

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈԱԿ

ՄԱՐԳՍՅԱՆ ԱՐՄԵՆ ՄԵՎԱԿԻ

ՄԻՏՈԳԵՆՈՎ ԱԿՏԻՎԱՑՎՈՂ p38 ՊՐՈՏԵԻՆ ԿԻՆԱԶԻ ԵՎ ՊՐՈՏԵԻՆԱԶՆԵՐԻ
ՆՈՐ ՑԱԾՐԱՍՈԼԵԿՈՒԼԱՑԻՆ ԱՐԳԵԼԱԿԻՉՆԵՐԻ ԸՆՏՐՈՒԹՅՈՒՆ ԵՎ
ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆ

Գ.00.14 – «Կենսատեխնոլոգիա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՄԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2014

ИПЦ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА ГНКО

ՏԱՐԳՏՅԱՆ ԱՐՄԵՆ ՏԵՎԱԿՈՎԻՉ

ВЫБОР И ИССЛЕДОВАНИЕ НОВЫХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ
ИНГИБИТОРОВ АКТИВИРОВАННОЙ МИТОГЕНОМ ПРОТЕИН КИНАЗЫ
p38 И ПРОТЕИНАЗ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.14 – «Биотехнология»

ԵՐԵՎԱՆ – 2014

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա»
ԳԱԿ-ում:

Գիտական ղեկավար՝ կ.գ.թ. Ն.Ա. Հովհաննիսյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կ.գ.դ., պրոֆեսոր
Հ.Ռ. Վարդապետյան

կ.գ.թ. Վ.Կ. Գասպարյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային
կենսաբանության ինստիտուտ

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2014 թ. նոյեմբերի 25-ին
ժամը 16⁰⁰ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի
Կենսատեխնոլոգիայի 018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:

Հասցեն՝ 0056, ՀՀ, ք. Երևան, Գյուրջյան փ. 14, հեռ/ֆաքս (374 10) 654180:

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա»
ԳԱԿ-ի գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքված է 2014 թ.-ի հոկտեմբերի 24-ին:

Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կ.գ.թ. Գ.Ե. Ավետիսյան

Тема диссертации утверждена в НППЦ «Армбиотехнология» НАН РА

Научный руководитель: к.б.н. Н.А. Оганеся

Официальные оппоненты: д.б.н., профессор
Г.Р. Вардапетян

к.б.н. В.К. Гаспарян

Ведущая организация: Институт молекулярной биологии НАН РА

Защита диссертации состоится 25 ноября 2014 г. в 16⁰⁰ часов на заседании
специализированного совета 018 Биотехнологии ВАК РА при НППЦ
«Армбиотехнология» НАН РА

Адрес: 0056, РА, г. Ереван, ул. Гюрджана 14, тел/факс (374 10) 654180.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НППЦ «Армбиотехнология»
НАН РА.

Автореферат разослан 24 октября 2014 г.

Ученый секретарь специализированного совета,
к.б.н. Г.Е. Аветисова

ԱՇԽԱՏԱՆՔԻ ԸՆԴՀԱՆՈՒՐ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ

Թեմայի արդիականությունը: Նոր ֆիզիոլոգիական ակտիվ միացությունների որոնումը և ստեղծումը հիմնված է ցածրամոլեկուլային միացությունների սինթեզի և բջջային մակրոմոլեկուլների հետ դրանց փոխազդեցության ուսումնասիրության վրա [Hubbard et al., 2000]: Ցածրամոլեկուլային պատրաստուկների օգտագործման նպատակահարմարությունը կախված է դրանց կողմնակի երևույթներ (հիմունային պատասխան, պերզիկ ռեակցիաներ և այլն) առաջացնելու քիչ հավանականությամբ: Ոչ սպիտակուցային ամինաթթուները և դրանցից կազմված պեպտիդները հանդիսանում են ցածրամոլեկուլային միացություններ, որոնք ի շնորհիվ կառուցվածքային առանձնահատկությունների, օժտված են սպիտակուցների և բջջային այլ մակրոմոլեկուլների հետ փոխազդելու պոտենցիալ ունակությամբ: Ֆիզիոլոգիապես ակտիվ ոչ սպիտակուցային ամինաթթուները և պեպտիդները հաջողությամբ կիրառվում են դեղագործության մեջ նոր դեղապատրաստուկների ստեղծման գործընթացներում [Takita et al., 1972], [Lombardini et al., 1970]; α -տեղակալված α -ամինաթթուներն օժտված են հզոր հակահիպերթենզիվ և հակասեպտիկ ակտիվությամբ, հակաուռուցքային և ռադիոպրոտեկտորային ազդեցությամբ [Tutwiller & Fawthrop, 1983]: Այս տեսակետից ոչ սպիտակուցային բնույթի նոր ամինաթթուների և դրանց ներամամբ սինթեզված պեպտիդների սինթեզն ու հետազոտումն այսօր համարվում է հրատապ խնդիր:

Կարևոր խնդիր է նաև այն օբյեկտների ընտրությունը, որոնց միջոցով իրականացվում է ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների և դրանցից կազմված պեպտիդների կենսաբանական հատկությունների ուսումնասիրությունը: Հայտնի է, որ շատ պարթոլոգիական խախտումներ հանդիսանում են ֆերմենտների կարգավորման մեխանիզմների խանգարումների հետևանք, որոնք տվյալ դեպքում կարող են դիտարկվել որպես դեղապատրաստուկների թիրախներ [Barret, 1985]: Աշխատանքում հետազոտված է ոչ սպիտակուցային նոր ամինաթթուների և դրանցից կազմված պեպտիդների ազդեցությունը բջջում կարևոր ֆունկցիաներ կատարող ֆերմենտների պիրուվատ կինազի, պրոտեին կինազի, կոլագենազի և սերինային պրոտեազների ակտիվության վրա: Նշված ֆերմենտների ակտիվության փոփոխությունը հաճախ բերում է տարբեր հիվանդությունների առաջացման, որի պատճառով նրանք հանդիսանում են թիրախներ դեղապատրաստուկների ստեղծման գործում:

Ներկա ատենախոսական աշխատանքի արդիականությունը և հրատապությունը պայմանավորված է հակաբորբոքային և հակաուռուցքային դեղապատրաստուկների հավանական բաղադրամասեր հանդիսացող ոչ սպիտակուցային նորաստեղծ ամինաթթուների և պեպտիդների հետազոտությամբ, ինչը առայժմ մանրամասնորեն իրականացված չէ: Վերոհիշյալ ուղղության առաջընթացը առավելապես կախված է նոր դեղապատրաստուկների նպատակաուղղված ստեղծման հիմունքների մշակումից:

Ներկայումս հակաուռուցքային դեղամիջոցների մեծամասնությունը օժտված չեն բավականաչափ սպեցիֆիկությամբ և աչքի են ընկնում անցանկալի կողմնակի

ազդեցությունների զգալի շարքով: Բացի այս, ներկայումս օգտագործվող ցիտոստատիկ և ցիտոտոքսիկ միացությունների մեծամասնությունը ապահովում է ցածր արդյունավետություն: Սա անհրաժեշտություն է ստեղծում մշակել նոր, ավելի կատարյալ միջոցներ: Ոչ սպիտակուցային ամինաթթուները բավականին լավ թեկնածու են հակաուռուցքային դեղերի բաղադրիչ դառնալու համար ի շնորհիվ իրենց հատկությունների:

Հետազոտության առարկան և խնդիրը: Բազմաթիվ ֆերմենտներ հանդիսանում են դեղերի թիրախներ: Ակնհայտ է, որ նոր ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների և պեպտիդների, ֆերմենտների ակտիվության վրա ունեցած ազդեցության ուսումնասիրությունը կնպաստի կարգավորման, և ինչու չէ, նաև ազդման մեխանիզմների բացահայտմանը: Հետազոտության համար ընտրվել են ֆերմենտներ, որոնք կարևոր դեր ունեն թջօային տարբեր պաթոլոգիաների ժամանակ:

Օգտագործված են ժամանակակից համակարգչային ծրագրեր, որոնք թույլ են տալիս մոլեկուլային մակարդակով ուսումնասիրել լիզանդինների հետ ֆերմենտների փոխազդեցության հնարավոր տարբերակները և արդյունքում ընտրել ֆերմենտների պոտենցիալ արգելակիչներ:

Սույն աշխատանքում նպատակ է դրվել ուսումնասիրել ոչ սպիտակուցային նոր ամինաթթուների և դրանց ներառմամբ սինթեզված պեպտիդների մետաբոլիկ ակտիվությունները: Նպատակին հասնելու համար առաջադրվել են հետևյալ խնդիրները.

- համակարգչային մոդելավորմամբ ուսումնասիրել և հայտնաբերել ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների և դրանց ներառմամբ սինթեզված պեպտիդների հնարավոր ազդեցությունը տրիպսինի, պրոտեինազ K-ի, կոլագենազի, պիրուվատ կինազի, միտոզենոլ ակտիվացվող պրոտեին կինազ p38-ի ակտիվության վրա
- փորձարարական եղանակներով ուսումնասիրել ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների և դրանց ներառմամբ սինթեզված պեպտիդների ազդեցությունը տրիպսինի, պրոտեինազ K-ի, կոլագենազի, պիրուվատ կինազի, միտոզենոլ ակտիվացվող պրոտեին կինազ p38-ի ակտիվության վրա
- ուսումնասիրել ֆերմենտների ակտիվության վրա ազդեցություն ունեցած ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների և դրանց ներառմամբ սինթեզված պեպտիդների ազդեցության մեխանիզմը և արգելակիչների դեպքում հայտնաբերել IC₅₀-ը
- ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների և դրանց ներառմամբ սինթեզված պեպտիդների մուտագեն և հակամուտագեն հատկությունների բացահայտում:

Աշխատանքի գիտական նորությունը: Աշխատանքում առաջին անգամ հետազոտվել են նոր սինթեզված ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների և դրանց ներառմամբ սինթեզված պեպտիդների ազդեցությունը տրիպսինի, պրոտեինազ K-ի, կոլագենազի, պիրուվատ կինազի, միտոզենոլ ակտիվացվող պրոտեին կինազ p38-ի ակտիվության վրա:

Բացահայտվել են հետազոտվող միացությունների հետևյալ հասկոությունները

- պրոտեինազ K-ի նոր արգելակիչներ՝ (S)-β-[4-(ֆուրան-2-իլմեթիլ)-3-բութիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը, ալանիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-4'-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը IC₅₀=0,21մմոլ/լ և N-ֆորմիլ-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-4'-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը IC₅₀=0,29մմոլ/լ
- կոլագենազի նոր արգելակիչ՝ ալանիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-3'-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը IC₅₀=0,28մմոլ/լ
- պիրուվատ կինազի նոր խթանիչ՝ N-ֆորմիլ-մեթիոնիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-պրոպիլ-3-բութիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը 0,625 մմոլ/լ կոնցենտրացիայի դեպքում ակտիվացրել է 209,71%-ով
- միտոգենով ակտիվացվող պրոտեին կինազ p38-ի նոր արգելակիչներ՝ (S)-β-[4-ալիլ-3-(2'-քլորֆենիլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը, (S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-3'-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը և (S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-4'-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը որոնք 2,5 մմոլ/լ կոնցենտրացիայի դեպքում արգելակել են պրոտեին կինազ p38-ի ակտիվությունը համապատասխանաբար 85,2%, 88,2%, 94%-ով
- մուտագեն հասկոություններով օժտված է եղել N-ֆորմիլ-մեթիոնիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը
- հակամուտագեն հասկոություններով օժտված են եղել՝ (S)-մեթոքսի-5-նիտրոֆենիլալանինը և (S)-β-[4-ալիլ-3-(3'-հիդրօքսիպրոպիլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը

Աշխատանքի կիրառական նշանակությունը: Ոչ սպիտակուցային ամինաթթուները լայնորեն օգտագործվում են դեղագործության մեջ: Իրականացված հետազոտությունների արդյունքները ցույց տվեցին, որ որոշ ոչ սպիտակուցային ամինաթթուներ և դրանց ներառմամբ սինթեզված պեպտիդներ օժտված են կենսական նշանակություն ունեցող մի շարք ֆերմենտների ակտիվությունը կարգավորելու ընդունակությամբ: Աշխատանքում բացահայտված ֆերմենտների նոր արգելակիչները և խթանիչները կարող են իրենց ուրույն տեղը գրավել դեղագործության բնագավառում օգտագործվող իրենց նմանակների շարքում և օգտագործվել նոր դեղերի ստեղծման ժամանակ:

Կոլագենազի արգելակիչ ալանիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-3'-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը կարող է օգտագործվել ուռուցքաբանության մեջ, մետաստազների տարածումը ճնշող դեղերի կազմում օգտագործվելով: Որպես հակաուռուցքային պրեպարատ կարող է օգտագործվել նաև պիրուվատ կինազի խթանիչ N-ֆորմիլ-մեթիոնիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-պրոպիլ-3-բութիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը, սակայն ի տարբերություն նախորդի, որպես ուռուցքազոյացման նախնական փուլի կանխարգելիչ:

Միտոգենով ակտիվացվող պրոտեին կինազ p38-ի արգելակիչներ (S)-β-[4-ալիլ-3-(2'-քլորֆենիլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը, (S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-3'-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը և (S)-β-[4-ալիլ-3-

(պիրիդին-4'-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանինը նույնպես կարող են կիրառություն գտնել դեղագործության բնագավառում՝ հանդիսանալով, օրինակ, հակաբորբոքային դեղերի բաղադրամաս:

Պաշտպանության ներկայացվող դրույթները:

- ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների և դրանց ներառմամբ սինթեզված պեպտիդների փոխազդեցությունը տրիպսինի, պրոտեինազ K-ի, կոլագենազի, պիրուվատ կինազի, միտոզենոլ ակտիվացվող պրոտեին կինազ p38-ի հետ հիմնված համակարգչային մոդելավորման արդյունքների վրա
- ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների և դրանց ներառմամբ սինթեզված պեպտիդների ազդեցությունը տրիպսինի, պրոտեինազ K-ի, կոլագենազի, պիրուվատ կինազի, միտոզենոլ ակտիվացվող պրոտեին կինազ p38-ի ակտիվության վրա
- ֆերմենտների ակտիվության վրա ազդեցություն ունեցած ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների և դրանց ներառմամբ սինթեզված պեպտիդների ազդեցության մեխանիզմները և արգելակիչների դեպքում IC₅₀-ը
- ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների և դրանց ներառմամբ սինթեզված պեպտիդների մուտագեն և հակամուտագեն հատկությունները

