

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈԱԿ

ՎԱՐԴԱՆՅԱՆ ԱՐՄԵՆ ՄԻՄՈՆԻ

ՑԻԿԼՈՊՐՈՊԱՆ ԵՎ ՑԻԿԼՈԲՈՒԹԱՆ ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՂ ՆՈՐ ՄԻՋԱՏԱՍՊԱՆ ՄԻԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԿԱՌՈՒՑՎԱԾՔ-ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆ ԿԱԽՎԱԾՈՒԹՅԱՆ ԳՆԱՀԱՏՈՒՄԸ ՆԱՏՐԻՈՒՄԱԿԱՆ ԱՆՑՈՒՂԻՆԵՐԻ ՍՈՂԵԼՆԵՐԻ ՄԻՋՈՑՈՎ

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

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

Երևան 2013

НПЦ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА ГНКО

ВАРДАНЯН АРМЕН СИМОНОВИЧ

ОЦЕНКА СТРУКТУРА-АКТИВНОСТЬ ЗАВИСИМОСТИ НОВЫХ ЦИКЛОПРОПАН- И ЦИКЛОБУТАНСОДЕРЖАЩИХ ИНСЕКТИЦИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ МОДЕЛЕЙ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ

АВТОРЕФЕРАТ

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

Ереван 2013

Ատենախոսության թեման հաստատվել է «Կենսատեխնոլոգիայի ԳՀԻ» ՓԲԸ-ում (ներկայում ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ):

Գիտական ղեկավար՝ կենս. գիտ. թեկնածու Ա.Ա. Համբարձումյան
Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս, ֆիզ.-մաթ. և քիմ. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր Ա. Ա. Շահինյան
կենս. գիտ. թեկնածու Հ. Կ. Կարագուլյան
Առաջատար կազմակերպություն՝ Երևանի պետական համալսարան

Պաշտպանությունը կայանալու է 2013 թ. հունիսի 26-ին, ժամը 14⁰⁰-ին ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի 018 Կենսատեխնոլոգիայի մասնագիտական խորհրդի նիստում:
Հասցե՝ 0056, ՀՀ, ք. Երևան, Գյուրջյան փողոց, 14, հեռ/ֆաքս (374 10) 65 41 83

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ գրադարանում:
Մեղմագիրն առաքված է 2013 թ. հունիսի 26-ին:
Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կենս. գիտ. թեկնածու Գ.Ե. Ավետիսովա

Тема диссертации утверждена в ЗАО «НИИ Биотехнологии» (ныне НПП «Армбиотехнология» НАН РА).

Научный руководитель: канд. биол. наук А. А. Амбарцумян
Официальные оппоненты: академик НАН РА, доктор физ.-мат. и хим. наук, профессор А. А. Шагинян
канд. биол. наук А. К. Карагулян
Ведущая организация: Ереванский государственный университет

Защита диссертации состоится 26 июля 2013 г. в 14⁰⁰ часов на заседании специализированного совета 018 Биотехнологии ВАК РА при НПП «Армбиотехнология» НАН РА.
Адрес: 0056, РА, г. Ереван, ул. Гюрджяна 14, тел/факс (374 10) 65 41 83.
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НПП «Армбиотехнология» НАН РА.

Автореферат разослан 26 июня 2013 г.

Ученый секретарь специализированного совета,
канд. биол. наук

Г. Е. Аветисова

Աշխատանքի ընդհանուր բնութագիրը

Խնդրի արդիականությունը: Ժամանակակից հասարակության կողմից պեստիցիդների և դեղանյութերի լայն կիրառումը բերել է նրան, որ թիրախ հանդիսացող օրգանիզմների դիմադրողականությունը կրել է գենետիկական փոփոխություններ: Սա հսկայական վտանգ է ներկայացնում վարակիչ հիվանդությունների և գյուղատնտեսական վնասատուների դեմ պայքարի տեսակետից: Մինթետիկ օրգանական ինսեկտիցիդների նկատմամբ դիմադրողականության խնդիրն առաջ եկավ դեռևս 1940-ական թթ.:` դրանց կիրառումից անմիջապես հետո: Բնսեկտիցիդների մեծ մասը նյարդային թույլներ են, դրանք փոփոխում են իոնական անցուղիների, ռեցեպտորների կամ ֆերմենտների հատկությունները, որոնք ներգրավված են նյարդային համակարգում ազդանշանի հաղորդման գործընթացում:

Կենսաբանորեն ակտիվ նոր նյութերի հայտնաբերումը, սինթեզը և բնութագրումը ժամանակակից կենսատեխնոլոգիայի կարևորագույն խնդիրներից են: Այդպիսի նյութերի դասին են պատկանում նաև ցիկլոպրոպանի և ցիկլոբութանի ածանցյալներ հանդիսացող նոր սինթեզված միջատասպան և այլ կենսաբանական ակտիվություններով օժտված նյութերը, որոնց բնութագրմանն է նվիրված տվյալ աշխատանքը:

Աշխատանքի արդիականությունը կայանում է նրանում, որ,

Մետաղի վրա պահվող ԵԼԹ-ների բնութագրման համար Տիենի մշակած ցիկլիկ վոլտամպերմետրիայի գործիքային բազան կիրառվել է պլանար (հարթ) ԵԼԹ-ների ինտեգրալ բնութագրերի` ունակության և դիմադրության չափման համար;

Ստեղծվել է նոր մեթոդ ԵԼԹ-ների էլեկտրաքիմիական ինտեգրալ բնութագրիչներից դիմադրության չափման միջոցով դրանցում իոնական անցուղիների վերակառուցման և համապատասխան մոդուլատորների հետ դրանց փոխազդեցության քանակական բնութագրման համար;

ԵԼԹ-ներում վերակառուցված իոնական անցուղիների միջոցով համեմատվել են հայտնի և նոր սինթեզված ցիկլոպրոպանային և ցիկլոբութանային հիմքով հայտնի և նոր սինթեզված ինսեկտիցիդները և եզրակացություններ են արվել դրանց պոտենցիալ միջատասպան կենսաբանական ակտիվության վերաբերյալ:

NMDA ռեցեպտորի և լարմամբ բացվող բակտերիալ նատրիումական անցուղիների հետ փոխազդեցության տեսակետից AutoDock Vina ծրագրի կիրառմամբ համեմատվել են հայտնի և նոր սինթեզված ցիկլոպրոպանային և ցիկլոբութանային հիմքով միջատասպան նյութերը;

Մշակվել է մեթոդաբանություն ֆիզիկական մոդելային համակարգերի և գուգահեռաբար համակարգչային մոդելավորման համադրմամբ իոնական անցուղիների (օբյեկտներ, որոնք ժամանակակից դեղաբանությունում պոտենցիալ դեղաձևերի թիրախների մոտ 30 տոկոսն են կազմում) վրա կենսաբանորեն ակտիվ նյութերի լայն շարքերի հնարավոր ազդեցության նախնական հետազոտման և պոտենցիալ ակտիվ դեղաձևերի նախնական սկրինինգի համար:

Հետազոտության նպատակը և խնդիրները: Աշխատանքի հիմնական նպատակն է եղել ստեղծել մեթոդաբանություն, որը հնարավորություն կընձեռի հարթ ԵԼԹ-ների մոդելային համակարգերում ֆիզիկական փորձերի և AutoDock Vina դոքիմեդ ծրագրի վրա

հիմնված համակարգչային մոդելավորման համադրմամբ հետազոտել իոնական անցուղիների վրա ԿԱՆ-երի ազդեցությունը:

Այդ նպատակին հասնելու համար առաջադրվել են հետևյալ խնդիրները.

- Մետաղի վրա պահվող ԵԼԹ-ների բնութագրման համար Տիենի մշակած ցիկլիկ վոլտամպերմետրիայի գործիքային բազան կիրառել պլանար (հարթ) ԵԼԹ-ների ինտեգրալ բնութագրերի՝ ունակության և դիմադրության չափման համար;
- Ստեղծել նոր մեթոդ ԵԼԹ-ների էլեկտրաքիմիական ինտեգրալ բնութագրիչներից դիմադրության չափման միջոցով դրանցում իոնական անցուղիների վերակառուցման և համապատասխան մոդուլյատորների հետ դրանց փոխազդեցության քանակական բնութագրման համար;
- ԵԼԹ-ներում վերակառուցված իոնական անցուղիների միջոցով համեմատել հայտնի և նոր սինթեզված ցիկլոպրոպանային և ցիկլոբութանային հիմքով պիրետրոնիդային ինսեկտիցիդները և գնահատել դրանց պոտենցիալ կենսաբանական ակտիվությունները;
- NMDA ռեցեպտորի և լարմամբ բացվող բակտերիալ նատրիումական անցուղիների հետ փոխազդեցության տեսակետից AutoDock Vina ծրագրի կիրառմամբ համեմատել հայտնի և նոր սինթեզված ցիկլոպրոպանային և ցիկլոբութանային հիմքով միջատասպան նյութերը;
- ԵԼԹ-ների վրա հիմնված ֆիզիկական մոդելային համակարգերի և զուգահեռաբար համակարգչային մոդելավորման համադրմամբ հետազոտել իոնական անցուղիների հետ ԿԱՆ-երի փոխազդեցության հնարավորությունը և կատարել պոտենցիալ ակտիվ դեղաձևերի նախնական սկրինինգ:

Գիտական նորույթ

- Առաջին անգամ մետաղի վրա պահվող ԵԼԹ-ների բնութագրման համար Տիենի և համահեղինակների մշակած ցիկլիկ վոլտամպերմետրիայի գործիքային բազան կիրառվել է հարթ ԵԼԹ-ների ինտեգրալ բնութագրերի՝ ունակության և դիմադրության չափման համար;
- Ստեղծվել է նոր մեթոդ էլեկտրաքիմիական ինտեգրալ բնութագրիչներից դիմադրության չափման միջոցով ԵԼԹ-ներում վերակառուցված իոնական անցուղիների հետ համապատասխան մոդուլյատորների փոխազդեցության դիսցման հաստատունի հաշվարկման համար;
- ԵԼԹ-ներում վերակառուցված իոնական անցուղիների միջոցով համեմատվել են հայտնի և նոր սինթեզված ցիկլոպրոպանային և ցիկլոբութանային հիմքով միջատասպան նյութերը և գնահատվել են դրանց պոտենցիալ կենսաբանական ակտիվությունները;
- NMDA ռեցեպտորի և լարմամբ բացվող բակտերիալ նատրիումական անցուղիների հետ փոխազդեցության տեսակետից AutoDock Vina ծրագրի կիրառմամբ համեմատվել են հայտնի և նոր սինթեզված ցիկլոպրոպանային և ցիկլոբութանային հիմքով միջատասպան նյութերը;
- ԵԼԹ-ների վրա հիմնված ֆիզիկական մոդելային համակարգերի և զուգահեռաբար համակարգչային մոդելավորման համադրմամբ հետազոտվել են իոնական անցուղիների հետ ԿԱՆ-երի փոխազդեցության հնարավորությունը և կատարվել է պոտենցիալ ակտիվ դեղաձևերի նախնական սկրինինգ:

Կիրառական արժեքը

- Մետաղի վրա պահվող ԵԼԹ-ների բնութագրման համար Տիենի մշակած ցիկլիկ վոլտամպերմետրիայի գործիքային բազայի կիրառումը հարթ ԵԼԹ-ների ինտեգրալ բնութագրերի՝ ունակության և դիմադրության չափման համար;
- Յլի ուղեղից անջատված լիպիդների ընդհանուր ֆրակցիայի հիման վրա հաջողվել է ստանալ ինչպես մետաղի վրա պահվող, այնպես էլ հարթ ԵԼԹ-ներ, որոնք աչքի են ընկնում բացառիկ կայունությամբ;
- Ստեղծվել է նոր մեթոդ էլեկտրաքիմիական ինտեգրալ բնութագրիչներից դիմադրության չափման միջոցով ԵԼԹ-ներում վերակառուցված իոնական անցուղիների հետ համապատասխան լիզանդների փոխազդեցության դիսցման հաստատունների հաշվարկման համար;
- Ստեղծվել է մեթոդ, որը հնարավորություն է տալիս NMDA ռեցեպտորի և լարմամբ բացվող բակտերիալ նատրիումական անցուղիների հետ փոխազդեցության տեսակետից AutoDock Vina ծրագրի կիրառմամբ հայտնի և նոր սինթեզված ցիկլոպրոպանային և ցիկլոբութանային հիմքով միջատասպան նյութերի համեմատման նմանակմամբ բացահայտել պոտենցիալ ակտիվ նյութ – նպատակային հայտնի թիրախ տանդեմի փոխազդեցության էությունը:

Պաշտպանության է ներկայացվում

- Յլի ուղեղից անջատված լիպիդների ընդհանուր ֆրակցիայի հիման վրա ստացված կայուն, մետաղի վրա պահվող և հարթ ԵԼԹ-ների բնութագրումը ցիկլիկ վոլտամպերմետրիայի մեթոդաբանությամբ;
- Մետաղի վրա պահվող և հարթ ԵԼԹ-ներում իոնական անցուղիների վերակառուցումը ու վերակառուցված անցուղիներով ԵԼԹ-ների ունակության և դիմադրության չափումը Տիենի և համահեղինակների մշակած ցիկլիկ վոլտամպերմետրիայի գործիքային բազայի կիրառմամբ;
- Հարթ ԵԼԹ-ներում մորէխի գլխակրծքից անջատված նատրիումական անցուղիների վերակառուցումը և բնութագրումը նոր սինթեզված ցիկլոպրոպանային և ցիկլոբութանային հիմքով միջատասպան նյութերի հետ փոխազդեցության տեսակետից (դիսցման հաստատունի հաշվարկումը);
- NMDA ռեցեպտորի (pdb 3A5T) և լարմամբ բացվող բակտերիալ նատրիումական անցուղիների հետ (pdb 3RW0) փոխազդեցության տեսակետից AutoDock Vina ծրագրի կիրառմամբ հայտնի և նոր սինթեզված ցիկլոպրոպանային և ցիկլոբութանային հիմքով միջատասպան նյութերի կենսաբանական ակտիվությունների համեմատումը;
- ԵԼԹ-ներում վերակառուցված միջատի իոնական անցուղիների հետ փոխազդեցության վրա հիմնված ֆիզիկական մոդելային համակարգերում և հայտնի իոնական անցուղիների հետ դոքինգ անալիզի վիրտուալ համակարգերում պոտենցիալ դեղաձևերի ակտիվությունների համադրմամբ դրանց նախնական սկրինինգը:

Աշխատանքի կապը գիտական թեմաների հետ: Աշխատանքի մի մասը իրականացվել է Հայաստանի պետական ճարտարագիտական համալսարանի (Պոլիտեխնիկ) ՔՏ և ԲՃ ֆակուլտետում 2011թվակնի ANSEF PS-chemorg-2339 ծրագրի շրջանակում:

Հայցորդի անձնական ներդրումը: Հայցորդի ներդրումը ներառում է գրականության վերլուծությունը, փորձասարքի պատրաստումը, փորձարարական աշխատանքները, հոդվածների և զեկուցման թեզիսների ձևակերպումը, ատենախոսության ձևակերպումը և այլն: Իսկ խնդիրների ձևակերպումը, փորձերի մեթոդաբանության մշակումը, դոքսինգի մեթոդաբանության մշակումը, ստացված փորձնական և in silico էքսպերիմենտի արդյունքների քննարկումը կատարվել են գիտական ղեկավար՝ մոլեկուլային կենսաբանության լաբ. վարիչ, կենս. գիտ. թեկնածու, Ա.Ա. Հաբարձումյանի և Երևանի Պետական Ճարտարագիտական (Պլիտեխնիկ) Համալսարանի դոցենտ, քիմ. գիտ. թեկնածու, Ա.Ռ. Միքայելյանի հետ համատեղ:

Ատենախոսության քննարկումը: Աշխատանքի արդյունքները քննարկվել են մոլեկուլային կենսաբանության լաբորատորիայում և «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի գիտական խորհրդում: Ատենախոսության արդյունքները ներկայացվել են «Ապագա կերտող երիտասարդների գիտելիքներ» (Ֆրոյթնոլ Արմենիա Տաղանդ մրցույթ, 2009 թ.), և «Երիտասարդների գիտատեխնիկական և գիտահետազոտական նախագծերի ամենամյա մրցույթ» (ՀՀ Սպորտի և երիտասարդության նախարարություն, 2010 թ.) մրցույթներին և արժանացել հավաստագրերի: «International Congress of Young Scientists» (Երևանի Մ. Հերացու անվան բժշկական համալսարան, 2010 թ.) միջազգային գիտաժողովում; «Մոլեկուլային և բջջային կենսաբանության զարգացման հեռանկարները-2» (երիտասարդ գիտնականների միջազգային գիտաժողով ՀՀ ԳԱԱ, 2010 թ.) գիտաժողովում և արժանացել մրցանակի լավագույն օրալ ներկայացման համար; «Մոլեկուլային և բջջային կենսաբանության զարգացման հեռանկարները-III» (երիտասարդ գիտնականների միջազգային գիտաժողով ՀՀ ԳԱԱ, 2012 թ.) գիտաժողովում:

Տպագրված աշխատանքներ: Ատենախոսական աշխատանքում շարադրված հետազոտության արդյունքները հրատարակված են 7 գիտական աշխատանքներում՝ 3 հոդվածներ տեղական հանդեսներում, որոնցից մեկը առանց համահեղինակների և 4 միջազգային գիտաժողովի թեզիսներ:

Աշխատանքի իրականացման վայրը: Աշխատանքը կատարվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ ՊՈԱԿ-ում և Հայաստանի պետական ճարտարագիտական համալսարանի (Պլիտեխնիկ) ՔՏ և ԲՃ ֆակուլտետում:

Աշխատանքի ծավալը և կառուցվածքը: Աշխատանքը կազմված է 115 էջից, 4 գլխից, պարունակում է 9 աղյուսակներ, 20 նկարներ և 167 գրական հղումներ:

ՎՈՒՄԻՆ 1. ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ՎԵՐԼՈՒՑՈՒԹՅՈՒՆ

Գրական ակնարկը նվիրված է թեմայի հետ առնչվող առավել հայտնի աշխատանքների ամփոփմանը: Առաջին մասում հիմնական ուշադրությունը կենտրոնացված է իոնական անցուղիների հետազոտման մեթոդաբանությանը, իոնական անցուղիների և մասնավորապես նատրիումական անցուղիների բնութագրմանը: Գրական ակնարկի երկրորդ մասը նվիրված է լիգանդ-մակրոմոլեկուլ փոխազդեցության հետազոտման AutoDock Vina դոքսինգ ծրագրի, և աշխատանքում կիրառված նատրիումական անցուղիների բնութագրմանը:

ԳԼՈՒԽ 2. ՆՅՈՒԹԵՐ և ՄԵԹՈՂՆԵՐ

Աշխատանքի այս բաժնում նկարագրված են օգտագործված նյութերը և մեթոդները: Մեթոդների բաժնում նկարագրված է լիպիդների անջատման և մաքրման, թաղանթային սպիտակուցների անջատման մեթոդները, մետաղի վրա պահվող և հարթ ԵԼԹ-ների ստացումը և դրանցում թաղանթային սպիտակուցների ընդգրկումն ու վերակառուցումը, ԵԼԹ-ում վերակառուցված նատրիումական անցուղիների վրա ազդանյութերի ազդեցության հետազոտման մեթոդաբանությունը: Այստեղ բերված է նաև AutoDock Vina ծրագրով դոքինգ անալիզի մեթոդաբանությունը, ներկայացված են աշխատանքում կիրառված ցիկլոֆոսֆանային և ցիկլոպրոպանային հիմքով միջատասպան նյութերը:

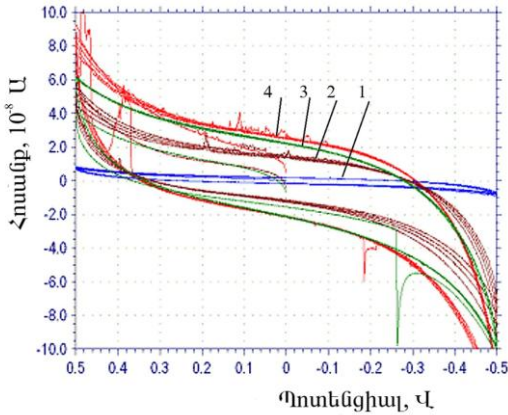
ԳԼՈՒԽ 3. ՍՍՍՑՎԱԾ ԱՐՊՑՈՒՆՔՆԵՐԸ

3.1. Երկշերտ լիպիդային թաղանթների և դրանցում վերակառուցված իոնական անցուղիների ստացումը և բնութագրումը:

Մինթեզված [Баданян и др., 1997; Микаелян, 2010] և հայտնի ցիկլոֆոսֆանային ու ցիկլոպրոպանային հիմքով միջատասպան նյութերի միջատների լարմամբ ակտիվացող Na-ական անցուղիների հետ փոխազդեցության ուսումնասիրության համար փորձ է արվել Տիենի և նրա աշխատակիցների կողմից մետաղի վրա պահվող ԵԼԹ-ների համար մշակված ցիկլիկ վոլտամպերմետրիայի մեթոդաբանությունը (CVA) [Asaka et al., 1999] կիրառել հարթ ԵԼԹ-ների և վերակառուցված նատրիումական անցուղիներով հարթ ԵԼԹ-ների նկատմամբ:

Աշխատանքի առաջին էտապում վերարտադրվել են մետաղի վրա պահվող ԵԼԹ-ների համար Տիենի և համահեղինակների ստացած արդյունքները: Ցույց է տրվել, որ Ֆուլչի մեթանոլ-քլորոֆորմային մեթոդով անջատված ցլի ուղեղի ընդհանուր լիպիդային ֆրակցիայի հիման վրա ստացված մետաղի վրա պահվող ԵԼԹ-ն $0,1 \text{ M NaCl}$ -ի լուծույթում ցուցաբերում է տիպիկ երկշերտին բնորոշ էլեկտրական պարամետրեր՝ $C=4,5 \times 10^{-9}$ Ֆ ունակություն և $R=1,3 \times 10^9$ Օհմ դիմադրություն: Ավելին, $\pm 0,8$ Վ միջակայքում CVA ցիկլում էլեկտրական պարպումից հետո այն արագ վերականգնվում է, և $\pm 0,2$ Վ միջակայքում CVA ցիկլում ցուցաբերում նախկինի հետ համընկնող հիստերիզիսի օղակ: Ստացված ԵԼԹ-ն 1-2 բուպե տևողությամբ ցլի ուղեղից անջատված թաղանթային սպիտակուցների լուծույթի մեջ ընկղմելուց հետո մետաղի վրա պահվող ԵԼԹ-ի ունակությունը $0,1 \text{ M NaCl}$ -ի լուծույթում մեծանում է ավելի քան 20 անգամ իսկ դիմադրությունը փոքրանում է գրեթե նույնքան անգամ, կազմելով համապատասխանաբար՝ $C=8,4 \times 10^{-8}$ Ֆ և $R=7,3 \times 10^7$ Օհմ: Դա ուղղակի վկայություն է հետազոտվող ԵԼԹ-ում նատրիումական անցուղիների վերակառուցման մասին: Նույն փորձը $0,1 \text{ M KCl}$ -ի լուծույթում կատարելիս ունակության և դիմադրության նման փոփոխություն չի դիտվում:

Մետաղի վրա պահվող ԵԼԹ-ներում իոնական անցուղիների վերակառուցման փաստի ապացուցման համար հետազոտվել է թաղանթային սպիտակուցների աճող կոնցենտրացիայի ազդեցությունը երկշերտի էլեկտրական պարամետրերի վրա $\pm 0,5$ Վ միջակայքում CVA ցիկլում: Արդյունքները ներկայացված են նկ. 1-ում: Ներկայացված կորերում աչքի է զառնում լարումների մեծ բացարձակ արժեքների դեպքում հոսանքի բացարձակ արժեքների կտրուկ բարձրացումը, ինչը դիտվել է նաև Տիենի և համահեղինակների մոտ [Asaka et al., 1999]:



Նկ. 1. Մետաղի վրա պահվող ԵԼԹ-ների ցիկլիկ վոլտամպերմետրիայի կորերի ձևի կախումը դրանցում ներառված ցլի ուղեղի թաղանթային սպիտակուցների կոնցենտրացիայից:

(1)-մետաղի վրա պահվող ԵԼԹ, (2) – 1/1000 թաղանթային սպիտակուց (ԹՄ)/լիպիդ, (3) – 1/100 ԹՄ/լիպիդ, (4) – 1/10 ԹՄ/լիպիդ:

Ստացված արդյունքներից հետևում է, որ մետաղի վրա պահվող ԵԼԹ-ներում ուղեղի սպիտակուցների վերակառուցման արդյունքում ունակությունը մեծանում է ավելի քան 16 անգամ, իսկ դիմադրությունը փոքրանում է համարյա 60 անգամ ($C=7,8 \times 10^{-8}$ Ֆ և $R=2,3 \times 10^7$ Օհմ):

Նկ. 1-ում հետազոտված համակարգերի ունակության և դիմադրության համար ստացված արդյունքները ամփոփված են աղյուսակ 1-ում:

Աղյուսակ 1.

Մետաղի վրա պահվող և հարթ ԵԼԹ-ների էլեկտրական բնութագրերը

Երկշերտի տեսակը	C, 10^{-9} Ֆ	R, 10^9 Օհմ
մետաղի վրա պահվող ԵԼԹ (մ-ԵԼԹ)	4,8	1,360
մ-ԵԼԹ և 0,15 մգ/մլ վերակառ. սպիտակուց	441,6	0,036
մ-ԵԼԹ և 1,5 մգ/մլ վերակառ. սպիտակուց	658,3	0,025
մ-ԵԼԹ և 15 մգ/մլ վերակառ. սպիտակուց	783,3	0,023
հարթ ԵԼԹ	3,3	1,800

Ներկայացված արդյունքներից հետևում է, որ կիրառված պայմաններում հարթ ԵԼԹ-ն ցուցաբերում է մետաղի վրա պահվող ԵԼԹ-ի նման էլեկտրական բնութագրեր, իսկ թաղանթային սպիտակուցներով մետաղի վրա պահվող երկշերտի մշակումը քիչ է ազդում դրա էլեկտրական պարամետրերի փոփոխության վրա, վկայելով սպիտակուցի արդեն ցածր կոնցենտրացիայում հազեցնող լինելու մասին:

Այսպիսով ներկայացված է ցիկլիկ վոլտամպերմետրիայի վրա հիմնված նոր մեթոդաբանություն մետաղի վրա պահվող և հարթ երկշերտ լիպիդային թաղանթներում վարակառուցված իոնական անցուղիների հետ կենսաբանական ակտիվ միացությունների փոխազդեցության ուսումնասիրման համար:

3.2. Հայտնի և նոր ստեղծված ցիկլոբութանային և ցիկլոպրոպանային ինսեկտիցիդների ակտիվությունների գնահատումը երկշերտ լիպիդային թաղանթներում վերակառուցված մորեխի նատրիումական անցուղիների մոդելի օգնությամբ:

Ցիկլիկ վոլտամպերմետրիայի մեթոդաբանությունը կիրառվել է դասական հարթ (պլանար) երկշերտերի նկատմամբ, ինչպես նաև հետազոտվել է դրանցում մորեխի գլխակրծքի թաղանթային սպիտակուցների վերակառուցման հնարավորությունները:

Ցույց է տրվել, որ միջատի վերակառուցված թաղանթային սպիտակուցների ընդգրկման արդյունքում ԵԼԹ-ի ունակությունը մեծանում է ավելի քան 77 անգամ, իսկ դիմադրությունը ընկնում է ավելի քան 81 անգամ: Ունակությունների և դիմադրությունների բացարձակ արժեքները բերված են աղյուսակ 2-ում և վկայում են ԵԼԹ-ներում միջատների իոնական անցուղիների վերակառուցման մասին:

Աղյուսակ 2.

Մորեխի թաղանթային սպիտակուցներով մոդիֆիկացված և ազատ հարթ ԵԼԹ-ների էլեկտրական բնութագրերը

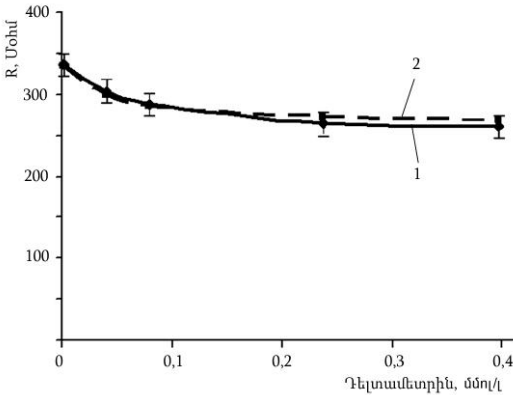
Երկշերտի ձևը	C, 10 ⁻⁹ Ֆ	R, 10 ⁹ Օհմ
Հարթ ԵԼԹ	0,22	13
Անցուղիներով մոդիֆիկացված ԵԼԹ	17	0,16

Թաղանթային սպիտակուցներով վերակառուցման արդյունքում ԵԼԹ-ի էլեկտրական պարամետրերի կտրուկ փոփոխությունները մենք վերագրում ենք լարմամբ բացվող նատրիումական անցուղիներին հետևյալ պատճառներով.

- քանի որ համակարգում առկա են Na⁺ և Cl⁻ իոնները, ապա երկշերտի ունակության և հաղորդականության դիտվող փոփոխությունները կարող են բացատրվել միայն դրանց անցուղիներով;
- Na⁺-ական անցուղիները կարևոր դեր են կատարում ներվային իմպուլսի տարածման գործընթացում և հետևաբար մեծ քանակով առկա են մորեխի գլխակրծքի թաղանթային սպիտակուցների խառնուրդում;
- մորեխի գլխակրծքի թաղանթային սպիտակուցներով մոդիֆիկացված ԵԼԹ-ում CVA-ցիկլում լարման պարբերական տատանումների դեպքում մինչև 2-կարգով մեծանում է լիպիդային երկշերտի հաղորդականությունը;
- ստորև բերված փորձերում ցույց է տրված, որ լարմամբ բացվող Na⁺-ական անցուղիների պոչային հոսանքների ժամանակը երկարացնող դելտամետրիները էապես մեծացնում է մոդիֆիկացված ԵԼԹ-ի հաղորդականությունը:

Ներկայացվող հարթ ԵԼԹ-ի մոդելը $\pm 0,2$ Վ լարման տիրույթում CVA-ի էքսպերիմենտում կայուն է և ազատ, և վերակառուցված թաղանթային սպիտակուցներ պարունակած վիճակում (մինչև 30 րոպ):

Ուսումնասիրվել է ցիանային խումբ պարունակող ցիկլոպրոպանի ածանցյալ, հայտնի պիրետրոլի դելտամետրինի ազդեցությունը մորեխի գլխակրծքի թաղանթային սպիտակուցներով մոդիֆիկացված ԵԼԹ-ի դիմադրության փոփոխության վրա: Արդյունքները ներկայացված են նկար 2-ում:



Սկ. 2. Մորեխի գլխակրծքի թաղանթային սպիտակուցներով վերակառուցված ԵԼԹ-ի դիմադրության փոփոխության կախումը դեկամետրինի կոնցենտրացիայից:
 1 – փորձնական կորը չափումների միջին քառակուսային շեղումներով, 2 – տեսական կորը:

Այսպիսով դեկամետրինի կոնցենտրացիայից կախված նատրիումական անցուղիներով մոդիֆիկացված ԵԼԹ-ի դիմադրությունը հակադարձ կախվածության օրենքով ընկնում է, ձգտելով որոշակի կայուն արժեքի: Այս վարքը նման է լիզանդ-մակրոմոլեկուլ կոմպլեքսների դիսոցիացիայի գործընթացին ըստ զանգվածների ներգործման օրենքի ($M.L \leftrightarrow M+L$), եթե փոխազդեցությունը տեղի է ունենում մակրոմոլեկուլի մեկ կետում [Cantor and Schimmel, 1980]: Այս դեպքում լիզանդ-մակրոմոլեկուլ կոմպլեքսի թվացյալ դիսոցիացիայի հաստատունը հաշվարկվում է (1) բանաձևով:

$$K'_{d} = \frac{[M][L]}{[M.L]} \quad (1)$$

Որտեղ՝ K'_{d} -ն դիսոցիացիայի հաստատունն է, $[M]$, $[L]$ և $[M.L]$ -ը, համապատասխանաբար, ԵԼԹ-ում վերակառուցված մակրոմոլեկուլի, լիզանդի և լիզանդ-վերակառուցված մակրոմոլեկուլ կոմպլեքսի կոնցենտրացիաներն են:

Քանի որ լիզանդի ավելցուկի դեպքում կոմպլեքսի $[M.L]_{max}$ հագեցվող առավելագույն կոնցենտրացիան հավասար է վերակառուցված մակրոմոլեկուլների $[M]_0$ ընդհանուր կոնցենտրացիային, և տվյալ կետում դիմադրության նորմալիզացված նվազումը հավասար է լիզանդ-մակրոմոլեկուլ կոմպլեքսի մոլային բաժնին ($[M.L]/[M.L]_{max}$), ապա հեշտությամբ ստացվում է (2) հավասարումը:

$$\frac{(R-R_{ss})}{(R_0-R_{ss})} = \frac{[M.L]}{([M]+[M.L])} = \frac{[L]}{(K'_{d}+[L])} \quad (2)$$

Որտեղ՝ R_{ss} -ը վերակառուցված իոնական անցուղիի պարունակող ԵԼԹ-ի դիմադրությունն է մինչև լիզանդի ավելացումը, R_0 -ն նույն համակարգի դիմադրությունն է լիզանդի ավելցուկի դեպքում, երբ լիզանդ-մակրոմոլեկուլ կոմպլեքսի մոլային բաժինը 1 է:

Ներկայացված (2) բանաձևով նկ. 1-ի 1-կորում ներկայացված փորձնական արդյունքների հիման վրա որոշվել է լիզանդ-մակրոմոլեկուլ փոխազդեցության թվացյալ դիսոցիացիայի հաստատունը՝ (K'_{d} -ն): Դեկամետրինի համար այն կազմել է $40,3 \pm 8,7$ մկմոլ/լ: Նկարից երևում է տեսական և փորձնական արդյունքների հավաստի համընկնումը:

Ցիպերմետրինի համար կատարված նման հետազոտությունների արդյունքում որոշված լիզանդ-մակրոմոլեկուլ փոխազդեցության թվացյալ դիսոցիացիայի հաստատունը կազմել է $104,9 \pm 16,9$ մկմոլ/լ: Այստեղ ևս դիսոցիացիայի հաստատունի այս արժեքի կիրառմամբ հաշվարկված տեսական կորը հավաստիորեն համընկնում է փորձնական կորին:

