

ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
YEREVAN STATE UNIVERSITY

СТУДЕНЧЕСКОЕ НАУЧНОЕ ОБЩЕСТВО
STUDENT SCIENTIFIC SOCIETY

ISSN 1829-4367

СБОРНИК НАУЧНЫХ СТАТЕЙ СНО ЕГУ

COLLECTION OF SCIENTIFIC ARTICLES OF YSU SSS

1.1 (24)

Естественные и физико-математические науки

(География и геология, информатика и прикладная математика, биология,
математика и механика, химия, фармацевтика, физика)

Natural and Physical-Mathematical Sciences

(Geography and Geology, Informatics and Applied Mathematics, Biology,
Mathematics and Mechanics, Chemistry, Pharmacy, Physics)

ЕРЕВАН - YEREVAN
ИЗДАТЕЛЬСТВО ЕГУ - YSU PRESS
2018

ԵՊՀ ՈՒԳԸ ԳԻՏԱԿԱՆ ՀՈԴՎԱԾՆԵՐԻ ԺՈՂՈՎԱԾՈՒ

1.1 (24)

Բնական և ֆիզիկամաթեմատիկական գիտություններ

(աշխարհագրություն և երկրաբանություն, ինֆորմատիկա և կիրառական
մաթեմատիկա, կենսաբանություն, մաթեմատիկա և մեխանիկա,
քիմիա, ֆարմացիա, ֆիզիկա)

Հրատարակվում է ԵՊՀ գիտական խորհրդի որոշմամբ
Издаётся по решению Ученого совета ЕГУ
Published by the resolution of the Academic Council of YSU

Խմբագրական խորհուրդ՝

ա.գ.դ., պրոֆ. Թ. Վարդանյան
կ.գ.դ., պրոֆ. Լ. Նավասարդյան
ք.գ.դ., պրոֆ. Ն. Դուրգարյան
ա.գ.թ., դոց. Ս. Սուվարյան
ա.գ.թ., դոց. Գ. Ալեքսանյան
ա.գ.թ., դոց. Ա. Պոտոսյան
ե.գ.թ., դոց. Մ. Գրիգորյան
ե.գ.թ., դոց. Ռ. Մովսեսյան
կ.գ.թ., դոց. Հ. Փանոսյան
ք.գ.թ., դոց. Ի. Ալեքսանյան
ք.գ.թ., դոց. Ա. Մարտիրյան
կ.գ.թ. Ն. Ավթանդիլյան
ֆ.մ.գ.թ. Պ. Պետրոսյան

Редакционная коллегия:

д.г.н., проф. Т. Ваданян
д.б.н., проф. Л. Навасардян
д.х.н., проф. Н. Дургарян
к.г.н., доц. С. Суварян
к.г.н., доц. Г. Алексанян
к.г.н., доц. А. Потосян
к.г.н., доц. М. Григорян
к.г.н., доц. Р. Мовсесян
к.б.н., доц. О. Паносян
к.х.н., доц. И. Алексанян
к.х.н., доц. А. Мартирян
к.б.н. Н. Автандилян
к.ф.м.н. П. Петросян

Editorial Board

DSc, Prof. T. Vardanyan
DSc, Prof. L. Navasardyan
DSc, Prof. N. Durgaryan
PhD, Associate Prof. S. Suvaryan
PhD, Associate Prof. G. Aleksanyan
PhD, Associate Prof. A. Potosyan
PhD, Associate Prof. M. Grigoryan
PhD, Associate Prof. R. Movsesyan
PhD, Associate Prof. H. Panosyan
PhD, Associate Prof. I. Aleksanyan
PhD, Associate Prof. A. Martiryan
PhD N. Avtandilyan
PhD P. Petrosyan

Հրատարակիչ՝ ԵՊՀ հրատարակչություն
Հասցե՝ ՀՀ, ք. Երևան, Ալ. Մանուկյան 1, (+374 10) 55 55 70, publishing@ysu.am

Հրատարակության նախապատրաստող ստորաբաժանում՝ ԵՊՀ ուսանողական գիտական
ընկերություն
Հասցե՝ ՀՀ, ք. Երևան, Ալ. Մանուկյան 1, (+374 60) 71 01 94,
Էլ. փոստ՝ sss@ysu.am
ԵՊՀ ՈՒԳԸ հրատարակումների կայք՝ www.ssspub.y-su.am.