Աշխատանքի կապը գիտական ծրագրերի և թեմաների հետ: Աշխատանքն իրականացվել է հետազոտության արդյունքները ներկայացվել են ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի 2011-2013 թթ. «Ֆիզիոլոգիապես ակտիվ նոր ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների և պեպտիդների ազդեցությունը սպոնտան և ինդուկցված մուտագենեզի վրա» թեմատիկ ծրագրի և միջազգային գիտատեխնիկական կենտրոնի A-1677 “The synthesis of potential biologically active heterocycle substituted α -amino acids and peptides. Investigation of their antibacterial, antiviral and antitumor properties” դրամաշնորհի շրջանակներում:

Հեղինակի անձնական ներդրումը: Հեղինակի անձնական ներդրումը ներառում է ձևակերպված խնդիրների փորձնական իրականացումը, աշխատանքի հետ առնչվող գիտական գրականության վերլուծությունը և ընդհանրացումը, տպագրված գիտական հոդվածների և ատենախոսության ձևակերպումը, արդյունքների քննարկումը և ամփոփումը: Խնդրի հիմնական դրվածքը և մեթոդների մշակումն իրականացվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի Մետաբոլիզմի ինժեներիայի լաբորատորիայի վարիչ, կ.գ.թ. Ն.Ա. Հովհաննիսյանի ղեկավարությամբ: Աշխատանքի որոշ բաժիններ քննարկվել, մշակվել և իրագործվել են ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի Մոլեկուլային կենսաբանության լաբորատորիայի վարիչ, կ.գ.թ. Ա.Ա. Համբարձումյանի հետ համատեղ:

Աշխատանքի քննարկումը և հրատարակությունները: Ատենախոսության նյութը շարադրված է 3 գիտական հոդվածների և 1 թեզիսի տեսքով, իսկ դրա առանձին արդյունքները զեկույցի ձևով ներկայացվել են “Modern state of biotechnological developments and ways of commercialization” միջազգային գիտաժողովում (ՀՀ ք. Երևան 2012) և ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի գիտական խորհրդի նիստերում:

Աշխատանքի կատարման վայրը: Աշխատանքը իրականացվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի Մետաբոլիզմի ինժինեռիայի և Մոլեկուլային կենսաբանության լաբորատորիաներում:

Աշխատանքի ծավալը և կառուցվածքը: Ատենախոսությունը կազմված է ներածությունից, 3 գլուխներից, ամփոփումից, եզրակացություններից և գրականության ցանկից: Աշխատանքը շարադրված է 108 էջի վրա, ներառում է 22 նկար և 13 աղյուսակ: Գրականության ցանկը ներառում է 137 գիտական տպագիր հոդվածներ և մենագրություններ:

ԱՇԽԱՏԱՆՔԻ ՀԱՄԱՌՈՏ ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆԸ

ԳԼՈՒԽ 1. Գրական ակնարկ

Գրական ակնարկը նվիրված է գրականության ամփոփմանը և ներառում է ֆերմենտների բնութագրումը, նրանց կարևորության ներկայացումը, ակտիվության կարգավորման կարևորությունը, դրանց՝ որպես թիրախ օգտագործման շնորհիվ նվաճված հաջողությունները: Մանրամասնորեն նկարագրված են սերինային պրոտեազները՝ պրոտեինազ K-ի և տրիպսինի, մատրիքսային մետալոպրոտեազները՝ կոլագենազի, կինազները՝ պիրուվատ կինազի և միտոգենոլ ակտիվացվող պրոտեին կինազ p38-ի (MAPK14) օրինակներով: Ներկայացված են կառուցվածքային և ֆունկցիոնալ առանձնահատկությունները, առկա և հնարավոր կիրառությունները, ինչպես նաև վերջիններիս ակտիվության կարգավորման արդեն առկա մեխանիզմները: Անդրադարձ է կատարվել նաև մուտագենեզի երևույթին, որպես միացությունների՝ հատկապես դեղաբանական նշանակության, կարևորագույն հատկություններից մեկի:

ԳԼՈՒԽ 2. Հետազոտության նյութեր և մեթոդներ

Հետազոտված միացությունները: Փորձարկման են ենթարկվել ԵՊՀ-ում և ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում սինթեզված 64 ոչ սպիտակուցային ամինաթթու և պեպտիդ:

Պրոտեինազ K-ի ակտիվության որոշումը: Իրականացվել է ըստ ազատ ամինո խմբերի քանակի, օրտոֆտալալդեհիդի մեթոդով [Gade & Brown, 1981]: Հետազոտվող նյութերի կոնցենտրացիան եղել է 5մմոլ/լ, իսկ դժվարալուծներինը՝ 2մմոլ/լ:

Տրիպսինի ակտիվության որոշումը: Իրականացվել է ինչպես պրոտեինազ K-ի դեպքում:

Կոլագենազի ակտիվության որոշումը ազարոզային հելում: Ֆիրին, ժելատին կամ կազեին պարունակող 0,6%-անոց ազարոզային հելի վրա կաթեցվել է ֆերմենտը և ժամանակային ինտերվալներով չափվել գոյացած թափանցիկ տիրույթի տրամագիծը:

Կոլագենազի ակտիվության որոշումը սպեկտրոֆոտոմետրիկ եղանակով: Իրականացվել է ըստ ազատ ամինո խմբերի քանակի: Որպես սուբստրատ օգտագործվել է ժելատինը:

Պիրուվատ կինազի ակտիվության որոշումը: Իրականացվել է ըստ Worthington™-ի մշակած մեթոդիկայի, հիմնված NADH-ի օքսիդացման սպեկտրոֆոտոմետրիկ գրանցման վրա: Օգտագործվել է ճագարի (*Oryctolagus cuniculus*) մկանից անջատված պիրուվատ կինազը:

Միտոզենոլ ակտիվացվող պրոտեին կինազ p38-ի (MAPK14) ակտիվության որոշումը: Իրականացվել է համաձայն Sigma-Aldrich կազմակերպության առաջարկած մեթոդի:

Համակարգչային մոդելավորում: Կատարվել է AutoDock 4.0, AutoDock Vina [Trott & Olson, 2010] և AutoGrid ծրագրերի օգնությամբ:

Մուտագենեզ: Իրականացվել է համաձայն ստանդարտ մեթոդի N-մեթիլ-N'-միտրո-N-նիտրոգոուանիդինոլ [Foster, 1991]: Օգտագործվել է *Corynebacterium flavum* E531 (met-, thr-, aecr-) շտամը:

ԳԼՈՒԽ 3. Արդյունքներ և քննարկում

3.1.1. Ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների և դրանց հիման վրա սինթեզված պեպտիդների տրիպսինի և պրոտեինազ K-ի ակտիվության վրա հնարավոր ազդեցության հայտնաբերումը համակարգչային մոդելավորմամբ

Ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների և դրանց ներառմամբ սինթեզված պեպտիդների հնարավոր ազդեցության հետազոտումը պրոտեինազ K-ի և տրիպսինի ակտիվության վրա կատարվել է համակարգչային մոդելավորման ծրագրերի դոքինգի միջոցով:

Միացությունները, որոնք ունակ են առաջացնել կոմպլեքսներ հետազոտվող ֆերմենտների հետ, ընտրվել են կապման ազատ էներգիայի հիման վրա (ΔG): ΔG բացասական արժեքը վկայում է կոմպլեքսի առաջացման մասին: Հաշվարկվել է նաև արգելակման հաստատունի (K_i) արժեքը: Ստացված արդյունքների համաձայն հետազոտված միացություններից ոչ մեկը չի փոխազդել պրոտեինազ K-ի հետ, իսկ տրիպսինի հետ միացություններից որոշների մոտ արձանագրվել է բավականին ցածր արգելակման հաստատուն (S)- β -[4-ալիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանին $K_i=0,09$ մկմոլ/լ, (S)- β -[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանին $K_i=0,02$ մկմոլ/լ, N-ֆորմիլ-մեթիոնիլ-(S)- β -[4-(ֆուրան-2-իլմեթիլ)-3-բուրիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանին $K_i=0,80$ մկմոլ/լ:

3.1.2. Ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների և դրանց հիման վրա սինթեզված պեպտիդների տրիպսինի և պրոտեինազ K-ի ակտիվության վրա ազդեցության ուսումնասիրումը փորձարարական եղանակով

Տրիպսինի և պրոտեինազ K-ի ակտիվությունները որոշվել են նկարագրված մեթոդիկայով: Ստացված արդյունքների համաձայն հետազոտված 28 միացություններից 13-ը ընդունակ են եղել փոփոխել պրոտեինազ K-ի ակտիվությունը (աղյուսակ 1) և 8 միացություն ազդել է տրիպսինի ակտիվության վրա (աղյուսակ 2)

Պրոտեինազ K-ի ակտիվության վրա ազդող միացություններ

Միացություն	Կոնցենտրացիա (մմոլ/լ)	Ակտիվություն (% ստուգիչից)
(S)-β-[4-ալիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	5	68
(S)-β-[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	5	57,6
(S)-β-[4-ալիլ-3-բենզիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	5	40
(S)-β-[4-ալիլ-3-(ֆուրան-2-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	5	55,4
(S)-β-[4-(ֆուրան-2-իլմեթիլ)-3-բութիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	5	33,8
(S)-β-[4-ալիլ-3-բութիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	5	130,6
(S)-β-[4-պրոպիլ-3-բութիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	5	135
(S)-β-[4-պրոպիլ-3-իզոբութիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	5	135
(S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-3'-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	5	155,3
N-ֆորմիլ-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	5	68,5
N-ֆորմիլ-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-4'-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	5	20
N-ֆորմիլ-մեթիոնիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-պրոպիլ-3-բութիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	2	66
Ալանիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-4'-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	5	19,2

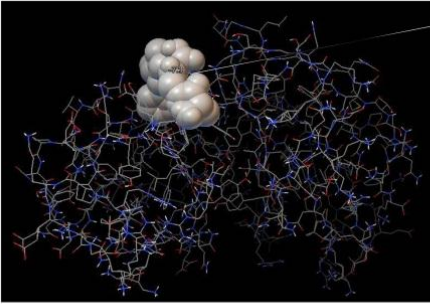
Առավել մեծ ազդեցություն ունեցած և հետաքրքրություն ներկայացնող միացությունների՝ N-ֆորմիլ-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-4'-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինի և ալանիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-4'-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինի համար որոշվել է նաև IC₅₀-ը, որը կազմել է համատասախանաբար 0,29մմոլ/լ և 0,21մմոլ/լ:

Տրիպսինի ակտիվության վրա ազդող միացություններ

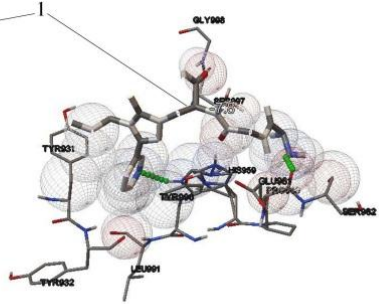
Միացություն	Կոնցենտրացիա (մմոլ/լ)	Ակտիվություն (% ստուգիչից)
(S)-β-[4-ալիլ-3-(ֆուրան-2-իլ)-5-թիոքսոն-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	5	146,9
(S)-β-[4-(ֆուրան-2-իլմեթիլ)-3-բութիլ-5-թիոքսոն-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	5	140,8
(S)-β-[4-ալիլ-3-բութիլ-5-թիոքսոն-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	5	143,8
(S)-β-[4-պրոպիլ-3-իզոբութիլ-5-թիոքսոն-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	5	138,8
(S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-3'-իլ)-5-թիոքսոն-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	5	145,6
N-ֆորմիլ-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-պրոպիլ-5-թիոքսոն-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	5	64,9
N-ֆորմիլ-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-(ֆուրան-2-իլմեթիլ)-3-բութիլ-5-թիոքսոն-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	5	67,6
N-ֆորմիլ-մեթիոնիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-(ֆուրան-2-իլմեթիլ)-3-բութիլ-5-թիոքսոն-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	2	179,2

3.1.3. Ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների և դրանց հիման վրա սինթեզված պեպտիդների կոլագենազի ակտիվության վրա հնարավոր ազդեցության հայտնաբերումը համակարգչային մոդելավորմամբ

Ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների և դրանց ներառմամբ սինթեզված պեպտիդների հնարավոր ազդեցության հետազոտումը կոլագենազի ակտիվության վրա կատարվել է ինչպես տրիպսինի և պրոտեինազ K-ի դեպքում: Որպես մակրոմոլեկուլ օգտագործվել են Cl. Histoliticum-ի A,B շղթաները ներառող դոմենը՝ Ca-ի իոնների հետ կապակցված և առանց կապակցման: Հետազոտման է ենթարկվել թվով 37 միացություն, որից 16-ը հետերոցիկլային տեղակալված ամինաթթու, 10-ը դրանց հիմքի վրա կառուցված պեպտիդ և 11 ալիֆատիկ ամինաթթու: Մոդելավորման արդյունքում բոլոր միացություններն էլ խնամակցություն են ցուցաբերել կոլագենազի նկատմամբ: Ամենափոքր արգելակման հաստատուն ունեցել են հետերոցիկլային տեղակալված ամինաթթու պարունակող պեպտիդները: Ամենաուժգին փոխազդեցություն ցուցաբերել են ալանիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-4'-իլ)-5-թիոքսոն-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը, ալանիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-3'-իլ)-5-թիոքսոն-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը (նկար 1) և N-ֆորմիլ-մեթիոնիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-3'-իլ)-5-թիոքսոն-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը, որոնց բոլորի արգելակման հաստատունը եղել է 0,00192 մմոլ/լ:



ա



բ

Նկար 1. Ալանիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-3'-իլ)-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինի, կոլագենազի հետ կոմպլեքսի եռաչափ կառուցվածքը