Պիրետրոիդային ինսեկտիցիդ – ԵԼԹ-ում վերակառուցված նատրիումական անցուղիի մոդելի համար լիզանդ-մակրոմոլեկուլ փոխազդեցության դիսոցիացիայի հաստատունը

տունի ($K'z$ -ն) հաշվարկման համար մշակված մեթոդաբանությունը օգտագործվել է նոր սինթեզված և հայտնի ցիկլոբութանային և ցիկլոպրոպանային ինսեկտիցիդների բնութագրման համար: Ստացված արդյունքները ներկայացված են աղյուսակ 3-ում:

Աղյուսակ 3

Նոր սինթեզված և հայտնի ցիկլոբութանային և ցիկլոպրոպանային միացությունների և ԵԼԹ-ում վերակառուցված մորեխի նատրիումական անցուղիների չափված դիսոցման հաստատունները

Ազդանյութ	$K'z$, մկմոլ/լ
Ցիկլոբութին	3,87±1,13
CB-Պիպերիդին ամիդ	6,97±2,01
CB-Թթու	13,5±2,36
Դելտամետրին	40,3±8,70
Ցիպերմետրին	104,9±16,9
Ու-Պերմետրինաթթու	110,3±27,1
Պերմետրինաթթու	552,0±182

Աղյուսակից հետևում է, որ մորեխի գլխակրծքի թաղանթային սպիտակուցներով մոդիֆիկացված ԵԼԹ-ներով տարվող CVA փորձում ցիկլոբութանային միացությունների դիսոցման թվացյալ հաստատունները մեկ կարգով փոքր են ցիկլոպրոպանային բնույթի միացությունների դիսոցման հաստատուններից:

3.3. NMDA և լարմամբ բացվող բակտերիալ նատրիումական անցուղիների նկատմամբ հայտնի և նոր ստեղծված ցիկլոբութանային և ցիկլոպրոպանային ինսեկտիցիդների խնամակցությունների գնահատումը AutoDock Vina ծրագրի կիրառմամբ:

Նպատակ ունենալով գնահատել նոր սինթեզված ցիկլոբութանային և ցիկլոպրոպանային կառուցվածքի միջատասպան միացությունների ակտիվությունները՝ AutoDock Vina ծրագրով իրականացվել են այս միացությունների և հայտնի ինսեկտիցիդների (դելտամետրին, ցիպերմետրին, պերմետրին) մոլեկուլների ցիկլոբութանային կամ ցիկլոպրոպանային օղակների քիրալային ածխածինների նկատմամբ ստերիոիզոմերների դոքինգի փորձեր *Rattus norvegicus*-ի N-մեթիլ-D-ասպարտատային՝ NMDAR2A, ռեցեպտորի (pdb 2A5T) [Furukawa et al., 2005] և *Arcobacter butzleri*-ի լարմամբ բացվող նատրիումական անցուղու (pdb 3RW0) հետ:

Նոր սինթեզված ցիկլոբութանային միացությունների և նատրիումական անցուղիների փոխազդեցության համար AutoDock Vina ծրագրի կիրառմամբ հաշվարկված դիսոցման հաստատունները ներկայացված են աղյուսակ 4-ում:

Բերված արդյունքներից առաջին հերթին աչքի է զարնում այն փաստը, որ ցիկլոբութանային թթվի բոլոր ածանցյալները նատրիումական անցուղիների հետ փոխազդեցություններում ուժեղ են CB-թթուներից: Մասնավորապես ցիկլոբութինները մոտ երկու կարգով, իսկ CB-պիպերիդին ամիդները մոտ մեկ կարգով ավելի փոքր դիսոցման հաստատուններ են ցուցաբերում թթվի համեմատ և NMDA ռեցեպտորի, և բակտերիալ լարմամբ բացվող նատրիումական անցուղու հետ տարվող դոքինգի փորձերում: Պետք է նշել նաև, որ դոքինգի փորձում բոլոր երեք ցիկլոբութանային

միացությունների ստերեոիզոմերները մոտ մեկ կարգով ավելի բարձր խնամակցությամբ են փոխազդում *Arcobacter butzleri*-ի լարմամբ բացվող նատրիումական անցուղու հետ, *Rattus norvegicus*-ի N-մեթիլ-D-ասպարտատային ռեցեպտորի համեմատ:

Աղյուսակ 4.

AutoDock Vina ծրագրի կիրառմամբ նոր սինթեզված ցիկլոբութանային միացությունների և նատրիումական անցուղիների փոխազդեցության համար հաշվարկված դիստանսիան հաստատունները

Միացություններ	2A5T		3RW0	
	ΔG, կկալ/մոլ	K _D , մկմոլ/լ	ΔG, կկալ/մոլ	K _D , մկմոլ/լ
(1R,3R,4R)-Ցիկլոբութին	-7,3	4,46	-8,3	0,82
(1R,3S,4S)-Ցիկլոբութին	-7,3	4,46	-8,7	0,42
(1S,3R,4R)-Ցիկլոբութին	-7,5	3,18	-8,3	0,82
(1S,3S,4S)-Ցիկլոբութին	-7,3	4,46	-8,8	0,35
(1R,3R,4R)-CB-Պիպերիդին	-6,3	24,10	-7,2	5,28
(1R,3S,4S)-CB-Պիպերիդին	-6,3	24,10	-7,2	5,28
(1S,3R,4R)-CB-Պիպերիդին	-6,3	24,10	-7,1	6,25
(1S,3S,4S)-CB-Պիպերիդին	-6,2	28,53	-7,4	3,76
(1R,3R,4R)-CB-Թթու	-5,4	110,9	-6,4	20,36
(1R,3S,4S)-CB-Թթու	-5,5	93,0	-6,3	24,10
(1S,3R,4R)-CB-Թթու	-5,0	216,5	-5,5	92,99
(1S,3S,4S)-CB-Թթու	-5,2	154,9	-6,4	20,36

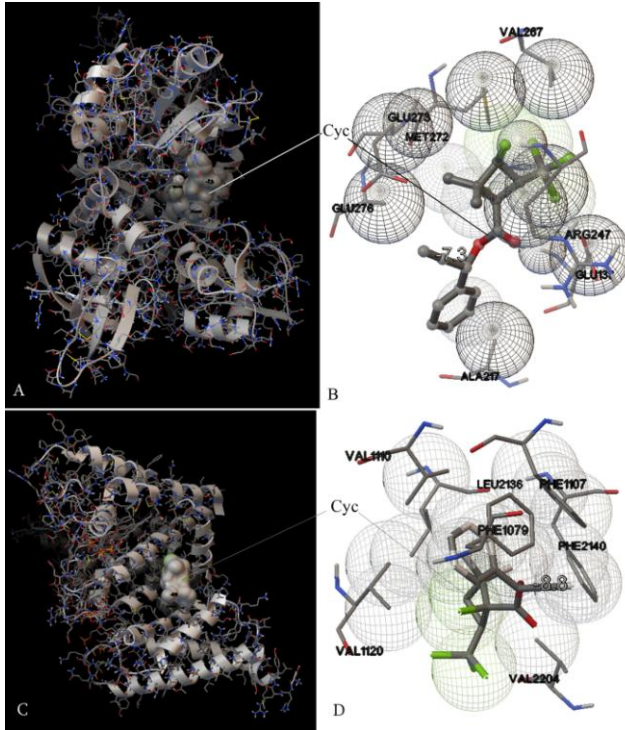
Աղյուսակ 4-ից նաև հետևում է, որ բոլոր նատրիումական անցուղիների հետ ցիկլոբութանային միացությունների ստերեոիզոմերների փոխազդեցության էներգիաների տարբերությունը չի գերազանցում 0,9 կկալ/մոլ արժեքը: Դա հավանաբար կարելի է բացատրել այն փաստով, որ ցիկլոբութանային օղակի նկատմամբ դիտարկվող մոլեկուլների մասերի դասավորվածությունը քիչ է ազդում արդյունաբար մոլեկուլների մակրոմոլեկուլների հետ փոխազդող ակտիվ մակերևույթների պրոֆիլի վրա:

Ցիկլոբութանային միացություններից նատրիումական անցուղիների հետ դոքինգ անալիզում առավել ուժեղ փոխազդեցություն ցուցաբերող (1S,3S,4S)-ցիկլոբութինի դոքինգի պատկերները ներկայացված են նկ. 3-ում:

Ինչպես երևում է նկ. 3-ում ներկայացված տվյալներից, (1S,3S,4S)-ցիկլոբութինը թե 2A5T ռեցեպտորի (նկ. 3.A), և թե 3RW0 անցուղու (նկ. 3.C) հետ, համապատասխանաբար, -7,3 կկալ/մոլ և -8,8 կկալ/մոլ Գիբսի ազատ էներգիաներով, փոխազդում է ակոսի մասում: Մենք գտնում ենք, որ այդ ակոսները ամբողջական ինտակտ մակրոմոլեկուլներում պետք է կազմեն տետրամեր անցուղիների խոռոչները:

Մյուս կողմից, փոխազդեցությունների մանրագնի նիտարկումը ցույց է տալիս, որ էթե 2A5T ռեցեպտորի դեպքում (նկ. 3.B) ցիկլոբութինի դիտարկված ստերեոիզոմերը Val²⁶⁷, և Ala²¹⁷ ամինաթթվային մնացորդների հետ հիդրոֆոբ փոխազդեցություններից զատ Վան-դեր-Վաալյան փոխազդեցությունների մեջ է մտնում Glu²⁷³, Glu¹³³, Glu²⁷⁶ և Arg²⁴⁷ ամինաթթվային մնացորդների հետ, ապա 3RW0 անցուղու դեպքում (նկ. 3.D)

ցիկլոբութինը բացառապես հիդրոֆոր կերպով փոխազդում է Val¹¹⁰, Val¹²⁰, Val²²⁰⁴, Leu²¹³⁶, Phe¹⁰⁷⁹, Phe¹¹⁰⁷ և Phe²¹⁴⁰ ամինաթթվային մնացորդների հետ: Թերևս դրանով է բացատրվում երկրորդ փոխազդեցության ազատ էներգիայի 1,5 կկալ/մոլ-ով ավելի բարձր արժեքը:



Նկ. 3. (1S,3S,4S)-Ցիկլոբութինի և նատրիումական անցուղիների դոքինգի արդյունքները:

A, B – Ցիկլոբութինի փոխազդեցությունը 2A5T NMDA ռեցեպտորի հետ; C, D – ցիկլոբութինի փոխազդեցությունը 3RW0 լարմամբ բացվող բակտերիալ անցուղու հետ; Cyc – (1S,3S,4S)-ցիկլոբութին:

Նոր սինթեզված ցիկլոպրոպանային միացությունների և նատրիումական անցուղիների փոխազդեցության համար AutoDock Vina ծրագրի կիրառմամբ հաշվարկված դիսոցման հաստատունները ներկայացված են աղյուսակ 5-ում:

Աղյուսակ 5-ից հետևում է, որ հետազոտված ցիկլոպրոպանային միացությունների ստերեոիզոմերները դիտարկված երկու տարբեր նատրիումական անցուղիների հետ փոխազդեցության վիրտուալ փորձերում նման վարք են ցուցաբերում, ինչպես և ցիկլոբութանների դեպքում էր: Այստեղ կապի էներգիայի մաքսիմալ տարբերությունները միևնույն միացության ստերեոիզոմերների միջև միևնույն ակցեպտորի հետ չի գերազանցում 0,8 կկալ/մոլ արժեքը: Դա հավանաբար կարելի է բացատրել այն փաստով, որ ինչպես և ցիկլոբութանային միացությունների դեպքում էր, ցիկլոպրոպանային օղակի նկատմամբ դիտարկվող մոլեկուլների մասերի դասավորվածությունը քիչ է ազդում արդյունաբար մոլեկուլների մակրոմոլեկուլների հետ փոխազդող ակտիվ մակերևույթների պրոֆիլի վրա:

AutoDock Vina ծրագրի կիրառմամբ նոր սինթեզված և հայտնի ցիկլոպրոպանային միացությունների և նատրիումական անցուղիների փոխազդեցության համար հաշվարկված դիսոնման հաստատունները

Միացություններ	A5T		3RW0	
	ΔG , կկալ/մոլ	K_D , մկմոլ/լ	ΔG , կկալ/մոլ	K_D , մկմոլ/լ
(1R,3R)-Դելտամետրին	-9,6	0,09	-9,0	0,25
(1R,3R)-Ցիպերմետրին	-9,0	0,25	-9,5	0,11
(1R,3R)-Վերմետրին	-8,7	0,42	-9,4	0,13
(1R,3S)-Վերմետրին	-8,7	0,42	-9,2	0,18
(1S,3R)-Վերմետրին	-8,6	0,50	-8,8	0,35
(1S,3S)-Վերմետրին	-8,7	0,42	-8,6	0,50
(1R,3R)-Պերմետրին	-8,8	0,35	-9,3	0,15
(1R,3S)-Պերմետրին	-9,0	0,25	-9,7	0,08
(1S,3R)-Պերմետրին	-9,0	0,25	-9,8	0,07
(1S,3S)-Պերմետրին	-9,0	0,25	-9,8	0,07
(1R,3R)-Վերմետրինաթթու	-6,1	33,78	-6,3	24,10
(1R,3S)-Վերմետրինաթթու	-5,6	78,55	-5,6	78,55
(1S,3R)-Վերմետրինաթթու	-6,1	33,78	-6,0	39,99
(1S,3S)-Վերմետրինաթթու	-6,4	20,36	-5,5	92,99
(1R,3R)-Պերմետրինաթթու	-5,8	56,05	-6,0	39,99
(1R,3S)-Պերմետրինաթթու	-5,8	56,05	-5,9	47,34
(1S,3R)-Պերմետրինաթթու	-5,4	110,9	-6,0	39,99
(1S,3S)-Պերմետրինաթթու	-5,8	56,05	-6,0	39,99

Պետք է նշել նաև, որ դոքսինգի փորձում ի տարբերություն ցիկլոպրոպանային միացությունների, բոլոր ցիկլոպրոպանային միացությունների ստերեոիզոմերները նման ազատ էներգիայի արժեքներ են ցուցաբերում *Rattus norvegicus*-ի N-մեթիլ-D-ասպարտատային ռեցեպտորի և *Arcobacter butzleri*-ի լարմամբ բացվող նատրիումական անցուղու հետ փոխազդեցություններում:

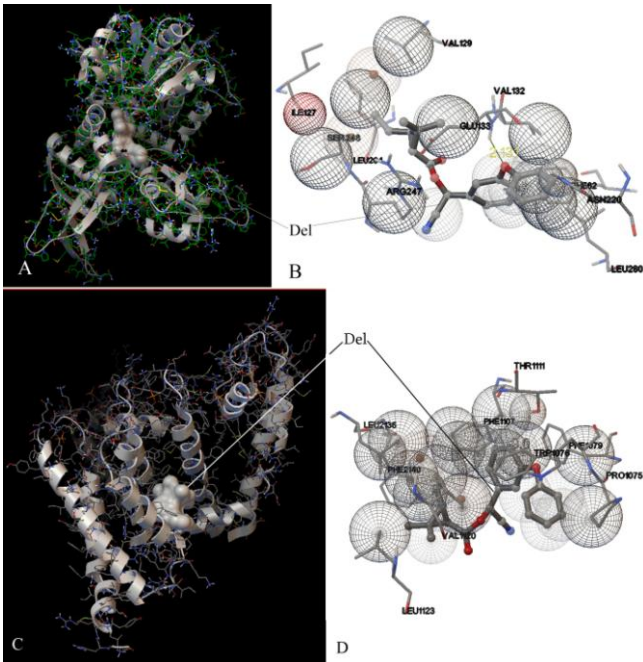
Աղյուսակ 5-ում բերված արդյունքներից հետևում է նաև, որ նոր սինթեզված Վերմետրինաթթվի ստերեոիզոմերները նատրիումական անցուղիների հետ փոխազդեցություններում նույն կարգի ազատ էներգիա են ցուցաբերում, ինչ հայտնի պերմետրինաթթվի ստերեոիզոմերները: Իսկ ապագայում սինթեզվելիք Վերմետրինի ստերեոիզոմերները հայտնի պերմետրինի հետ համեմատած նույնիսկ ավելի ցածր խնամակցություն են ցուցաբերում և՛ NMDA ռեցեպտորի, և՛ բակտերիալ լարմամբ բացվող նատրիումական անցուղու հետ տարվող դոքսինգի փորձերում:

Մյուս կողմից էլ աղյուսակ 5-ից հետևում է, որ Վերմետրինի ստերեոիզոմերները Վերմետրինաթթվի ստերեոիզոմերների համեմատ երեք կարգով ավելի մեծ

խնամակցություն են ցուցաբերում *Rattus norvegicus*-ի N-մեթիլ-D-ասպարտատային ռեցեպտորի և *Arcobacter butzleri*-ի լարմամբ բացվող նատրիումական անցուղու հետ փոխազդեցություններում:

NMDA ռեցեպտորի և բակտերիալ լարմամբ բացվող նատրիումական անցուղու հետ տարվող դոքինգի փորձերում նույն երեք կարգի հարաբերակցությունն է դիտվում դելտամետրինի, ցիպերմետրինի և պերմետրինի դիտարկված ստերեոիզոմերների դիսոցիան հաստատունների արժեքների ու պերմետրինաթթվի դիտարկված ստերեոիզոմերների համապատասխան բնութագրերի միջև:

Ցիկլոպրոպանային միացություններից նատրիումական անցուղիների հետ դոքինգ անալիզում առավել ուժեղ փոխազդեցություն ցուցաբերող (*1R,3R*)-դելտամետրինի դոքինգի պատկերները ներկայացված են նկ. 4-ում: Ինչպես երևում է նկարում ներկայացված տվյալներից, (*1R,3R*)-դելտամետրինը թե 2A5T ռեցեպտորի (նկ. 4.A), և թե 3RW0 անցուղու (նկ. 4.C) հետ փոխազդում է, համապատասխանաբար, -9,6 կկալ/մոլ և -9,0 կկալ/մալ Գիբսի ազատ էներգիաներով, ակոսի մասում: Ինչպես նշվել է ցիկլոբուրիների համար, այդ ակոսները ամբողջական ինտակտ մակրոմոլեկուլներում պետք է կազմեն տետրամեր անցուղիների խոռոչները:



Նկ. 4. (*1R,3R*)-Ղել-տամետրինի և նատրիումական անցուղիների դոքինգի արդյունքները:

A, B – Ղելտամետրինի փոխազդեցությունը 2A5T NMDA ռեցեպտորի հետ; C, D – դելտամետրինի փոխազդեցությունը 3RW0 լարմամբ բացվող բակտերիալ անցուղու հետ; Del – (*1R,3R*)-դելտամետրին:

Մյուս կողմից, փոխազդեցությունների մանրագնին դիտարկումը ցույց է տալիս, որ եթե 2A5T ռեցեպտորի դեպքում (նկ. 4.B) դելտամետրինի դիտարկված ստերեոիզոմերը հիդրոֆոր փոխազդեցությունների մեջ է մտնում Phe⁶², Ile¹²⁷, Val¹²⁹, Val¹³², Leu²⁰¹ և Leu²⁸⁰ ամինաթթվային մնացորդների հետ ու Վան-դեր-Վաալսյան փոխազդեցությունների մեջ է մտնում Glu¹³³, Asn²²⁰, Arg²⁴⁷ և Ser²⁴⁸ ամինաթթվային մնացորդների հետ, ապա 3RW0

անցուղու դեպքում (նկ. 4.D) դելտամետրինը Pro¹⁰⁷⁵ ից զատ բացառապես հիդրոֆոր կերպով փոխազդում է Thr¹⁰⁷⁸, Phe¹⁰⁷⁹, Phe¹¹⁰⁷, Tyr¹¹¹¹, Val¹¹²⁰, Leu²¹²³, Leu²¹³⁶, և Phe²¹⁴⁰ ամինաթթվային մնացորդների հետ: 2A5T ռեցեպտորի դեպքում առկա է նաև 2,13 Å երկարությամբ ջրածնային կապ դելտամետրինի թթվածնի և Glu¹³³-ի ազոտի միջև: Թերևս դրանով է բացատրվում դիտարկվող փոխազդեցությունների նման բարձր ազատ էներգիաների արժեքները:

ԳԼՈՒԽ 4. ՄՍՍՑՎԱՍԾ ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐԻ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄ

Ցիկլոբութանի և ցիկլոպրոպանի ածանցյալները հայտնի են որպես ուժեղ ներվային ազդեցության դեղեր: Մասնավորապես, իրենց ուժեղ հակացնցումային ակտիվության և տեռատոզեն չլինելու շնորհիվ, α -F-TMCD և α -Cl-TMCD ցիկլոպրոպանները հեռանկարային են որպես հակաէպիլեպտիկ դեղամիջոցներ և ներվային համակարգի դեղեր [Pessah et al., 2010]: Ցիկլոբութանային կառույց պարունակող AP5-ը ուժեղ ֆիզիոլոգիական ակտիվություն է ցուցաբերում մկների հիպոկամպում [Peterson et al., 1992]:

Մեծ հետաքրքրություն է ներկայացնում ցիկլոբութանային և ցիկլոպրոպանային միացությունների կենսաբանական ակտիվությունների հետազոտումը ինչպես ռեալ իոնական անցուղիների հետ փոխազդեցություններում, այնպես էլ հայտնի թիրախներին հետ վիրտուալ փորձում:

Աշխատանքի առաջին մասում փորձ է արվել Տիենի և նրա աշխատակիցների կողմից մետաղի վրա պահվող ԵԼԹ-ների համար մշակված ցիկլիկ վոլտամպերմետրիայի մեթոդաբանությունը (CVA) [Asaka et al., 1999] կիրառել հարթ ԵԼԹ-ների և վերակառուցված նատրիումական անցուղիներով հարթ ԵԼԹ-ների նկատմամբ և այդ գործիքակազմով ուսումնասիրել միջատների լարմամբ բացվող Na-ական անցուղիների հետ նոր սինթեզված և հայտնի ցիկլոբութանային ու ցիկլոպրոպանային հիմքով միացությունների փոխազդեցությունները:

Վերաբարտարվել են մետաղի վրա պահվող ԵԼԹ-ների համար Տիենի և համահեղինակների ստացած արդյունքները: Այդ նպատակով օգտագործվել է տավարի ուղեղից Ֆուլչի մեթոդով անջատված լիպիդների խառնուրդը: Մետաղի վրա պահվող ԵԼԹ-ի ստացման, կայունության ստուգման և լիպիդային երկշերտում վերակառուցված թաղանթային սպիտակուցների ներառման ստացված արդյունքները վկայում են մ-ԵԼԹ-ի, վերակառուցված անցուղիներով մ-ԵԼԹ-ի և հարթ ԵԼԹ-ի առաջացման, բարձր կայունության և բնորոշ էլեկտրական պարամետրերի մասին:

ԵԼԹ-ում վերակառուցված իոնական անցուղիների օգնությամբ ցիկլոբութանային և ցիկլոպրոպանային միջատասպան նյութերի բնութագրմանն ուղղված աշխատանքների հաջորդ էտապում մշակվել է մեթոդաբանություն, որը հնարավորություն է տալիս ազդանյութի կոնցենտրացիայից կախված վերակառուցված անցուղով մոդիֆիկացված ԵԼԹ-ի դիմադրության փոփոխման միջոցով հաշվարկել լիզանդ-մակրոմոլեկուլ կոմպլեքսի դիսոցման հաստատունը:

Դելտամետրինի կամ ցիպերմետրինի կոնցենտրացիայից կախված, մոդելիս գլխակրծքի թաղանթային սպիտակուցներով վերակառուցված ԵԼԹ-ների հաշվարկված դիմադրության փոփոխությունների համընկնումը փորձնական տվյալների հետ վկայում է մեթոդի աշխատունակ լինելու մասին: Ազդանյութի հագեցնող կոնցենտրացիայի դեպքում դիտվող մոտ 20 % հաղորդականության աճը համընկնում է այլ հայտնի հետազոտվող բնական օբյեկտների ինտեգրալային ազդանշանների ցուցաբերած համանման վարքի հետ [Spencer et al., 2001]:

Պիրետրոիդային ինսեկտիցիդ – ԵԼԹ-ում վերակառուցված նատրիումական անցուղի մոդելի համար լիգանդ-մակրոմոլեկուլ փոխազդեցության դիսոցման թվացյալ հաստատունի (K_d) հաշվարկման համար մշակված մեթոդաբանությունը օգտագործվել է նոր սինթեզված և հայտնի ցիկլոբութանային և ցիկլոպրոպանային ինսեկտիցիդների բնութագրման համար: Մտացված արդյունքներից հետևում է, որ նոր սինթեզված ցիկլոբութանային ինսեկտիցիդների համար դիսոցման հաստատունը գտնվում է 4 – 14 մկմոլ/լ տիրույթում, իսկ ցիկլոպրոպանային ինսեկտիցիդների համար՝ 40 – 550 մկմոլ/լ տիրույթում:

Համեմատության համար ողնաշարավորների DRG նեյրոնների լարմամբ բացվող նատրիումական անցուղիների դեպքում դելտամետրինի համար համանման պարամետրը գտնվում է 0,37 – 0,53 մկմոլ/լ տիրույթում [Tabarean and Narahashi, 1998]: *Drosophila melanogaster*-ի նորմալ և մուտանտ նատրիումական անցուղիների դեպքում դելտամետրինի դիսոցման հաստատունը գտնվում է 5 նմոլ/լ-ից 1 մմոլ/լ տիրույթում, իսկ պերմետրինի դիսոցման հաստատունը՝ 10 մկմոլ/լ-ից 10 մմոլ/լ տիրույթում [Vais et al., 2003.]: Խավարասերների նորմալ և մուտանտ նատրիումական անցուղիների դեպքում 1-S-ցիս-պերմետրինի դիսոցման հաստատունը գտնվում է 1,2 մկմոլ/լ-ից 53 մկմոլ/լ տիրույթում [Tan et al., 2005.]:

Մեր մոդելում հետազոտված պիրետրոիդների և ցիկլոբութանների K_d -ի արժեքները կարող են բնականից բարձր լինել կապված մորեխի չմաքրված թաղանթային սպիտակուցների պրեպարատների կիրառման և ԵԼԹ-ում վերակառուցման ընթացքում անցուղու անդամների մոդիֆիկացման հետ:

Այսպիսով, ստեղծվել է նոր մեթոդաբանություն երկշերտ լիպիդային թաղանթներում վերակառուցված մորեխի լարմամբ բացվող նատրիումական անցուղիների մոդելի օգնությամբ հայտնի և նոր ստեղծված ցիկլոբութանային և ցիկլոպրոպանային ինսեկտիցիդների ակտիվությունների գնահատման համար: Տվյալ դեպքում վերակառուցված իոնական անցուղիներ պարունակող լիպիդային երկշերտի CVA-էքսպերիմենտի ինտեգրալ բնութագրիչներից կիրառվել է միայն դիմադրությունը և ստեղծված մեթոդաբանությունը հիմնված է ազդանյութի կոնցենտրացիայից կախված ԵԼԹ-ի դիմադրության փոփոխության վրա: Մյուս ինտեգրալ բնութագրիչի՝ թաղանթի ունակության կիրառման հեռանկարները դեռևս սպասում են իրենց բացահայտմանը:

Աշխատանքի երկրորդ մասում AutoDock Vina ծրագրի կիրառմամբ կատարվել է կաթնասունների NMDA և լարմամբ բացվող բակտերիալ նատրիումական անցուղիների նկատմամբ հայտնի և նոր ստեղծված ցիկլոբութանային և ցիկլոպրոպանային ինսեկտիցիդների խնամակցությունների գնահատումը:

Հաշվարկվել և մեկնաբանվել են *Rattus norvegicus*-ի N-մեթիլ-D-ասպարտատային ռեցեպտորի և *Arcobacter butzleri*-ի լարմամբ բացվող նատրիումական անցուղու հետ փոխազդեցություններում ցիկլոբութանային և ցիկլոպրոպանային միացությունների ստերեոիզոմերների ցուցաբերած դիսոցման հաստատունները, իսկ առավել ակտիվ մեկ ցիկլոբութանային և երկու ցիկլոպրոպանային միացությունների դոքինգի արդյունքները մեկնաբանվել են մանրամասնորեն:

Rattus norvegicus-ի NMDA ռեցեպտորի հետ ուժեղ փոխազդեցություն ցուցաբերող ազդանյութերի փոխազդեցություն տեղամասերի մանրամասն հետազոտությունը ցույց է տվել, որ բոլոր դիտարկված 9 ազդանյութերը փոխազդում են NMDA ռեցեպտորի Glu¹³³-ի հետ, ինչը վկայում է բոլոր փոխազդեցությունների ռեցեպտորի մոտավորապես նույն կետում տեղի ունենալու մասին: Մյուս կողմից էլ, եթե բոլոր դիտարկված

ցիկլոբուրանները փոխազդում են NMDA ռեցեպտորի Arg²⁴⁷ և Glu²⁷⁶ ամինաթթվային մնացորդների հետ, ապա ցիկլոպրոպանները փոխազդում են NMDA ռեցեպտորի Val¹²⁹, Val¹³², Ser²⁴⁸ և Leu²⁶⁴ ամինաթթվային մնացորդների հետ, իսկ պերմետրինի իզոմերները նաև Pro¹³⁰, Tyr¹⁴³, Val²⁶⁷ ամինաթթվային մնացորդների հետ: Վերջապես, ազդանյութերի առանձին ստերեոիզոմերներ և ստերեոիզոմերների խմբեր ընդհանուրից զատ ցուցաբերում են նաև սպեցիֆիկ փոխազդեցություններ:

Arcobacter butzleri-ի լարմամբ բացվող նատրիումական անցուղու հետ ազդանյութերի փոխազդեցություն տեղամասերի ուսումնասիրությունը ցույց է տվել, որ բոլոր դիտարկված 9 ազդանյութերը փոխազդում են բակտերիայի լարմամբ բացվող նատրիումական անցուղու Phe¹¹⁰⁷ և Val¹¹²⁰ ամինաթթվային մնացորդների հետ: Եթե դիտարկված ցիկլոբուրանները նատրիումական անցուղու հետ ընդհանուր կետում չեն փոխազդում, ապա ցիկլոպրոպանները փոխազդում են NMDA ռեցեպտորի Pro¹⁰⁷⁵, Leu¹¹²³ և Leu²¹³⁶ ամինաթթվային մնացորդների հետ, իսկ պերմետրինի իզոմերները նաև Val¹¹¹⁰, Leu²²⁰⁴ ամինաթթվային մնացորդների հետ:

Աղյուսակ 6

Նատրիումական անցուղիների հետ նոր սինթեզված և հայտնի ցիկլոպրոպանային միացությունների առաջացրած ջրածնական կապերը

Միացություններ	Նատրիումական անցուղիներ	
	2A5T	3RW0
(1R,3R)-Ղեյտամետրին	B:Glu133:HN1	–
(1R,3R)-Ցիպերմետրին	–	–
(1R,3R)-Վերմետրին	–	–
(1R,3S)-Վերմետրին	–	–
(1S,3R)-Վերմետրին	–	–
(1S,3S)-Վերմետրին	–	–
(1R,3R)-Պերմետրին	–	–
(1R,3S)-Պերմետրին	–	–
(1S,3R)-Պերմետրին	–	–
(1S,3S)-Պերմետրին	–	–
(1R,3R)-Վերմետրինաթթու	A:Tyr143:HN1 B:Thr242:HG1 1	A:Arg1108:HH11 1 A:Arg1108:HH21 1
(1R,3S)-Վերմետրինաթթու	–	–
(1S,3R)-Վերմետրինաթթու	–	–
(1S,3S)-Վերմետրինաթթու	A:Gly249:HN1	–
(1R,3R)-Պերմետրինաթթու	A:Lys139:HZ2 1 A:Ser265:HG1	A:Thr1111:HG1 1
(1R,3S)-Պերմետրինաթթու	–	A:Arg1108:HH11 1
(1S,3R)-Պերմետրինաթթու	B:Ala241:HN1 B:Thr242:HN1	A:Arg1108:HH11 1 A:Arg1108:HH21 1
(1S,3S)-Պերմետրինաթթու	A:His272:HD1 1 B:Thr242:HN1	–

Վերջապես, ազդանյութերի առանձին ստերեոիզոմերներ և ստերեոիզոմերների խմբեր ընդհանուրից գատ ցուցաբերում են նաև սպեցիֆիկ փոխազդեցություններ:

Հետազոտվել է դոքինգի փորձերում դիտարկված միացությունների առաջացրած ջրածնական կապերը մակրոմոլեկուլների ամինաթթվային մնացորդների հետ:

Ցիկլոբութանների դեպքում հետազոտությունները ցույց են տվել, որ 2A5T անցուղու B-շղթայի Glu¹³³-ի ամինախմբի ջրածնի հետ ջրածնական կապեր են առաջացնում ցիկլոբութինի և CB-թթվի միևնույն (*1S,3R,4R*) իզոմերները, իսկ 3RWO անցուղու A-շղթայի Arg¹¹⁰⁸-ի գուանիդինային խմբի ջրածնի հետ ջրածնական կապեր է առաջացնում (*1R,3R,4R*)-CB-թթուն:

Անցուղիների հետ ցիկլոպրոպանների առաջացրած ջրածնական կապերը ներկայացված են աղյուսակ 6-ում: Ինչպես երևում է ներկայացված արդյունքներից, դելտամետրինը ջրածնական կապեր է առաջացնում միայն 2A5T անցուղու B-շղթայի Glu¹³³-ի ամինախմբի ջրածնի հետ, ցիպերմետրինը, Cl-պերմետրինները և պերմետրինները դիտարկված ռեցեպտորներից ոչ մեկի հետ ջրածնական կապեր չեն առաջացնում: Cl-Պերմետրինաթթուները և պերմետրինաթթուները, չնայած իրենց փոխազդեցության ցածր էներգիային, բազմաթիվ, հաճախ կրկնակի ջրածնական կապեր չեն առաջացնում 2A5T և 3RWO ռեցեպտորների ամինաթթվային մնացորդների հետ, ինչը մանրամասնորեն նկարագրված է աղյուսակում:

Ընդհանրացնելով վերը շարադրված արդյունքները, կարելի է պնդել, որ հետազոտված լիգանդ-մակրոմոլեկուլ փոխազդեցություններում կապի էներգիայի մեծությունը պայմանավորված է ոչ թե համեմատաբար ուժեղ ջրածնական կապերի առկայությամբ, այլ մակրոմոլեկուլի 9-11 ամինաթթվային մնացորդների հետ լիգանդի ավելի թույլ, հիդրոֆոր և այլ փոխազդեցությունների առկայությամբ:

Այսպիսով *Vina* ծրագրով դոքինգը հնարավորություն է տալիս գնահատել հայտնի թիրախի հետ նպատակային նյութերի փոխազդեցության Գիբսի ազատ էներգիան, ճշգրիտ տարածական տեղը, միջմոլեկուլային կապերի բնույթը, և այլն, անկախ տվյալ լիգանդի ռեալ ֆիզիկական գոյությունից (կամ սինթեզված լինելու փաստից): Մեթոդը, իրոք, կարող է օգտագործվել տարբեր բնագավառներին վերաբերող նյութերի և մակրոմոլեկուլների SAR-տվյալների ինֆորմատիվ բազաների կառուցման համար:

Ֆիզիկական և վիրտուալ փորձերում հետազոտվող միացությունների ակտիվությունների համեմատումը ցույց է տալիս, որ, եթե մորելիս գլխակրծքի թաղանթային սպիտակուցներով մոդիֆիկացված ԵԼԹ-ներով տարվող CVA փորձում ցիկլոբութանային միացությունների դիսոցման թվացյալ հաստատունները մեկ կարգով փոքր են ցիկլոպրոպանային բնույթի միացությունների դիսոցման հաստատուններից, ապա *Rattus norvegicus*-ի N-մեթիլ-D-ասպարտատային ռեցեպտորի և *Arcobacter butzleri*-ի լարմամբ բացվող նատրիումական անցուղու հետ դոքինգի դեպքում այդ միացությունների ստերեոիզոմերների դիսոցման հաստատունները բազային ցիկլոպրոպանների ածանցյալների դեպքում մեկ-երկու կարգով մեծ են ցիկլոբութանների ածանցյալների դիսոցման հաստատուններից: Այս թվացյալ հակասությունը մենք բացատրում ենք ֆիզիկական և վիրտուալ փորձերում կիրառված մոդելների սկզբունքային տարբերությամբ: Եթե CVA փորձում կիրառվել է միջատի լարմամբ բացվող նատրիումական անցուղին, ապա մոլեկուլային դոքինգի դեպքում կիրառվել են կաթնասունի NMDA ռեցեպտորի և բակտերիայի լարմամբ բացվող նատրիումական անցուղու մոդելները: Ի դեպ, միևնույն

միացությունների ստերեոիզոմերների մակրոմոլեկուլի հետ փոխազդեցության էական տարբերություններ են դիտվում նաև նշված տարբեր մոդելների հետ դոքսինգի փորձում:

Մորեխի գլխակրծքի թաղանթային սպիտակուցներով մոդիֆիկացված ԵԼԹ-ներով CVA փորձում ստացված արդյունքները թույլ են տալիս պնդել, որ նոր սինթեզված ցիկլոբութանային միացությունները 1 կկալ/մոլ-ով ավելի մեծ ազատ էներգիայով են կպնում նպատակային թիրախներին, քան ցիկլոպրոպանային բնույթի միացությունները: Այս արդյունքները կարող են լավ նախադրյալ հանդիսանալ նախկինում լավ հայտնի ցիկլոպրոպանային հիմքով ինսեկտիցիդներից, որոնք պիրետրոինոլային տիպի ինսեկտիցիդների դասն են ներկայացնում, աստիճանաբար ցիկլոբութանային հիմքով ինսեկտիցիդներին անցնելու համար: Ներկայումս մեր տրամադրության տակ առկա են տվյալներ դրանց ուժեղ միջատասպան հատկությունների վերաբերյալ, սակայն անհրաժեշտ են ծավալուն և համակարգված աշխատանքներ այս հարցի վերջնական պատասխանը ստանալու համար:

Այսպիսով հայտնի իոնական անցուղիների հետ դոքսինգ անալիզի վիրտուալ համակարգերում պոտենցիալ դեղաձևերի հաշվարկված ակտիվությունների և ԵԼԹ-ներում վերակառուցված միջատի իոնական անցուղիների հետ փոխազդեցության վրա հիմնված ֆիզիկական մոդելային համակարգերում ստացված տվյալների համադրումը թույլ է տալիս կատարել այդ նյութերի նախնական սկրինինգը և ուղղորդել առավել ակտիվ և անվտանգ դեղաձևերի ստացման աշխատանքները:

ԵԶՐԱԿԱՅՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. Ցլի ուղեղից անջատված լիպիդների ընդհանուր ֆրակցիայի հիման վրա հաջողվել է ստանալ կայուն, մետաղի վրա պահվող և հարթ ԵԼԹ-ներ, որոնց բնութագրման համար կիրառվել է ցիկլիկ վոլտամպերմետրիայի գործիքային բազան: Երկու տիպի ԵԼԹ-ները բնութագրվել են գեգաօհմային կարգի դիմադրություններով;
2. Մետաղի վրա պահվող և հարթ ԵԼԹ-ներում վերակառուցվել են իոնական անցուղիներ: Ցույց է տրվել, որ ԵԼԹ-ներում թաղանթային սպիտակուցների վերակառուցման արդյունքում ունակությունը մեծանում է, իսկ դիմադրությունը փոքրանում մինչև երկու կարգով;
3. Ստեղծվել է նոր մեթոդ մորեխի գլխակրծքից անջատված, վերակառուցված նատրիումական անցուղիներ պարունակող հարթ ԵԼԹ-ների էլեկտրաքիմիական ինտեգրալ բնութագրիչներից դիմադրության չափման միջոցով համապատասխան մոդուլյատորների անցուղու հետ փոխազդեցության դիսոցման հաստատունների հաշվարկման համար;
4. ԵԼԹ-ներում վերակառուցված մորեխի նատրիումական անցուղիների հետ փոխազդեցության դիսոցման հաստատունների միջոցով համեմատվել են մի քանի հայտնի և նոր սինթեզված ցիկլոպրոպանային և ցիկլոբութանային հիմքով միջատասպան նյութեր;
5. Ցույց է տրվել, որ ցիկլոբութանային հիմքով միջատասպան նյութերը մոտ մեկ կարգով ավելի մեծ խնամակցություն են ցուցաբերում մորեխի նատրիումական անցուղիների նկատմամբ, համեմատած ցիկլոպրոպանային հիմքով միջատա-

սպան նյութերի հետ: Թե՛ ցիկլոբութանային, և թե՛ ցիկլոպրոպանային թթուների ածանցյալները անցուղիների նկատմամբ ավելի բարձր խնամակցություն են ցուցաբերում համապատասխան թթուների համեմատ: Ընդ որում առաջին անգամ մեզանում սինթեզված Cl-պերմետրինաթթուն 5 անգամ ավելի ակտիվ է պերմետրինաթթվից:

6. NMDA ռեցեպտորի (pdb 3A5T) և լարմամբ բացվող բակտերիալ նատրիումական անցուղիների (pdb 3RW0) հետ AutoDock Vina ծրագրի կիրառմամբ նոր սինթեզված ցիկլոբութանային հիմքով միջատասպան նյութերի ստերեոիզոմերների փոխազդեցության ուսումնասիրությունը ցույց է տվել, որ ցիկլոբութանային թթվի բոլոր ածանցյալները նատրիումական անցուղիների հետ փոխազդեցություններում ուժեղ են թթուները: Դոքինգի փորձում բոլոր երեք ցիկլոբութանային միացությունների ստերեոիզոմերները մոտ մեկ կարգով ավելի բարձր խնամակցությամբ են փոխազդում *Arcobacter butzleri*-ի լարմամբ բացվող նատրիումական անցուղու հետ, *Rattus norvegicus*-ի N-մեթիլ-D-ասպարտատային ռեցեպտորի համեմատ:
7. Հետազոտված ցիկլոպրոպանային միացությունների ստերեոիզոմերները դիտարկված երկու տարբեր նատրիումական անցուղիների հետ փոխազդեցություններում նման խնամակցություն են ցուցաբերում, ինչպես և ցիկլոբութանների դեպքում էր: Այստեղ կապի էներգիայի մաքսիմալ տարբերությունները միևնույն միացության ստերեոիզոմերների միջև միևնույն ակցեպտորի հետ չի գերազանցում 0,8 կկալ/մոլ արժեքը: Սինթեզված Cl-պերմետրինաթթվի ստերեոիզոմերները փոխազդեցություններում նույն կարգի ազատ էներգիա են ցուցաբերում, ինչ հայտնի պերմետրինաթթվի ստերեոիզոմերները:
8. ԵԼԹ-ներում վերակառուցված միջատի իոնական անցուղիների հետ փոխազդեցության վրա հիմնված ֆիզիկական մոդելային համակարգերում և հայտնի իոնական անցուղիների հետ դոքինգ անալիզի վիրտուալ համակարգերում պոտենցիալ դեղաձևերի ակտիվությունների համադրումը թույլ է տալիս կատարել այդ նյութերի նախնական սկրինինգը:

Ատենախոսության հիմնական արդյունքները տպագրված են հետևյալ աշխատանքներում.

1. **Vardanyan A.**, Harutyunyan Sh., Sahakyan A., Mikaelyan A., Hambardzumyan A., *Study of the neuro-modulating activity of some derivatives of cyclopropane- and cyclobutanecarbonic acids by computer modeling* // International symposium. Brain immune system: Neurochemical and neuroendocrine aspects, dedicated to the 80th anniversary of Academician Armen A. Galoyan. Abstracts, Yerevan, October 6-8, p. 69, 2009.
2. **Vardanyan A.**, Sahakyan A., Hambardzumyan A., Martirosyan S., Mikaelyan A., *Application possibilities of bilayer lipid membranes supported on metal or the salt bridge for reconstruction of ionic channels* // International symposium. Brain immune system: Neurochemical and neuroendocrine aspects, dedicated to the 80th anniversary of Academician Armen A. Galoyan. Abstracts, Yerevan, October 6-8, p. 97, 2009.

3. **Vardanyan A.**, Grigoryan A., Mikaelyan A., Karapetyan S., Melikyan T., Sargsyan V., Nikoghosyan L., Hambardzumyan A., Torosyan G., *Synthesis of neuroprotective drugs and quantitative assessment of their activity by computed modeling* // The new Armenian medical journal. Abstracts, vol.4, № 1, p. 51-52, 2010.
4. **Vardanyan A.**, Sahakyan A., Hambardzumyan A., Mikaelyan A., Martirosyan S., *The possibility of reconstruction of brain ionic channels in s-BLM* // The new Armenian medical journal. Abstracts, vol.4, № 1, p.140-141, 2010.
5. **Vardanyan A.**, *The possibility of reconstruction of locust Na⁺-channels in planar bilayer lipid membranes* // Biological journal of Armenia, vol. 62, suppl. 1, p. 117-119, 2010.
6. **Vardanyan A. S.**, Mikaelyan A. R., Sargsyan V. A., Hambardzumyan A. A., *Characterization of pyrethroid – insect ion channel interactions via cyclic voltammetric technique* // Biological journal of Armenia, vol. 64, № 3, p. 76-82, 2012.
7. **Vardanyan A. S.**, Mikaelyan A. R., Torosyan G. G., Grigoryan A. M., Hambardzumyan A. A., *Characterization of pyrethroid – ion channel interactions via cyclic voltammetric technique, and docing analysis* // Proceedings of international young scientists conference "Perspectives for development of molecular and cellular biology-III", September 26-29, Yerevan, p. 210-213, 2012.

