

Взаимодействие трициклических антидепрессантов с NMDA-рецептором по данным компьютерного моделирования

Белинская Д.А., Шестакова Н.Н.

ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН

daria.belinskaya@iephb.ru

Известно, что трициклические антидепрессанты (ТСА) amitriptyline (ATL), desipramine (DES) и clomipramine (CLO) способны потенциал-зависимо блокировать трансмембранные глутаматные NMDA-рецепторы (NMDAR), играющие ключевую роль в патогенезе нейропатической боли, чем может быть обусловлен их противоболевой эффект. Несмотря на схожую структуру, ATL, DES и CLO взаимодействуют с NMDAR с разной эффективностью. Цель представленного исследования – методами компьютерного моделирования изучить связывание ATL, DES и CLO с NMDAR, определить вклад различных взаимодействий в этот процесс и выявить структурные особенности препаратов, определяющих их антиглутаматергическую активность. Был проведен молекулярный докинг исследуемых ТСА в ионную пору NMDAR, методом молекулярной динамики рассчитаны конформационные изменения полученных комплексов в липидном бислое. Согласно полученным данным, DES может связываться внутри ионной поры NMDAR в двух сайтах (верхнем и нижнем), которые различаются локализацией на оси канала относительно внеклеточной стороны плазматической мембраны. Комплекс DES с верхним сайтом, расположенным ближе к внеклеточной стороне липидного бислоя, более устойчив по сравнению с нижним. ATL и CLO могут связываться внутри канала только в верхнем сайте. За счет одновременного взаимодействия двух атомов водорода своей аминогруппы с тремя аминокислотными остатками аспарагина в ионной поре, DES прочнее связывается с NMDAR по сравнению с ATL и CLO. Выдвинуто предположение, что ATL менее эффективно связывается с NMDAR по сравнению с DES и CLO из-за меньшей конформационной подвижности.

Ключевые слова: трициклические антидепрессанты, NMDA-рецептор, молекулярный докинг, молекулярная динамика.

Interaction of tricyclic antidepressants with the NMDA receptor according to computer simulation data

Belinskaia D.A., Shestakova N.N.

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences

It is known that tricyclic antidepressants (TCA) amitriptyline (ATL), desipramine (DES), and clomipramine (CLO) are capable of voltage-dependently blocking transmembrane NMDA glutamate receptors (NMDAR), which play a key role in the pathogenesis of neuropathic pain. This interaction may determine their analgesic effect. Despite the similar structure, ATL, DES and CLO interact with NMDAR with different efficiency. The purpose of the study is to investigate the binding of ATL, DES, and CLO to NMDAR using computer simulations, to determine the contribution of various interactions to this process, and to reveal the structural features of the drugs that determine their antiglutamatergic activity. Molecular docking of the studied TCA into the NMDAR ionic pore was performed, then the conformational changes of the obtained complexes in lipid bilayer were calculated using molecular dynamics method. According to the obtained data, DES can bind inside the NMDAR ionic pore in two sites (upper and lower), which differ in their localization on the channel axis relative to the extracellular side of cytoplasmic membrane. The complex of DES with the upper site, which is located closer to the extracellular side of the lipid bilayer, is more stable than with the lower one. ATL and CLO can only bind within the channel in the upper site. DES binds more strongly to NMDAR compared to ATL and CLO due to the simultaneous interaction of two hydrogen atoms of its amino group with three asparagines inside the ionic pore. It has been proposed that ATL binds less efficiently to NMDAR compared to DES and CLO due to less conformational mobility.

Key words: tricyclic antidepressants, NMDA receptor, molecular docking, molecular dynamics.

1. Введение

Как минимум у половины больных, страдающих от хронической боли, диагностируются психические расстройства депрессивного и/или тревожного характера. [1]. Таким пациентам необходима компенсаторная терапия психотропными препаратами (ПП, антиконвульсантами, антидепрессантами и антипсихотиками) [2]. Накапливаются данные, что некоторые ПП обладают собственной анальгетической эффективностью за счет взаимодействия со вторичными молекулярными мишенями в центральной нервной системе [3]. Согласно клиническим данным, трициклические антидепрессанты (ТСА) амитриптилин (ATL), дезипрамин (DES) и кломипрамин (CLO) эффективны для управления синдромом нейропатической боли [2]. Ранее методом локальной фиксации потенциала было показано, что ATL, DES и CLO способны потенциал-зависимо блокировать глутаматные NMDA-рецепторы (NMDAR), играющие ключевую роль в патогенезе нейропатического болевого синдрома [4, 5], чем может быть отчасти обусловлен их противоболевой эффект. Однако, несмотря на схожую структуру, ATL, DES и CLO взаимодействуют с NMDAR с разной эффективностью [4, 5]. Цель представленного исследования – методами компьютерного моделирования изучить связывание ATL, DES и CLO с NMDAR, определить вклад различных взаимодействий в этот процесс и выявить структурные особенности препаратов, определяющих их антиглутаматергическую активность. Полученные данные помогут проводить отбор эффективных и безопасных анальгетиков среди клинически одобренных антидепрессантов, антиконвульсантов и антипсихотиков.