3.1.4. Ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների և դրանց հիման վրա սինթեզված պեպտիդների կոլագենազի ակտիվության վրա ազդեցության ուսումնասիրումը փորձարարական եղանակով

Ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների և դրանց ներառմամբ սինթեզված պեպտիդների ազդեցությունը կոլագենազի ակտիվության վրա ուսումնասիրվել է ֆիբրին, ժելատին կամ կազեին պարունակող 0,6%-անոց ազարոզային հելի միջոցով ընտրությամբ: Նախնական ընտրությունից հետո ազդեցություն ցուցաբերած միացությունները ավելի մանրամասն հետազոտվել են սպեկտրոֆոտոմետրիկ եղանակով: Հետազոտված 40 միացություններից 11-ը ազդել են կոլագենազի ակտիվության վրա (աղյուսակ 3):

Աղյուսակ 3

Կոլագենազի ակտիվության վրա ազդող միացություններ

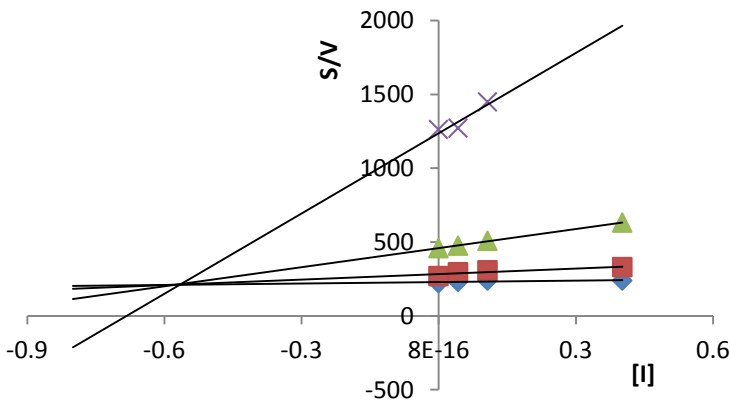
<i>Միացություն</i>	<i>Կոնցենտրացիա, մՄ</i>	<i>Արգելակում, %</i>
(S)-β-[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	12,5	40
(S)-β-[4-ալիլ-3-(ֆուրան-2-իլ)-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	10	30
(S)-β-[4-ալիլ-3-(2'-քլորֆենիլ)-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	25	30
(S)-β-[4-ալիլ-3-բութիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	5	30
(S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-4'-իլ)-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	12,5	40
(S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-3'-իլ)-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	12,5	30

աղյուսակ 3-ի շարունակություն

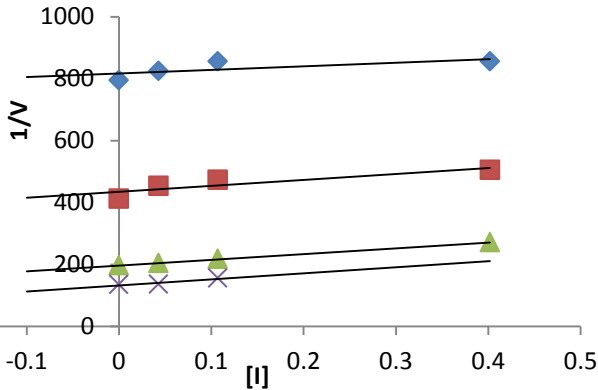
Ալանիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-4'-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	110	50
Ալանիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-3'-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	66	70
Ալանիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-4'-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	11,5	50
N-ֆորմիլ-մեթիոնիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-4'-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	47,9	30
Ալանիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-3'-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	11,1	70

Լավագույն ազդեցություն ցուցաբերած միացության՝ ալանիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-3'-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինի համար կատարվել է արգելակման մեխանիզմի ուսումնասիրություն: Այս նպատակով իրականացվել է սուբստրատի և վերոհիշյալ միացության տարբեր կոնցենտրացիաների պայմաններում ռեակցիայի արագության չափում: Արգելակման կինետիկայի անալիզի ժամանակ կազմվել են ռեակցիայի արագության հակադարձ մեծության (1/V) և սուբստրատ-արագություն հարաբերության (S/V) ազդանյութի կոնցենտրացիայից կախվածության կորերը (Morris, 1998): Արդյունքները ներկայացված են (նկար 2 և 3)

Գրաֆիկական անալիզի տվյալները ցույց են տվել, որ արգելակումը ոչ մրցակցային սկզբունքի է՝ $K_m=2,136\pm 0,254$ $K_i=0,856\pm 0,2326$:



Նկար 2. Կոլագենազի համար S/V կախվածությունը ալանիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-3'-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինի կոնցենտրացիայից



Նկար 3. Կոլագենազի համար $1/V$ կախվածությունը ալանիլ-գլիցիլ-(S)- β -[4-ալիլ-3-(պիրիդին-3'-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանինի կոնցենտրացիայից

3.2.1. Ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների և դրանց հիման վրա սինթեզված պեպտիդների պիրուվատ կինազի ակտիվության վրա հնարավոր ազդեցության հայտնաբերումը համակարգչային մոդելավորմամբ

Ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների և դրանց ներառմամբ սինթեզված պեպտիդների, պիրուվատ կինազի հետ հնարավոր փոխազդեցության հայտնաբերման նպատակով որպես մոդել ընտրվել են PKM1-ը և PKM2-ը: Սրանք պիրուվատ կինազի չորս իզոմերներից երկուսն են և հանդիսանում են pkm գենի պրոդուկտ: Դրանց էքսպրեսիան այս կամ այն բջջում պայմանավորված է սվիլայսինգի տարբերությամբ: Հետազոտման է ենթարկվել 29 միացություն, որից 14-ը հետերոցիկլային տեղակալված ամինաթթու, 4-ը դրանց ներառմամբ կառուցված պեպտիդ և 11 պլիֆատիկ ամինաթթու: Մոդելավորման արդյունքում բոլոր միացություններն էլ խնամակցություն են ցուցաբերել պիրուվատ կինազի թե՛ PKM1, և թե՛ PKM2 իզոմերի նկատմամբ: Որպես կանոն մինևույն միացության դեպքում PKM2 իզոմերի հետ փոխազդեցության արգելակման հաստատունը ավելի փոքր է եղել, քան PKM1-ի դեպքում: Մոդելավորման ենթարկված միացություններից ամենաբարձր կապման ազատ էներգիայի ցուցանիշ ունեցել է (S)- β -[4-ալիլ-3-բենզիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանինը: PKM2-ի հետ փոխազդման դեպքում գրանցվել է 0,00116 մոլ/լ արգելակման հաստատուն: Մինևույն ժամանակ PKM1-ի հետ փոխազդման պայմաններում արգելակման հաստատունը եղել է մոտ մեկ կարգ բարձր:

3.2.2. Ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների և նրանց հիման վրա սինթեզված պեպտիդների պիրուվատ կինազի ակտիվության վրա ազդեցության ուսումնասիրումը փորձարարական եղանակով

Ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների և պեպտիդների՝ պիրուվատ կինազի ակտիվության վրա ունեցած ազդեցության ուսումնասիրման համար

կատարվել է հետազոտություն՝ համաձայն մեթոդիկայի: Հետազոտության է ենթարկվել 29 միացություն, որոնցից 3-ը ազդել են պիրովատ կինազի ակտիվության վրա՝ ցուցաբերելով ակնհայտ ակտիվացման հատկություն (աղյուսակ 4):