Варданян Армен Симонович

ОЦЕНКА СТРУКТУРА-АКТИВНОСТЬ ЗАВИСИМОСТИ НОВЫХ ЦИКЛОПРОПАН- И ЦИКЛОБУТАНСОДЕРЖАЩИХ ИНСЕКТИЦИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ МОДЕЛЕЙ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ

РЕЗЮМЕ

Ключевые слова: Бислойные липидные мембраны, натриевые каналы, реконструирование, циклическая вольтамперметрия, константа диссоциации, автодок Vina, докинг анализ, циклопропановые инсектициды, циклобутановые инсектициды.

Широкое применение современным обществом инсектицидов и лекарственных средств привело к генетическим изменениям сопротивления организмов-мишеней. Это представляет большую опасность с точки зрения борьбы с инфекционными заболеваниями и сельскохозяйственными вредителями. Обнаружение, синтез и характеристика новых биоологически активных соединений являются важнейшими задачами современной биотехнологии. К классу таких соединений относятся также вновь синтезированные, владеющие инсектицидными и другими биологическими активностями, соединения – производные циклопропана и циклобутана, характеристике которых посвящена данная работа.

Для изучения взаимодействия вновь синтезированных и известных инсектицидных соединений с циклобутановыми и циклопропановыми основами с открываемыми напряжением натриевыми каналами была проделана попытка использовать разработанную Тиеном и сотрудниками методологию для поддерживаемых на металле бислойных липидных мембран (БЛМ) по отношению к планарным БЛМ и планарным БЛМ с реконструированными натриевыми каналами.

Было показано, что полученная на основе общей липидной фракции, выделенной из мозга быка хлороформ-метаноловым методом Фолча, поддерживаемая на металле БЛМ (м-БЛМ) показывает свойственные для БЛМ электрические параметры – $C=4,5 \times 10^{-9}$ Ф емкости и $R=1,3 \times 10^9$ Ом сопротивления в 0,1 М растворе NaCl. Более того, после электрического разряда в цикле циклической вольтамперметрии (CVA) в интервале напряжения $\pm 0,8$ В мембрана быстро восстанавливается и в CVA цикле в интервале напряжения $\pm 0,2$ В показывает совпадающую с прежним петлю гистерезиса. При выдерживании полученной м-БЛМ в течении 1-2 мин в растворе мембранных белков выделенных из мозга быка емкость мембраны в 0,1 М растворе NaCl увеличивается в 20 раз, а сопротивление уменьшается почти столько же раз, составляя $C=8,4 \times 10^{-8}$ Ф и $R=7,3 \times 10^7$ Ом, соответственно. Это свидетельствует о реконструировании натриевых каналов в исследуемом БЛМ.

Аналогичным образом, в результате включения реконструированных мембранных белков кузнечика емкость планарной БЛМ, полученной на основе тех же липидов, увеличивается в 77 раз, а сопротивление уменьшается в 81 раз.

Создана новая методология для оценки констант диссоциации известных и вновь созданных циклобутановых и циклопропановых инсектицидов при помощи модели реконструированных в планарной БЛМ открывающихся напряжением натриевых каналов кузнечика. Константы диссоциации для семи изученных соединений, в примененной модели, находились в диапазоне концентраций 4 – 550 мкМ, причем константы диссоциации циклобутановых соединений на порядок превосходили константы диссоциации циклопропановых соединений.

С целью оценки активностей вновь синтезированных инсектицидов на основе циклобутановых и циклопропановых соединений при помощи программы AutoDock Vina проводились докинг эксперименты с N-метил-D-аспаратным NMDAR2A рецептором *Rattus norvegicus* (pdb 2A5T) и открывающихся напряжением натриевым каналом *Arcobacter butzleri* (pdb 3RW0).

Все производные циклобутановой кислоты в докинг экспериментах оказались сильнее СВ-кислот. В частности, константы диссоциации циклобутинов на два порядка, а константы диссоциации СВ-пиперидинамидов на порядок ниже по сравнению с константами диссоциации СВ-кислот в докинг экспериментах как с NMDA рецептором, так и с открывающемся напряжением бактериальным натриевым каналом. Необходимо отметить также, что в докинг экспериментах стереоизомеры всех трех циклобутановых соединений взаимодействуют с на порядок высшей афинностью с открывающимся напряжением натриевым каналом *Arcobacter butzleri* по сравнению с N-метил-D-аспаратным рецептором *Rattus norvegicus*. В докинг экспериментах, в отличие от циклобутановых соединений, все стереоизомеры циклопропановых соединений проявляют похожие уровни свободной энергии при взаимодействиях с обоими рассмотренными рецепторами. Одновременно, в случае циклопропановых соединений, в докинг экспериментах с NMDA рецептором и с бактериальным открывающемся напряжением натриевым каналом различие между константами диссоциации между базовыми действующими агентами и их производными доходит до трех порядков.

Детально изучалось характер докинга наиболее сильно взаимодействующих с натриевыми каналами соединений – (1*S*,3*S*,4*S*)-циклобутина, (1*R*,3*R*)-делтаметрина и (1*S*,3*S*)-перметрина и было показано, что эти соединения связываются с NMDA рецептором *Rattus norvegicus* возле Glu¹³³, а с натриевым каналом *Arcobacter butzleri* возле аминокислотных остатков Phe¹¹⁰⁷ и Val¹¹²⁰, причем в обоих случаях в пазе, который в тетрамерной молекуле ионного канала будет частью щели.

Было показано также, что все 30 исследованные стереоизомеры действующих агентов взаимодействуют с обоими рецепторами в 9-11 точках, в основном гидрофобными связями, а присутствующие малочисленные водородные связи не вносят значительного вклада.

Результаты полученные в CVA эксперименте с БЛМ модифицированными мембранными белками из головогруды кузнечика позволяют утверждать, что вновь синтезированные циклобутановые соединения связываются с целевыми мишенями со свободной энергией на 1 ккал/моль большей по сравнению с циклопропановыми соединениями. Эти результаты могут служить хорошей предпосылкой для постепенного перехода от хорошо известных инсектицидов на циклопропановой основе, представляющих класс пиретроидных инсектицидов, к инсектицидам на циклобутановой основе.

Таким образом, сопоставление рассчитанных в виртуальных системах докинг анализа, с известными ионными каналами, активностей потенциальных лекарственных форм и данных полученных в физических модельных системах основанных на взаимодействии с реконструированными в БЛМ ионными каналами насекомых позволяет делать первичный скрининг этих соединений и направлять работы по получению активных и безопасных лекарственных форм.

Vardanyan Armen

ESTIMATION OF STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS OF NEW CYCLOPROPANE AND CYCLOBUTANE CONTAINING INSECTICIDE COMPOUNDS USING THE MODELS OF SODIUM CHANNELS

SUMMARY

Keywords: Bilayer lipid membrane, sodium channel, reconstruction, cyclic voltampermetry, dissociation constant, AutoDock Vina, docking analysis, cyclopropane insecticide, cyclobutane insecticide.

The widespread use of insecticides and drugs by modern society led to genetic changes in the resistance of target organisms. This represents a great danger to the fight against infectious diseases and pests. The discovery, synthesis and characterization of novel biologically active compounds are critical challenges of modern biotechnology. To the such class of compounds are also belonging newly synthesized, possessing insecticidal and other biological activity, compounds - derivatives of cyclopropane and cyclobutane, to characterization of which is dedicated this work.

To study the interaction of newly synthesized and known insecticidal compounds with cyclobutane and cyclopropane basics with voltage gated sodium channels the attempt has been

done to use the developed by Tien and collaborators methodology for the metal supported bilayer lipid membranes (BLM) with respect to the planar BLM and a planar BLM with reconstructed sodium channels.

It was shown that the obtained on the base of total lipid fraction, extracted from bovine brain by Folch methanole-chloroform method, the metal supported BLM (m-BLM) shows characteristic electrical parameters for the BLM - $C = 4,5 \times 10^{-9}$ F capacitance and $R = 1,3 \times 10^9$ ohm resistance in 0.1M NaCl. Moreover, after the electric discharge in the cycle of the cyclic voltammetry (CVA) in the voltage range of ± 0.8 V the membrane quickly recovers and shows the same hysteresis loop in CVA cycle with the voltage range of ± 0.2 V. Upon standing the resulting m-BLM for 1-2 minutes in a solution of membrane proteins extracted from bovine brain membrane capacitance in 0.1M NaCl increases to 20 times, and resistance decreases almost the same time, accounting for $C = 8,4 \times 10^{-8}$ F and $R = 7,3 \times 10^7$ ohms, respectively. This indicates reconstructing the sodium channels in studied BLM.

Similarly, in the result of inclusion of reconstituted Grasshopper membrane proteins the capacitance of planar BLM, obtained using the same lipid, is increased 77 times, and resistance decreases 81 times.

A new methodology for evaluation of the dissociation constants of known and newly created cyclobutane and cyclopropane insecticides using a model of the reconstructed in a planar bilayer lipid membrane grasshopper voltage-gated sodium channels was developed. The dissociation constants for the seven compounds studied, in the applied model, were in the range of concentrations 4 - 550 μ M, at that, dissociation constants of the cyclobutane compounds were in the order of magnitude lower from the dissociation constants of cyclopropane compounds.

To assess the activity of newly synthesized insecticides on the base of cyclobutane and cyclopropane compounds docking experiments were conducted, using program AutoDock Vina, with N-methyl-D-aspartate receptor NMDAR2A of *Rattus norvegicus* (pdb 2A5T) and voltage-gated sodium channel of *Arcobacter butzleri* (pdb 3RW0).

All derivatives of cyclobutane acid were stronger from CB-acids in docking experiments. Specifically, dissociation constants of cyclobutines were on two orders, and the dissociation constants of CB-piperidineamides – on order of magnitude lower, than dissociation constants of CB-acids in the docking experiments with both NMDA receptor and a bacterial sodium channel. It should be noted also that in the docking experiments, the stereoisomers of all three cyclobutane compounds interact with one order of magnitude higher affinity with voltage-gated sodium channel of *Arcobacter butzleri* compared to N-methyl-D-aspartate receptor of *Rattus norvegicus*. In the docking experiments, unlike the cyclobutane compounds, all stereoisomers of cyclopropane compounds exhibit similar levels of free energy in interactions with both receptors. Simultaneously, in the case of cyclopropane compounds, in docking experiments with NMDA receptor and bacterial voltage-gated sodium channel, the difference between the dissociation constants of stereoisomers of basic acting agents and their derivatives comes up to three orders of magnitude.

The mode of action of most strongly interacting with sodium channels compounds – (*1S*, *3S*, *4S*)-cyclobutine, (*1R*, *3R*)-deltamethrin and (*1S*, *3S*)-permethrin was studied in detail, and it was shown that these compounds bind to the NMDA receptor of *Rattus norvegicus* near Glu¹³³,

and the sodium channel of *Arcobacter butzleri* near amino acid residues Phe¹¹⁰⁷ and Val¹¹²⁰, and in both cases in the groove, which in a tetrameric molecule of ion channel will be part of the gap.

It was also shown that the 30 investigated stereoisomers of acting agents interact with both receptors at 9-11 points, mostly by hydrophobic bonds and hydrogen bonds present in minorities do not contribute significantly.

The results obtained in the CVA experiment with the BLM modified by membrane proteins of the cephalothorax of grasshopper suggest that the newly synthesized cyclobutane compounds bind with target-macromolecules with a free energy of 1 kcal/mol higher than the cyclopropane compounds did. These results may serve as a good basis for a gradual transition from the well-known insecticides on the cyclopropane basis, representing a class of pyrethroid insecticides, to the insecticides on the cyclobutane basis.

Thus, a comparison of the activities of potential drug formulations, calculated in virtual systems of docking analysis with certain ion channels, and the data obtained in the physical model systems based on interaction of same compounds with the in the BLM reconstructed insects ion channels, allows primary screening of these compounds and to guide work on the production of active and safe drug forms.