2. Методы

Согласно нашим предыдущим расчетам [6], при физиологических значениях pH аминокетильная группа ТСА протонирована, а атом азота трициклической группы DES и CLO депротонирован (рис. 1). Трехмерные модели ATL, DES и CLO строили и оптимизировали методом минимизации энергии с помощью программного пакета HyperChem 8.0 [7].

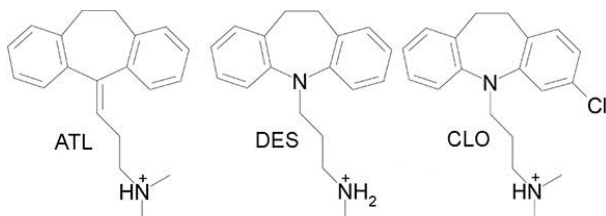


Рис. 1. Структуры исследованных трициклических антидепрессантов: амитриптилин (ATL), дезипрамин (DES), кломипрамин (CLO).

Подготовка трехмерной модели NMDAR описана в нашей предыдущей работе [6]. Коротко,

NMDAR локализован в плазматической мембране и представляет собой тетрамер, в состав которого входят две субъединицы GluN1 и две субъединицы GluN2 (2A, 2B или 2C) [8]. Для вычислительных экспериментов использовали модель NMDA-рецептора африканской лягушки *Xenopus laevis* с молекулой дизоцилпина (МК-801), связанной внутри канала рецептора, состоящего из двух субъединиц GluN1 и двух субъединиц GluN2B (код структуры pdb 5UN1 [9]). Для моделирования оставили только фрагменты субъединиц рецептора, образующих пору канала: аминокислоты 600–653 субъединиц GluN1 и аминокислоты 598–653 субъединиц GluN2B. Все остальные аминокислоты и лиганды были удалены из модели. Недостающие атомы были добавлены с использованием программного пакета VMD [10], затем модель оптимизировали методом минимизации энергии с использованием программы NAMD [11].

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 [12]. Для того, чтобы охватить всё пространство поры канала, для каждого лиганда процедуру докинга проводили дважды. В первом запуске центром области поиска задавали координаты атома азота МК-801 в структуре 5UN1, во втором запуске – точку, расположенную на 14 Å глубже в пору 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.

Полученные методом молекулярного докинга комплексы лигандов с NMDAR виртуально встраивали в липидный бислой размером 80 × 80 Å, состоящий из молекул 1-пальмитойл-2-олеойл-sn-глицеро-3-фосфохолина (POPC), с помощью онлайн-сервиса CHARMM-GUI Membrane Builder [13]. 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.

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 [14] и силовое поле CHARMM36m [15]. 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.

3. Результаты и обсуждение

На первом этапе был проведен молекулярный докинг ATL, DES и CLO в ионную пору канала NMDAR. 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. 2). В первом (верхнем) сайте трициклическая группа препарата связывается в окружении аминокислот Val642 и Thr646 субъединиц GluN1 и аминокислот Leu640 и Thr644 субъединиц GluN2B (рис. 2A). Атомы водорода аминокислоты DES образуют водородные связи с атомами кислорода (Oδ1) боковых радикалов аспарагинов Asn612 субъединиц GluN2B (рис. 2A). Во втором (нижнем) сайте (рис. 2B) азот трициклической группы DES расположен на том же уровне, на котором расположена аминокислота 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 и Thr644; водороды аминокислоты DES образуют водородные связи с атомами кислорода остова аминокислот Asn612 субъединиц GluN2B.

В случае ATL и CLO процедура молекулярного докинга выявила только одно возможное место связывания этих препаратов внутри NMDAR, которое совпадает с верхним сайтом для DES. 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 аминокислоты ATL и CLO образует водородную связь с атомом кислорода (Oδ1) бокового радикала аспарагина Asn612 одной из субъединиц GluN2B. В случае CLO атом хлора взаимодействует с NH₂-группой бокового радикала Asn614 одной из субъединиц GluN1.

