы рассчитали вектор и величину дипольного момента исследуемых ТЦА. Согласно полученным данным, вектор дипольного момента всех трех соединений направлен (с небольшими отклонениями) вдоль алифатического фрагмента перпендикулярно трициклической группе, тогда как значения дипольного момента составляют 18,431, 23,366 и 23,277 дебаев для ATL, CLO и DES соответственно. Впрочем, это предположение не объясняет, почему в экспериментах patch-clamp CLO и DES эффективнее связываются с NMDAR даже при нулевой разнице потенциалов [17]. И, в-третьих, ATL из-за дополнительной двойной связи обладает меньшей конформационной подвижностью, из-за чего молекуле этого препарата сложнее проникнуть внутрь ионной поры. Это объяснение кажется нам наиболее вероятным. Так, Song et al. [22] смо-

делировали возможное взаимодействие МК-801 с NMDAR. Согласно предложенной модели, при входе препарата в ионный канал плоскость трициклической МК-801 параллельна оси канала (то есть молекула заходит в канал «боком»). Мы полагаем, что жесткая двойная связь в алифатическом фрагменте ATL работает своего рода спицей, усложняющей проникновение препарата в канал. Для проверки этого предположения понадобится усложнить вычислительный эксперимент, добавив к трехмерной структуре NMDAR внеклеточные фрагменты (которые в представленной работе мы не включали в модель рецептора), что является нашей задачей в ближайшем будущем.

И наконец, согласно электрофизиологическим данным, сайт связывания DES расположен ближе к внутренней стороне мембраны (ниже по оси канала) по сравнению с сайтом связывания амитриптилина и кломипрамина [17]. Действительно, методом молекулярного докинга нам удалось показать, что один из сайтов связывания DES расположен ближе к внутренней стороне мембраны. Положение DES в нижнем сайте менее устойчиво, по сравнению с верхним, за счет близкого расстояния между отрицательно заряженным атомом азота трициклической группы и отрицательно заряженными атомами кислорода боковых радикалов Asn612. Однако присутствие катиона натрия (но не кальция, магния или лития) стабилизирует молекулу DES в нижнем сайте. Мы полагаем, что катион натрия может служить буфером между отрицательно заряженным атомом азота трициклической группы и отрицательно заряженными атомами кислорода боковых радикалов Asn612 (катион лития слишком легкий и подвижный, а двухзарядные катионы магния и кальция уходят из ионной поры). Интересно отметить, что среди рассмотренных нами моделей модель с катионом натрия внутри канала NMDAR наиболее близка к реальным условиям, в которых находится рецептор: именно у ионов натрия самая высокая концентрация во внеклеточном пространстве.

Однако высокая аффинность NMDAR к DES имеет и обратный эффект. Более прочное связывание DES с NMDAR приводит к тому, что этот препарат обладает более сильными побочными эффектами по сравнению с ATL [40], поскольку NMDAR вовлечены не только в передачу болевого сигнала, но и во многие другие жизненно важные процессы в организме. Более того, слабое взаимодействие ATL с NMDAR (значения  $IC_{50}$  в бескальциевой среде выше терапевтических концентраций) не объясняет высокую противоболевую эффективность этого препарата. Ранее нашей научной группой в эксперименте patch-clamp было показано, что ингибиторная активность ATL по отношению к NMDAR

существенно растет с увеличением концентрации кальция в среде [21]. Это дало основание высказать предположение, что в терапевтически релевантных концентрациях ATL ингибирует NMDAR опосредованно, через натрий-кальциевый обменник (NCX), который отвечает за кальциевую десенситизацию NMDAR [41, 42]. Аналогичный эффект (хоть и менее выраженный) был выявлен и для CLO и DES [17] с той лишь разницей, что в терапевтически релевантных концентрациях эти вещества, в отличие от ATL, могут ингибировать рецептор как опосредованно через NCX, так и прямой блокадой ионного канала NMDAR. Терапия ATL, DES и CLO, как свидетельствуют клинические данные, негативно воздействует на сердечно-сосудистую систему, что ограничивает их клиническое применение. Часто наблюдаются изменения на ЭКГ пациентов, получающих такую терапию: наблюдается расширение комплекса QRS, изменения интервала PQ, интервала ST или зубца T. Важно отметить, что сила этих воздействий коррелирует с аффинностью препаратов к NMDAR:  $ATL < CLO < DES$ .