Աղյուսակ 4

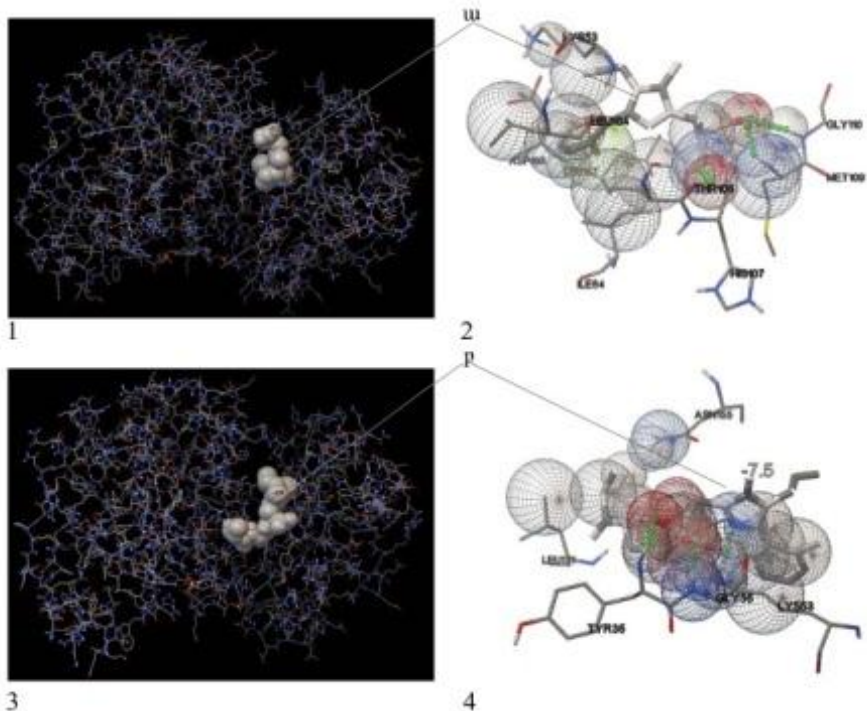
Պիրովատ կինազի ակտիվության վրա ազդող միացություններ

Միացություն	Կոնցենտրացիա (մմոլ/լ)	Ակտիվություն (% ստուգիչից)
(S)-β-[4-ալիլ-3-բութիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	0,625	130,1
(R)-օ-մեթիլսերին	0,6061	140,87
N-ֆորմիլ-մեթիոնիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-պրոպիլ-3-բութիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	0,625	209,71

N-ֆորմիլ-մեթիոնիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-պրոպիլ-3-բութիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը ցուցաբերել է լավագույն ակտիվացման հատկությունները հետազոտված միացություններից, սակայն N-ֆորմիլ-մեթիոնիլ-գլիցիլ խմբի փոխարինման դեպքում նման ազդեցությունը բացակայել է, իսկ բացակայության դեպքում արտահայտվել է շատ թույլ: (S)-β-[4-ալիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը, որը աղյուսակ 4-ում բերված միացությունից տարբերվում է 3-րդ դիրքում պրոպիլ խմբի առկայությամբ բութիլի փոխարեն էական ազդեցություն չի ցուցաբերել: Ուսումնասիրվել է նաև հետազոտվող միացությունների ազդեցության կախվածությունը կոնցենտրացիայից:

3.2.3. Ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների և դրանց հիման վրա սինթեզված պեպտիդների միտոզենոլ ակտիվացվող պրոտեին կինազ p38-ի (MAPK14) ակտիվության վրա հնարավոր ազդեցության հայտնաբերումը համակարգչային մոդելավորմամբ

Ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների և դրանց ներառմամբ սինթեզված պեպտիդների հնարավոր ազդեցության հետազոտումը միտոզենոլ ակտիվացվող պրոտեին կինազ p38-ի ակտիվության վրա կատարվել է ինչպես նախորդ դեպքերում: Որպես մակրոմոլեկուլ օգտագործվել են մարդու միտոզենոլ ակտիվացվող պրոտեին կինազ p38-ի և մկան նույն կինազի ֆոսֆորիլացված կառուցվածքները: Հետազոտման են ենթարկվել 26 միացություն, որոնցից 15-ը հետերոցիկլային տեղակալված ամինաթթուներ և 11-ը դրանց ներառմամբ կառուցված պեպտիդներ: Մոդելավորման արդյունքում բոլոր միացություններն էլ խնամակցություն են ցուցաբերել պրոտեին կինազ p38-ի նկատմամբ: Ալանիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(2'-քլորֆենիլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը ունեցել է ամենացածր արգելակման հաստատունի արժեքը $K_i=0,00318$ մմոլ/լ: Ոչ պեպտիդի կազմում միևնույն միացությունը նույնպես ցուցաբերել է բավականին ցածր արգելակման հաստատունի արժեք (նկար 4):



Նկար 4. Ալանիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(2'-քլորֆենիլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինի և (S)-β-[4-ալիլ-3-(2'-քլորֆենիլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինի, MAPK14-ի հետ կոմպլեքսի եռաչափ կառուցվածքը

Բացի վերոհիշյալից, բավականին ուժեղ փոխազդեցություն է նկատվել նաև ալանիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-4'-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինի հետ, իսկ ոչ պեպտիդի կազմում նա ցուցաբերել է փոքր ինչ ավելի ցածր, սակայն այնուամենայնիվ բավականին ուժեղ փոխազդեցություն: (S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-3'-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը, որը տարբերվում է նախորդ քննարկվածից միայն պիրիդին ածանցյալում ազոտի դիրքով, նույնպես ցուցաբերել է բավականին մեծ խնամակցություն MAPK14-ի հետ:

3.2.4. Ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների և նրանց հիման վրա սինթեզված պեպտիդների միտոզենոլ ակտիվացվող պրոտեին կինազ p38-ի (MAPK14) ակտիվության վրա ազդեցության ուսումնասիրումը փորձարարական եղանակով

Փորձարարական եղանակով միտոզենոլ ակտիվացվող պրոտեին կինազ p38-ի ակտիվությունը որոշվել է համաձայն մեթոդիկայի: Հետազոտված միացություններից 5-ը ցուցաբերել են տարբեր մակարդակի արգելակման հատկություններ, իսկ արտահայտված ակտիվացման հատկություններ չեն գրանցվել: Արդյունքները բերված են աղյուսակ 5-ում:

MAPK14-ի ակտիվության վրա ազդող միացություններ

Միացություն	Կոնցենտրացիա (մմոլ/լ)	Ակտիվություն (% ստուգիչից)
(S)-β-[4-ալիլ-3-(2'-քլորֆենիլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	2,5	14,8
(S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-4'-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	2,5	6
(S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-3'-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	2,5	11,8
Ալանիլ-(S)-β-[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	2,5	34,9
Ալանիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(2'-քլորֆենիլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	2,5	46,8