Стабильность полученных комплексов была проверена методом молекулярной динамики. Положение молекулы ATL в верхнем сайте остается стабильным на протяжении 100 нс симуляции. Трициклическая группа препарата взаимодействует с аминокислотами Val642 и Thr646 субъединиц

GluN1 и с аминокислотами Leu640 и Thr644 субъединиц GluN2B (рис. 3A). Атом водорода аминокислоты ATL за счет торсионного вращения вокруг связи C–N «переключается» между атомами Oδ1 аминокислотных остатков Asn612 обеих субъединиц GluN2B, поочередно образуя с ними водородные связи.

В верхнем сайте один из атомов водорода аминокислоты DES может образовывать устойчивую водородную связь с атомом Oδ1 боковой цепи Asn612 субъединицы GluN2B (рис. 3B). В то же время второй атом водорода аминокислоты DES взаимодействует с атомами Oδ1 Asn613 (GluN2B) и Asn614 (GluN1) через систему молекул воды (рис. 3B). Атом азота трициклической группы не образует водородных связей ни с окружающими аминокислотами, ни с молекулами воды. Согласно данным МД, комплекс DES с нижним сайтом неустойчив из-за близкого расположения отрицательно заряженного атома азота трициклической группы лиганда и атомов кислорода Oδ1 боковых радикалов Asn612 субъединиц GluN2B (рис. 2B). После 5 нс симуляции молекула DES смещается вверх вдоль оси канала в сторону внеклеточной стороны мембраны и переходит в верхний сайт, описанный выше.

Что касается CLO, то его положение внутри ионной поры NMDAR (рис. 3B) и конформационное поведение сходны с ATL: положение трициклической группы остается стабильным на протяжении всей симуляции, атом водорода аминокислоты «переключается» между атомами Oδ1 аминокислотных остатков Asn612, атом хлора образует устойчивое электростатическое взаимодействие с атомом водорода NH₂-группы бокового радикала Asn614 одной из субъединиц GluN1. Как и в случае DES, атом азота трициклической группы не образует водородных связей ни с окружающими аминокислотами, ни с молекулами воды.

Ранее с помощью электрофизиологических экспериментов было показано, что DES несколько эффективнее взаимодействует с NMDAR по сравнению с CLO и оба эти препарата существенно эффективнее связываются с рецептором по сравнению с ATL [4, 5]. Согласно данным молекулярного моделирования, за счет одновременного взаимодействия двух атомов водорода своей аминокислоты с тремя аминокислотными остатками аспарагина в ионной поре, дезипрамин прочнее связывается с NMDA-рецептором по сравнению с ATL и CLO, что согласуется и объясняет данные экспериментов *in vitro*. Более сильное взаимодействие DES с NMDAR обуславливает и его более сильные побочные эффекты по сравнению с ATL и CLO, что согласуется с известными клиническими наблюдениями [16].