Ранее нами было проведено комплексное химико-фармакологическое исследование KB-R7943, являющегося селективным блокатором NCX как препарата для купирования нейропатической боли, вызванной сахарным диабетом 1-го типа, в сравнении с действием ATL на животной модели – самцах крыс породы Wistar с индуцированным стрептозотоцином сахарным диабетом 1-го типа [43]. Поведенческими тестами была доказана эффективность KB-R7943 для купирования нейропатической боли при сахарном диабете 1-го типа: препарат оказывает противоболевой эффект, сопоставимый со стандартной терапией ATL, что выражается в снижении интенсивности термической, механической и химической аллодинии. Для выявления возможных негативных воздействий противоболевой терапии KB-R7943 на протяжении многодневной терапии регистрировали ЭКГ животных. По результатам ЭКГ было доказано, что KB-R7943 безопасен: введение KB-R7943 контрольным и диабетическим крысам не оказывает воздействия на работу сердца и не проявляет негативного влияния на локомоторную активность животных [44]. Напротив, в наших экспериментах на животной модели были отмечены негативные изменения при терапии ATL и у контрольных здоровых животных, но особенно у крыс с сахарным диабетом 1-го типа. Таким образом, в ряду ТЦА, эффективных для купирования нейропатической боли, высокая эффективность взаимодействия препарата с NMDAR является отрицательной характеристикой, приводящей к нежелательным побочным эффектам. Преимуществом будут обладать те препараты, которые влия-

ют на работу NMDAR опосредованно, селективно ингибируя NCX, не блокируя при этом ионный канал рецептора.

Следует обговорить и основные ограничения представленной работы, которые связаны с несовершенством методов молекулярного моделирования. В методе классической МД, в отличие от квантово-механического приближения, молекула рассматривается не как совокупность ядер и электронов, а как система атомов, законы взаимодействия между которыми описываются эмпирически установленными функциями. Поэтому с помощью классической МД невозможно смоделировать образование и разрыв ковалентных связей, таутомеризацию молекул, изменение состояния протонирования лигандов и аминокислот сайта связывания в процессе симуляции, а также смоделировать разность потенциалов между внешней и внутренней стороной плазматической мембраны. Из ограничений представленной работы можно также отметить тот факт, что в качестве модели NMDAR мы использовали только фрагменты субъединиц рецептора, образующих пору канала, исключив массивную внеклеточную часть. Поэтому полученные результаты дают информацию лишь о «конечной» точке взаимодействия препаратов с NMDAR, не учитывая процессы закоривания ТЦА с внеклеточными доменами и их прохождения к сайту связывания. Поэтому только совместное применение расчетных и экспериментальных методик, которые дополняют и уточняют друг друга, может дать полное представление о взаимодействии ТЦА с NMDAR.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно систематическому анализу эпидемиологических исследований, распространенность нейропатической боли среди населения составляет 7–10% [45–47]. Хроническая нейропатическая боль снижает качество жизни и трудоспособность пациентов, увеличивает риск смерти больных [47, 48]. Совершенствование противоболевой терапии, увеличение ее эффективности и безопасности по-прежнему является актуальной задачей. В представленном исследовании методами молекулярного моделирования мы изучили механизм взаимодействия ТЦА, обладающих противоболевым эффектом, с NMDAR и показали, как на молекулярном уровне структурные особенности препаратов и катионное окружение влияют на эффективность этого взаимодействия. Сопоставление полученных результатов с известными экспериментальными и клиническими данными дает основание утверждать, что при поиске эффективных и, что не менее важно, безопасных противоболе-

вых препаратов среди ингибиторов NMDAR следует руководствоваться не столько силой их прямого ингибирующего эффекта, сколько их способностью влиять на работу NMDAR опосредованно, не участвуя при этом в прямой блокаде рецептора. Среди же веществ, влияющих на NMDAR опосредованно (например, ингибиторов NCX), следует отбирать те, которые обладают минимальной эффективностью прямой каналоблокады, как бы парадоксально это ни звучало. Выявленные нами в представленной работе особенности взаимодействия ТЦА с NMDAR помогут проводить отбор эффективных и безопасных анальгетиков среди клинически одобренных лекарственных средств вместо многолетнего поиска и внедрения новых препаратов.