(S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-4'-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը հանդիսացել է ամենաուժեղ արգելակիչը: Մինևույն ժամանակ պեպտիդների կազմում այն էական ազդեցություն չի ցուցաբերել: (S)-β-[4-ալիլ-3-(2'-քլորֆենիլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը արգելակելով պրոտեին կինազ p38-ի ակտիվությունը 85,2%-ով, ալանիլ-գլիցիլ տրիպեպտիդի կազմում ցուցաբերել է ավելի ցածր արգելակման հատկություն՝ 53,2%:

3.3. Ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների և դրանց ներառմամբ սինթեզված պեպտիդների մուտագեն հատկությունների ուսումնասիրությունը:

Ուսումնասիրվել է սպոնտան և ՆԳ ինդուկցված մուտագենների վրա ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների և դրանց ներառմամբ սինթեզված պեպտիդների ազդեցությունը:

Համաձայն ստացված արդյունքների, հետազոտված հետերոցիկլային տեղակալված ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների շարքում մուտագեններ չեն հայտնաբերվել, սակայն որոշ միացություններ՝ (S)-β-[4-ալիլ-3-(3'-հիդրօքսիպրոպիլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին և (S)-մեթօքսի-5-նիտրոֆենիլալանին, նվազեցրել են ՆԳ ինդուկցված մուտագենների հաճախականությունը՝ ցուցաբերելով հակամուտագենային հատկություններ:

Մուտագեն հատկություններ է ցուցաբերել N-ֆորմիլ-մեթիոնիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին տրիպեպտիդը: Այս տրիպեպտիդի ավելացումը թեստ կուլտուրայի բջիջներին բարձրացնում է սպոնտան ռեվերսիաների հաճախականությունը մոտ երեք կարգով, սակայն ՆԳ ինդուկցված ռեվերսիաների վրա ազդեցություն չի թողնում: Հետաքրքիր է այն փաստը, որ ոչ (S)-β-[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը, ոչ էլ N-ֆորմիլ-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-

α-ալանին դիպեպտիդը սպոնտան և ինդուկցված մուտագենեզի հաճախականության վրա ազդեցություն չեն ունեցել: Ազդեցություն չեն ցուցաբերել նաև N-ֆորմիլ-մեթիոնիլ-ալանիլ-(S)-β-[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը, N-ֆորմիլ-մեթիոնիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-(ֆուրան-2-իլմեթիլ)-3-բութիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը և (S)-β-[4-ալիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը: Ստացված արդյունքները հիմք են ստեղծում ենթադրելու, որ N-ֆորմիլ-մեթիոնիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին տրիպեպտիդի մուտագեն հատկությունները առավել մեծ հավանականությամբ պայմանավորված են հենց տրիպեպտիդի կառուցվածքային առանձնահատկություններով, այլ ոչ նրա կազմում եղած ամինաթթուներով:

Եզրակացություններ

1. Ալանիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-4'-իլ)-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը և N-ֆորմիլ-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-4'-իլ)-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը հանդիսացել են պրոտեինազ K-ի նոր արգելակիչներ 0,21 մմոլ/լ և 0,29 մմոլ/լ IC₅₀-ով համապատասխանաբար
2. Ալանիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-3'-իլ)-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը հանդիսացել է կոլագենազի ոչ մրցակցային արգելակիչ 0,28 մմոլ/լ IC₅₀-ով և 0,856 մմոլ/լ արգելակման հաստատունով
3. N-ֆորմիլ-մեթիոնիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-պրոպիլ-3-բութիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը 0,625 մմոլ/լ կոնցենտրացիայի դեպքում ակտիվացրել է պիրուվատ կինազ 209,71%-ով
4. (S)-β-[4-ալիլ-3-(2'-քլորֆենիլ)-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը, (S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-3'-իլ)-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը և (S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-4'-իլ)-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը հանդիսացել են միտոգենով ակտիվացվող պրոտեին կինազ p38-ի նոր արգելակիչներ որոնք 2,5 մմոլ/լ կոնցենտրացիայի դեպքում արգելակել են պրոտեին կինազ p38-ի ակտիվությունը համապատասխանաբար 85,2%, 88,2%, 94%-ով
5. Հակամուտագեն հատկություններով օժտված են եղել՝ (S)-մեթոքսի-5-նիտրոֆենիլալանինը և (S)-β-[4-ալիլ-3-(3'-հիդրօքսիպրոպիլ)-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը, իսկ մուտագեն հատկություններով՝ N-ֆորմիլ-մեթիոնիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը

Ատենախոսության թեմայով հրատարակված աշխատանքների ցուցակ

1. **Sargsyan A.S.**, Hovhannisyanyan N.A., Hambardzwumyan A.A. The effect of Triazole-Containing Nonprotein Amino Acids on Activity of Pyruvate Kinase. // Book of abstracts of Scientific Seminar “Modern state of biotechnological developments and ways of commercialization”, September 11-12, **2012**, Yerevan, Armenia, p. 26

2. **Sargsyan A.S.** Non-protein Amino Acids and Peptides as Potential Inhibitors of MAPK Kinase p38. // Book of articles and abstracts of 2nd International Scientific Conference of Young Researchers “Contribution of young generation in the development of biotechnology”, October 1-4, **2013**, Yerevan, Armenia, p. 106-108
3. Дангян В.Т., **Саргсян А.С.**, Саргсян Т.О., Джамгарян С.М., Гюлумян Э.А., Оганесян Н.А., Паносян Г.А., Дангян Ю.М., Сагиян А.С. Синтез пептидов, содержащих β-гетероциклически замещенные производные (S)-аланина, и изучение их влияния на активность сериновых протеаз. // Химический журнал Армении, **2013**, 66, №3, с. 430-439
4. Читчян М.Б., **Саргсян А.С.**, Мелкумян М.А., Аветисян Н.С., Оганезова Г.Г., Оганесян А.М., Оганесян Н.А. Мутагенные свойства гетероциклически замещенных небелковых аминокислот и пептидов. // Биологический журнал Армении, **2014**, 66, №1, с. 26-30

САРГСЯН АРМЕН СЕВАКОВИЧ

ВЫБОР И ИССЛЕДОВАНИЕ НОВЫХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ИНГИБИТОРОВ АКТИВИРОВАННОЙ МИТОГЕНОМ ПРОТЕИН КИНАЗЫ p38 И ПРОТЕИНАЗ

РЕЗЮМЕ

***Ключевые слова:** MAP киназа p38, трипсин, протеиназа K, пируват киназа, небелковая аминокислота, пептид, докинг*

Диссертационная работа посвящена исследованию действия небелковых аминокислот и содержащих таковые пептидов на активность ферментов коллагеназы, трипсина, протеиназы K, пируват киназы и MAPK p38 протеин киназы. Выбранные для исследования ферменты известны как мишени для создания лекарственных препаратов. С целью выявления соединений, потенциально взаимодействующих с ферментами мишенями, на первом этапе работы с помощью программ AutoDock4 и AutoDock Vina было проведен докинг анализ. Затем проведены эксперименты по определению активности ферментов в присутствии небелковых аминокислот и пептидов.

Согласно полученным результатам, ни одно из исследуемых соединений ни взаимодействовало с протеиназой K, а в случае трипсина у некоторых соединений определилось довольно низкая константа ингибирования: (S)-β-[4-аллил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин $K_i=0,09$ мМ, (S)-β-[4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин $K_i=0,02$ мМ, N-формил-метионил-(S)-β-[4-(фуран-2-ил=метил)-3-бутил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин $K_i=0,80$ мМ.