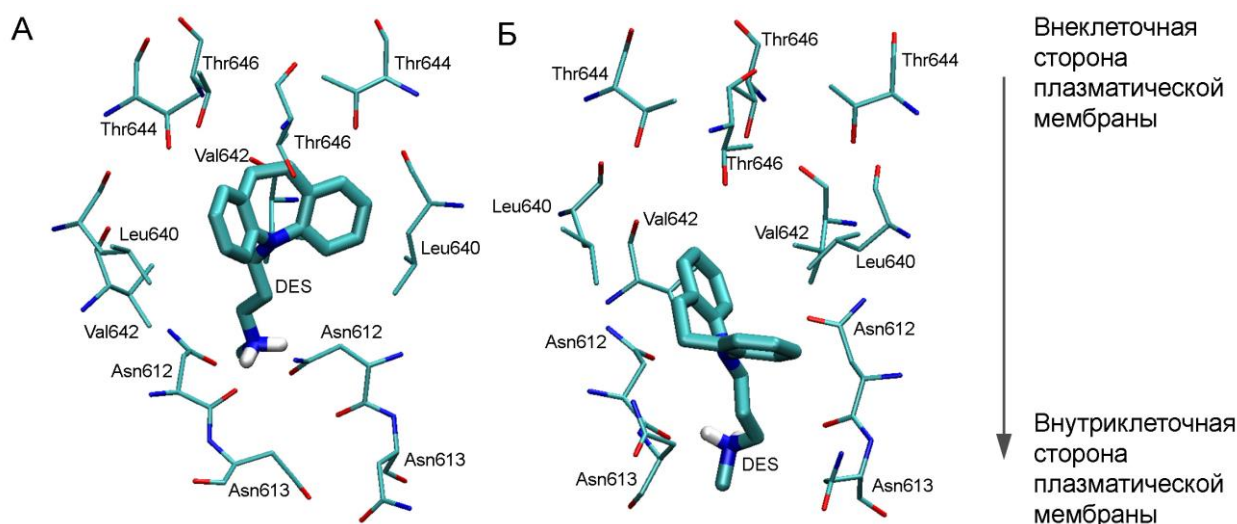


Рис. 2. Возможные сайты связывания молекулы дезипрамина (DES) внутри поры канала NMDA-рецептора по данным молекулярного докинга. Сайт (А) расположен выше по оси канала ближе к внеклеточной стороне плазматической мембраны по сравнению с сайтом (Б).

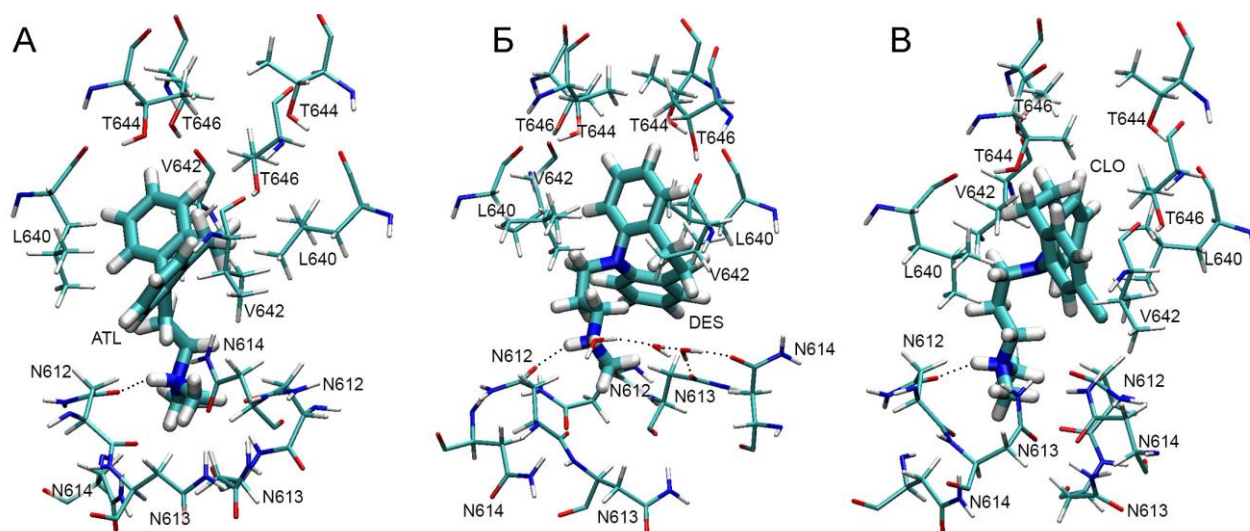


Рис. 3. Взаимодействие ATL (А), DES (Б) и CLO (В) с ключевыми аминокислотами NMDAR и молекулами воды по данным молекулярной динамики; водородные связи показаны точками.

Мы полагаем, что DES и CLO связываются с NMDAR более эффективно по сравнению с ATL за счет наличия в их трициклической группе атома азота. Согласно данным молекулярного моделирования, атом азота трициклической группы не образует каких-либо прочных взаимодействий внутри ионной поры, поэтому, вероятно, он способствует более эффективному взаимодействию DES и CLO с NMDAR на стадии проникновения препаратов внутрь ионной поры. Возможно, из-за отсутствия дополнительной двойной связи в алифатическом фрагменте (рис. 1) и большей конформационной подвижности DES и CLO эффективнее проникают внутрь ионной поры.

Согласно данным молекулярного моделирования, дезипрамин может связываться как верхнем, так и в нижнем сайте (рис. 2А,Б), но связывание с верхним сайтом более прочное. Это не

согласуется с данными электрофизиологических экспериментов, которые свидетельствуют о более глубоком расположении сайта связывания DES внутри ионной поры NMDAR [5]. Возможно, для стабилизации дезипрамина в нижнем сайте необходимо присутствие положительно заряженного катиона натрия в ионной поре рецептора. Дальнейшие вычислительные эксперименты подтвердят или опровергнут это предположение.