**Вклад авторов.** Н.Н. Шестакова – концепция и руководство работой; Д.А. Белинская и Н.Н. Шестакова – проведение экспериментов, обсужде-

ние результатов исследования, написание текста; Н.Н. Шестакова – редактирование текста статьи.

**Финансирование.** Данная работа финансировалась за счет средств бюджета ИЭФБ РАН в рамках государственного задания № 075-00264-24-00.

**Благодарности.** Результаты работы получены с использованием вычислительных ресурсов суперкомпьютерного центра Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого (<https://scc.spbstu.ru/>).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

**Дополнительные материалы.** Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Obata, H. (2017) Analgesic mechanisms of antidepressants for neuropathic pain, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 2483, <https://doi.org/10.3390/ijms18112483>.
2. Fornasari, D. (2017) Pharmacotherapy for neuropathic pain: a review, *Pain Ther.*, **6** (Suppl 1), 25-33, <https://doi.org/10.1007/s40122-017-0091-4>.
3. Lenkey, N., Karoly, R., Kiss, J. P., Szasz, B. K., Vizi, E. S., and Mike, A. (2006) The mechanism of activity-dependent sodium channel inhibition by the antidepressants fluoxetine and desipramine, *Mol. Pharmacol.*, **70**, 2052-2063, <https://doi.org/10.1124/mol.106.026419>.
4. Wu, W., Ye, Q., Wang, W., Yan, L., Wang, Q., Xiao, H., and Wan, Q. (2012) Amitriptyline modulates calcium currents and intracellular calcium concentration in mouse trigeminal ganglion neurons, *Neurosci. Lett.*, **506**, 307-311, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.11.031>.
5. Cardoso, F. C., Schmit, M., Kuiper, M. J., Lewis, R. J., Tuck, K. L., and Duggan, P. J. (2021) Inhibition of N-type calcium ion channels by tricyclic antidepressants – experimental and theoretical justification for their use for neuropathic pain, *RSC Med. Chem.*, **13**, 183-195, <https://doi.org/10.1039/d1md00331c>.
6. Punke, M. A., and Friederich, P. (2007) Amitriptyline is a potent blocker of human Kv1.1 and Kv7.2/7.3 channels, *Anesth. Analg.*, **104**, 1256-1264, <https://doi.org/10.1213/01.ane.0000260310.63117.a2>.
7. Cottingham, C., Percival, S., Birky, T., and Wang, Q. (2014) Tricyclic antidepressants exhibit variable pharmacological profiles at the alpha(2A) adrenergic receptor, *BBRC*, **451**, 461-466, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.024>.
8. Proudman, R. G. W., Pupo, A. S., and Baker, J. G. (2020) The affinity and selectivity of  $\alpha$ -adrenoceptor antagonists, antidepressants, and antipsychotics for the human  $\alpha$ 1A,  $\alpha$ 1B, and  $\alpha$ 1D-adrenoceptors, *Pharmacol. Res. Perspect.*, **8**, 00602, <https://doi.org/10.1002/prp2.602>.
9. Onali, P., Dedoni, S., and Olanas, M. C. (2010) Direct agonist activity of tricyclic antidepressants at distinct opioid receptor subtypes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **332**, 255-265, <https://doi.org/10.1124/jpet.109.159939>.
10. Jeong, B., Song, Y. P., Chung, J. Y., Park, K. C., Kim, J., So, I., and Hong, C. (2023) Low concentrations of tricyclic antidepressants stimulate TRPC4 channel activity by acting as an opioid receptor ligand, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **324**, C1295-C1306, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00535.2022>.
11. Lin, H., Heo, B. H., Kim, W. M., Kim, Y. C., and Yoon, M. H. (2015) Antiallodynic effect of tianeptine via modulation of the 5-HT7 receptor of GABAergic interneurons in the spinal cord of neuropathic rats, *Neurosci. Lett.*, **598**, 91-95, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.05.013>.
12. Moraczewski, J., Awosika, A. O., and Aedma, K. K. (2003) Tricyclic Antidepressants, in *StatPearls [Internet]*, StatPearls Publishing, Treasure Island, F.L.
13. Tohda, M., Urushihara, H., and Nomura, Y. (1995) Inhibitory effects of antidepressants on NMDA-induced currents in *Xenopus* oocytes injected with rat brain RNA, *Neurochem. Int.*, **26**, 53-58, [https://doi.org/10.1016/0197-0186\(94\)00101-Y](https://doi.org/10.1016/0197-0186(94)00101-Y).