Экспериментальным путем было показано, что 13 из исследуемых соединений имели способность влиять на активность протеиназы К а 8 на активность трипсина. N-формил-метионил-(S)-β-[4-аллил-3-(пиридин-4'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин и аланил-глицил-(S)-β-[4-аллил-3-(пиридин-4'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин оказывают наибольшее влияние на активность протеиназы К. Для них были определены значения IC₅₀ которые составили 0,29 мМ и 0,21 мМ соответственно.

В результате моделирования все соединения проявили сродство по отношению к коллагеназе. Наисильнейшее взаимодействие показали аланил-глицил-(S)-β-[4-аллил-3-(пиридин-4'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин, аланил-глицил-(S)-β-[4-аллил-3-(пиридин-3'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин и N-формил-метионил-(S)-β-[4-аллил-3-(пиридин-3'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин. Константы ингибирования для всех вышеупомянутых соединений имело значение 0,00192 мМ.

Исследован механизм ингибирования лучшего ингибитора коллагеназы аланил-глицил-(S)-β-[4-аллил-3-(пиридин-3'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланина, выявленного экспериментальным путем. Показано, что ингибирование данным веществом имеет бесконкурентный характер.

В результате моделирования все соединения проявили сродство как к РКМ1, так и к РКМ2 изоформам пируваткиназы. Как правило, одно и то же вещество имело более низкую константу ингибирования при взаимодействии с РКМ2, чем с РКМ1. Согласно результатам докиннг анализа из исследованных соединений наиболее низкой константой ингибирования обладает (S)-β-[4-аллил-3-бензил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин K_i=0,00116 мМ.

Некоторые из исследованных соединений оказали явное активирующее воздействие на пируват киназу. Наиболее активным из них оказался трипептид N-формил-метионил-глицил-(S)-β-[4-пропил-3-бутил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин, 0,625 мМ которого увеличивает активность фермента вдвое.

В результате докиннга все соединения проявили сродство по отношению к протеинкиназе р38. При этом трипептид аланил-глицил-(S)-β-[4-аллил-3-(2'-хлорфенил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин имел наименьшее значение константы ингибирования K_i=0,00318 мМ.

(S)-β-[4-аллил-3-(пиридин-4'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин являлся лучшим ингибитором МАРК 14, который при концентрации 2,5 мМ ингибировал фермент на 94%. Кроме вышеупомянутого соединения довольно высокий ингибиторный эффект также проявляли (S)-β-[4-аллил-3-(2'-хлорфенил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин и (S)-β-[4-аллил-3-(пиридин-3'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин, которые при той же концентрации ингибировали МАРК 14 на 85,2% и 88,2% соответственно.

Из исследованных соединений антимуtagenными свойствами обладали (S)-метокси-5-нитрофенилаланин и (S)- β -[4-аллил-3-(3'-гидроксипропил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин а мутагенными свойствами- N-формил-метионил-глицил-(S)- β -[4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин.

SARGSYAN ARMEN S.

SELECTION AND STUDY OF NOVEL LOW MOLECULAR INHIBITORS OF MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE p38 AND PROTEASES

SUMMARY

Key words: *MAP kinase p38, trypsin, proteinase K, pyruvate kinase, non-protein amino acid, peptide, docking*

The investigation of the influence of non-protein amino acids and peptides based thereon on the activity of collagenase, trypsin, proteinase K, pyruvate kinase and protein kinase MAPK p38 has been carried out in the present work. The enzymes selected for this study are well known targets for drug design. At the first step of the work the docking analysis (AutoDock4 and VINA programs) has been performed aimed to reveal compounds which are able to interact with the target enzymes. The experiments on the determination of enzyme activity in the presence of investigated compounds have been carried out then.

According to results obtained non of the studied compounds were able to interact with the proteinase K. But several compounds have demonstrated strong interaction with trypsin: (S)- β -[4-аллил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин $K_i=0,09$ mM, (S)- β -[4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин $K_i=0,02$ mM, N-формил-метионил-(S)- β -[4-(фуранил-2-ил-метил)-3-бутил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин $K_i=0,80$ mM.

It has been shown in experiments that 13 of the compounds in question were able to influence the proteinase K activity and 8 compound were able to influence the trypsin activity. N-формил-метионил-(S)- β -[4-аллил-3-(пиридин-4'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин and аланил-глицил-(S)- β -[4-аллил-3-(пиридин-4'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин have demonstrated the strongest inhibition of proteinase K with the $IC_{50}=0,29$ mM and $IC_{50}=0,21$ mM respectively.

According to the docking analysis all compounds in question were able to interact with the collagenase. Аланил-глицил-(S)- β -[4-аллил-3-(пиридин-4'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин, аланил-глицил-(S)- β -[4-аллил-3-(пиридин-3'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин and N-формил-метионил-(S)- β -[4-аллил-3-(пиридин-3'-ил)-5-

thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine have demonstrated the most strong interaction with the collagenase with the same inhibition constant 0,00192 mM.

According to the results of collagenase activity measurement, the best inhibitor of collagenase is tripeptide alanyl-glycyl-(S)- β -[4-allyl-3-(pyridin-3'-yl)-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine. The study of mechanism of inhibition of this tripeptide on collagenase has shown that this its action proceeds in noncompetitive mode.

According to the docking analysis all compounds in question were able to interact with the both isoforms of pyruvate kinase PKM1 and PKM2. Evidently the interaction with PKM2 was stronger in compare with PKM1. And the strongest interaction has demonstrated (S)- β -[4-allyl-3-benzyl-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine with $K_i=0,00116$ mM.

It has been shown that some compounds actually activate pyruvate kinase. The most activity has N-formyl-methionyl-glycyl-(S)- β -[4-propyl-3-butyl-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine, 0,625 mM of which has increased enzyme activity twice.

According to the docking analysis all compounds in question were able to interact with the protein kinase p38. The strongest interaction has demonstrated tripeptide alanyl-glycyl-(S)- β -[4-allyl-3-(2'-chlorphenyl)-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine with $K_i=0,00318$ mM.

(S)- β -[4-allyl-3-(pyridine-4'-yl)-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine has demonstrated the strongest inhibition of MAPK p38. 2,5 mM of this amino acid has inhibited the enzyme by 94%. Besides this amino acid the inhibitory features have demonstrated (S)- β -[4-allyl-3-(2'-chlorphenyl)-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine and (S)- β -[4-allyl-3-(pyridine-3'-yl)-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine, which in concentration 2.5 mM have inhibited enzyme by 85,2% and 88,2% respectively.

In study of mutagenic/antimutagenic features of the compounds in question it has been revealed that (S)-methoxy-5-nitrophenylalanine and (S)- β -[4-allyl-3-(3'-hydroxypropyl)-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine has ability to decrease the frequency of NG-induce mutagenesis (antimutagen). In contrast N-formyl-methionyl-glycyl-(S)- β -[4-phenyl-3-propyl-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -alanine has increased the frequency of spontaneous and NG induced mutagenesis (mutagen).