4. Благодарности

Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-0152-22-00 и поддержке гранта РФФИ № 20-515-18008. Расчетные эксперименты проводили с использованием вычислительных ресурсов суперкомпьютерного центра Санкт-

5. Список литературы

1. Torta R., Ieraci V., Zizzi F. A Review of the Emotional Aspects of Neuropathic Pain: From Comorbidity to Co-Pathogenesis. *Pain Ther.* 2017. V. 6. P. 11–17. doi: [10.1007/s40122-017-0088-z](https://doi.org/10.1007/s40122-017-0088-z)
2. Belinskaia D.A., Belinskaia M.A., Barygin O.I., Vanchakova N.P., Shestakova N.N. Psychotropic Drugs for the Management of Chronic Pain and Itch. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2019. V. 12. Article No. 99. doi: [10.3390/ph12020099](https://doi.org/10.3390/ph12020099)
3. Obata H. Analgesic Mechanisms of Antidepressants for Neuropathic Pain. *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. Article No. 2483. doi: [10.3390/ijms18112483](https://doi.org/10.3390/ijms18112483)
4. Barygin O.I., Nagaeva E.I., Tikhonov D.B., Belinskaya D.A., Vanchakova N.P., Shestakova N.N. Inhibition of the NMDA and AMPA receptor channels by antidepressants and antipsychotics. *Brain Res.* 2017. V. 1660. P. 58–66. doi: [10.1016/j.brainres.2017.01.028](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.01.028)
5. Stepanenko Y.D., Sibarov D.A., Shestakova N.N., Antonov S.M. Tricyclic Antidepressant Structure-Related Alterations in Calcium-Dependent Inhibition and Open-Channel Block of NMDA Receptors. *Front. Pharmacol.* 2022. V. 12. Article No. 815368. doi: [10.3389/fphar.2021.815368](https://doi.org/10.3389/fphar.2021.815368).
6. Stepanenko Y.D., Boikov S.I., Sibarov D.A., Abushik P.A., Vanchakova N.P., Belinskaia D., Shestakova N.N., Antonov S.M. Dual action of amitriptyline on NMDA receptors: enhancement of Ca-dependent desensitization and trapping channel block. *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. Article No. 19454. doi: [10.1038/s41598-019-56072-z](https://doi.org/10.1038/s41598-019-56072-z)
7. Froimowitz M. HyperChem: a software package for computational chemistry and molecular modeling. *Biotechniques.* 1993. V. 14. P. 1010–1013.
8. Hansen K.B., Yi F., Perszyk R.E., Furukawa H., Wollmuth L.P., Gibb A.J., Traynelis S.F. Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *J. Gen. Physiol.* 2018. V. 150. P. 1081–1105. doi: [10.1085/jgp.201812032](https://doi.org/10.1085/jgp.201812032)
9. Song X., Jensen M.Ø., Jogini V., Stein R.A., Lee C.H., Mchaourab H.S., Shaw D.E., Gouaux E. Mechanism of NMDA receptor channel block by MK-801 and memantine. *Nature.* 2018. V. 556 P. 515–519. doi: [10.1038/s41586-018-0039-9](https://doi.org/10.1038/s41586-018-0039-9)
10. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.* 1996. V. 14. P. 33–38. doi: [10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
11. Phillips J.C., Braun R., Wang W., Gumbart J., Tajkhorshid E., Villa E., Chipot C., Skeel R.D., Kalé L., Schulten K. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* 2005. V. 26. P. 1781–1802. doi: [10.1002/jcc.20289](https://doi.org/10.1002/jcc.20289)
12. 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., Das R. Serverification of molecular modeling applications: the Rosetta Online Server that Includes Everyone (ROSIE). *PLoS One.* 2013. V. 8. Article No. 63906. doi: [10.1371/journal.pone.0063906](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063906)
13. 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., Im W. CHARMM-GUI Membrane Builder toward realistic biological membrane simulations. *J. Comput. Chem.* 2014. V. 35. P. 1997–2004. doi: [10.1002/jcc.23702](https://doi.org/10.1002/jcc.23702)
14. Abraham M. J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J. C. Hess B., Lindahl E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX.* 2015. V. 1–2. P. 19–25. doi: [10.1016/j.softx.2015.06.001](https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001)
15. Huang J., Rauscher S., Nawrocki G., Ran T., Feig M., de Groot B.L., Grubmüller H., MacKerell A.D. Jr. CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nat. Methods.* 2017. V. 14. P. 71–73. doi: [10.1038/nmeth.4067](https://doi.org/10.1038/nmeth.4067)
16. Riediger C., Schuster T., Barlind K., Maier S., Weitz J., Siepmann T. Adverse Effects of Antidepressants for Chronic Pain: A Systematic Review and Meta-analysis. *Front. Neurol.* 2017. V. 8. Article No. 307. doi: [10.3389/fneur.2017.00307](https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00307)