14. Szasz, B. K., Mike, A., Karoly, R., Gerevich, Z., Illes, P., Vizi, E. S., and Kiss, J. P. (2007) Direct inhibitory effect of fluoxetine on N-methyl-D-aspartate receptors in the central nervous system, *Biol. Psychiatry*, **62**, 1303-1309, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.04.014>.
15. Kohno, T., Kimura, M., Sasaki, M., Obata, H., Amaya, F., and Saito, S. (2012) Milnacipran inhibits glutamatergic N-methyl-D-aspartate receptor activity in spinal dorsal horn neurons, *Mol. Pain*, **8**, 45, <https://doi.org/10.1186/1744-8069-8-45>.
16. Barygin, O. I., Nagaeva, E. I., Tikhonov, D. B., Belinskaya, D. A., Vanchakova, N. P., and Shestakova, N. N. (2017) Inhibition of the NMDA and AMPA receptor channels by antidepressants and antipsychotics, *Brain Res.*, **1660**, 58-66, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.01.028>.
17. Stepanenko, Y. D., Sibarov, D. A., Shestakova, N. N., and Antonov, S. M. (2022) Tricyclic antidepressant structure-related alterations in calcium-dependent inhibition and open-channel block of NMDA receptors, *Front. Pharmacol.*, **12**, 815368, <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.815368>.
18. Belinskaia, D. A., Belinskaia, M. A., Barygin, O. I., Vanchakova, N. P., and Shestakova, N. N. (2019) Psychotropic drugs for the management of chronic pain and itch, *Pharmaceuticals (Basel)*, **12**, 99, <https://doi.org/10.3390/ph12020099>.
19. Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., and Hutchison, G. R. (2012) Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform, *J. Cheminform.*, **4**, 17, <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>.
20. Hansen, K. B., Yi, F., Perszyk, R. E., Furukawa, H., Wollmuth, L. P., Gibb, A. J., and Traynelis, S. F. (2018) Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors, *J. Gen. Physiol.*, **150**, 1081-1105, <https://doi.org/10.1085/jgp.201812032>.
21. Stepanenko, Y. D., Boikov, S. I., Sibarov, D. A., Abushik, P. A., Vanchakova, N. P., Belinskaia, D., Shestakova, N. N., and Antonov, S. M. (2019) Dual action of amitriptyline on NMDA receptors: enhancement of Ca-dependent desensitization and trapping channel block, *Sci. Rep.*, **9**, 19454, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56072-z>.
22. Song, X., Jensen, M. Ø., Jogini, V., Stein, R. A., Lee, C. H., Mchaourab, H. S., Shaw, D. E., and Gouaux, E. (2018) Mechanism of NMDA receptor channel block by MK-801 and memantine, *Nature*, **556**, 515-519, <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0039-9>.
23. Chou, T. H., Epstein, M., Michalski, K., Fine, E., Biggin, P. C., and Furukawa, H. (2022) Structural insights into binding of therapeutic channel blockers in NMDA receptors, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **29**, 507-518, <https://doi.org/10.1038/s41594-022-00772-0>.
24. UniProt Consortium (2023) UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023, *Nucleic Acids Res.*, **51**, D523-D531, <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>.
25. Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., and Higgins, D. G. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega, *Mol. Syst. Biol.*, **7**, 539, <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>.
26. Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996) VMD: visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.*, **14**, 33-38, [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
27. Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kalé, L., and Schulten, K. (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD, *J. Comput. Chem.*, **26**, 1781-1802, <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>.
28. Lyskov, S., Chou, F. C., Conchúir, S. Ó., Der, B. S., Drew, K., Kuroda, D., Xu, J., Weitzner, B. D., Renfrew, P. D., Sripakdeevong, P., Borgo, B., Havranek, J. J., Kuhlman, B., Kortemme, T., Bonneau, R., Gray, J. J., and Das, R. (2013) Serverification of molecular modeling applications: the Rosetta Online Server that Includes Everyone (ROSIE), *PLoS One*, **8**, 63906, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063906>.
29. Wu, E. L., Cheng, X., Jo, S., Rui, H., Song, K. C., Dávila-Contreras, E. M., Qi, Y., Lee, J., Monje-Galvan, V., Venable, R. M., Klauda, J. B., and Im, W. (2014) CHARMM-GUI Membrane Builder toward realistic biological membrane simulations, *J. Comput. Chem.*, **35**, 1997-2004, <https://doi.org/10.1002/jcc.23702>.
30. Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., and Lindahl, E. (2015) GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers, *SoftwareX*, **1-2**, 19-25, <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>.
31. Huang, J., Rauscher, S., Nawrocki, G., Ran, T., Feig, M., de Groot, B. L., Grubmüller, H., and MacKerell, A. D., Jr. (2017) CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins, *Nat. Methods*, **14**, 71-73, <https://doi.org/10.1038/nmeth.4067>.
32. Bussi, G., Zykova-Timan, T., and Parrinello, M. (2009) Isothermal-isobaric molecular dynamics using stochastic velocity rescaling, *J. Chem. Phys.*, **130**, 074101, <https://doi.org/10.1063/1.3073889>.
33. Parrinello, M., and Rahman, A. (1981) Polymorphic transitions in single crystals: a new molecular dynamics method, *J. Appl. Phys.*, **52**, 7182-7190, <https://doi.org/10.1063/1.328693>.
34. Darden, T., York, D., and Pedersen, L. (1993) Particle mesh Ewald: An N log(N) method for Ewald sums in large systems, *J. Chem. Phys.*, **3**, 10089-10092, <https://doi.org/10.1063/1.464397>.

35. Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C., and Fraaije, J. G. E. M. (1997) LINC: A linear constraint solver for molecular simulations, *J. Comp. Chem.*, **18**, 1463-1473, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199709\)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H).
36. Kortagere, S., Ekins, S., and Welsh, W. J. (2008) Halogenated ligands and their interactions with amino acids: implications for structure-activity and structure-toxicity relationships, *J. Mol. Graph. Model.*, **27**, 170-177, <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2008.04.001>.
37. Shestakova, N. N., and Vanchakova, N. P. (2006) Theoretical conformational analysis of antidepressant as a way for evaluation of their efficiency for pain and itch syndrome management in patients with end-stage renal disease under chronic hemodialysis, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **409**, 203-205, <https://doi.org/10.1134/s160767290604003x>.
38. Hackos, D. H., Lupardus, P. J., Grand, T., Chen, Y., Wang, T. M., Reynen, P., Gustafson, A., Wallweber, H. J., Volgraf, M., Sellers, B. D., Schwarz, J. B., Paoletti, P., Sheng, M., Zhou, Q., and Hanson, J. E. (2016) Positive allosteric modulators of GluN2A-containing NMDARs with distinct modes of action and impacts on circuit function, *Neuron*, **89**, 983-999, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.016>.
39. Parsons, C. G., Panchenko, V. A., Pinchenko, V. O., Tsyndrenko, A. Y., and Krishtal, O. A. (1996) Comparative patch-clamp studies with freshly dissociated rat hippocampal and striatal neurons on the NMDA receptor antagonistic effects of amantadine and memantine, *Eur. J. Neurosci.*, **8**, 446-454, <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1996.tb01228.x>.
40. Riediger, C., Schuster, T., Barlind, K., Maier, S., Weitz, J., and Siepmann, T. (2017) Adverse effects of antidepressants for chronic pain: a systematic review and meta-analysis, *Front. Neurol.*, **8**, 307, <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00307>.
41. Sibarov, D. A., Abushik, P. A., Poguzhelskaya, E. E., Bolshakov, K. V., and Antonov, S. M. (2015) Inhibition of plasma membrane Na/Ca-exchanger by KB-R7943 or lithium reveals its role in Ca-dependent N-methyl-d-aspartate receptor inactivation, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **355**, 484-495, <https://doi.org/10.1124/jpet.115.227173>.
42. Sibarov, D. A., Poguzhelskaya, E. E., and Antonov, S. M. (2018) Downregulation of calcium-dependent NMDA receptor desensitization by sodium-calcium exchangers: a role of membrane cholesterol, *BMC Neurosci.*, **19**, 73, <https://doi.org/10.1186/s12868-018-0475-3>.
43. Шестакова Н. Н., Сухов И. Б., Андреева-Гатева П. (2023) Доклиническое исследование противоболевой терапии при диабетической нейропатии на животной модели, *Вестн. БГМУ*, **2**, 19-21.
44. Сухов И. Б., Чистякова О. В., Баюнова Л. В., Шестакова Н. Н. (2023) Оценка побочных эффектов применения ингибитора Na-Ca обменника KB-R7943 как противоболевого препарата при диабетической нейропатии у крыс, *Интегр. физиол.*, **4**, 69-78, <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2023-4-1-69-78>.
45. Van Hecke, O., Austin, S. K., Khan, R. A., Smith, B. H., and Torrance, N. (2014) Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies, *Pain*, **155**, 654-662, <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.11.013>.
46. Bouhassira, D. (2019) Neuropathic pain: definition, assessment and epidemiology, *Rev. Neurol. (Paris)*, **175**, 16-25, <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2018.09.016>.
47. Smith, B. H., Hébert, H. L., and Veluchamy, A. (2020) Neuropathic pain in the community: prevalence, impact, and risk factors, *Pain*, **161**, S127-S137, <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001824>.
48. Smith, B. H., and Torrance, N. (2012) Epidemiology of neuropathic pain and its impact on quality of life, *Curr. Pain Headache Rep.*, **16**, 191-198, <https://doi.org/10.1007/s11916-012-0256-0>.

## STRUCTURE- AND CATION-DEPENDENT MECHANISM OF THE INTERACTION OF TRICYCLIC ANTIDEPRESSANTS WITH NMDA RECEPTOR ACCORDING TO MOLECULAR MODELING DATA

D. A. Belinskaia\* and N. N. Shestakova

*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences,  
194223 St. Petersburg, Russia; e-mail: d\_belinskaya@mail.ru*

Some tricyclic antidepressants (TCA), including amitriptyline (ATL), clomipramine (CLO), and desipramine (DES), are known to be effective for the management of neuropathic pain. It was previously determined that ATL, CLO and DES are capable of voltage-dependent blocking of NMDA receptors of glutamate

(NMDAR), which play a key role in the pathogenesis of neuropathic pain. Despite the similar structure of ATL, CLO and DES, efficacy of their interaction with NMDAR varies significantly. In the study presented here, we applied the molecular modeling methods to investigate the mechanism of binding of ATL, CLO and DES to NMDAR and to identify the structural features of the drugs that determine their inhibitory activity against NMDAR. Molecular docking of the studied TCA into the NMDAR channel was performed. The conformational behavior of the obtained complexes in lipid bilayer was simulated by the method of molecular dynamics (MD). A single binding site (upper) for the tertiary amines ATL and CLO and two binding sites (upper and lower) for the secondary amine DES were identified inside the NMDAR channel. The upper and lower binding sites are located along the channel axis at different distances from the extracellular side of the plasmatic membrane (PM). MD simulation revealed that the position of DES in the lower site is stabilized only in the presence of sodium cation inside the NMDAR channel. DES binds more strongly to NMDAR compared to ATL and CLO due to the simultaneous interaction of two hydrogen atoms of its cationic group with the asparagine residues of the ion pore of the receptor. This feature may be responsible for stronger side effects of DES. It has been hypothesized that ATL binds to NMDAR less efficiently compared to DES and CLO due to its lower conformational mobility. The identified features of the structure- and cation-dependent mechanism of interaction between TCA and NMDAR will help in the further development of effective and safe analgesic therapy.

*Keywords:* tricyclic antidepressants, neuropathic pain, NMDA receptor, molecular docking, molecular dynamics