Манукян Амалия

ГОУ ВПО Российско-Армянский Университет, ИМВТ,
кафедра биоинженерии и биоинформатики
Научный руководитель: к.б.н., доц. А. Оганесян
Эл. почта: amalimanukyan95@yandex.ru

ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИОПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ IN SILICO КОНСТРУИРОВАННОГО ЛИГАНДА – ПОДОФИЛЛОТОКСИН-ТИОФЕНА

Онкологические заболевания становятся причиной практически каждой шестой смерти в мире. Около 70 % случаев смертей от рака происходят в странах с низким и средним уровнем жизни. Статистика смертности от онкологических заболеваний показывает, что ежегодно в мире умирает порядка 4.8 млн. мужчин и 3.8 млн. женщин. В январе 2016 года на веб-сайте World Life Expectancy были опубликованы данные о том, что в Армении зафиксированы самые высокие показатели смертности от онкологических заболеваний среди опрошенных 172 стран. Поиск и разработка новых лекарств с широким спектром терапевтического действия из разных источников, в том числе и растительного, с использованием новейших технологий, имеет очень большое значение для практической медицины. В настоящее время в антиопухолевогой терапии рассматриваются соединения растительного происхождения, которые обладают селективными цитотоксическими, цитостатическими и другими свойствами. Тем не менее, существует постоянная потребность в разработке новых противоопухолевых препаратов, комбинаций лекарственных средств и стратегий путем методического и научного исследования огромного количества натуральных препаратов.

Подофиллотоксин (Ртох) и тиофен являются природными соединениями, обладающими широким спектром действия, они широко применяются в народной медицине для профилактики и лечения многих заболеваний. Ртох обычно получают из растений *P.hexandrum* и *P.Peltatum*, однако запасы *Podophyllum* ограничены, а формирование корней, где обычно запасается Ртох, длится больше 5-7 лет [5].

Дополнительными источниками являются растения семейства *Linacea*, рода *Linum* и их каллусные культуры. В армянской флоре встречается несколько разновидностей *Linum*-а, которые могут служить в качестве источников Ртох [2]. Ртох и его производные широко применяются в терапии онкологических заболеваний. Первоначальные надежды на возможную клиническую пригодность Ртох-а в качестве противоопухолевого агента в значительной степени были отменены из-за его побочных эффектов [4], в связи с чем были предприняты обширные структурные модификации Ртох, которые привели к клиническому введению двух полусин-

тетических гликоконъюгатных аналогов этопозиды и тенипозиды, их противоопухолевая активность открыла дверь практически к неограниченному числу производных Ptoх-а с различными модификациями [7, 10].

Тиофен и его производные распространены в живой природе: в некоторых высших растениях, также обладающих широким спектром биологических свойств, таких как антимикробная, противовирусная, инсектицидная и противоопухолевая активность. Также продолжается поиск комбинированных лекарств для терапии опухолей [8, 10]. В фармакологии широко применяются лекарства, содержащие тиофеновый гетероцикл, например Батимастат, который прошел клинические тестирования. Он конкурентный ингибитор многих металлопротеиназ (ММП), таких как интерстициальной коллагеназы (ММП-1) (IC_{50} 3 нМ), стромелизина-1 (ММП-3) (IC_{50} 20 нМ), желатиназы А (ММП-2) (IC_{50} 4 нМ), желатиназы В (ММП-9) (IC_{50} 4 нМ) и матрилизина (ММП-7) (IC_{50} 6 нМ). Имеются также данные о том, что Батимастат является мощным ингибитором прожелатиназы А (ММП-14) [9]. Батимастат ингибирует инвазию опухоли и ангиогенез, почти полностью нерастворим и, следовательно, имеет очень низкую биодоступность при пероральном приеме [6]. Таким образом, единственный способ применения Батимастата заключается в непосредственном введении в различные полости тела (перитонеальные и плевральные).

Нами предложенная конструкция – Ptoх-тиофен, содержит гетероциклы Ptoх-а и тиофеновое кольцо, активный компонент Батимастата. В качестве мишени для дальнейших исследований был взят маркер неоплазии и метастазирования – аминопептидаза N (APN/CD13, КФ 3.4.11.2), которая представляет собой мембрано-связанную Zn-зависимую ММП. APN участвует в процессах клеточной миграции, выживании клеток и ангиогенеза. В качестве цинк-зависимой аминопептидазы APN расщепляет N-концевой нейтральный остаток от физиологических пептидов и функционирует повсеместно в различных путях метаболизма пептидов [11]. Следовательно, APN на поверхности опухолевых клеток необходима для роста и развития опухоли путем расщепления и активации ангиогенных пептидов, которые необходимы для ангиогенеза опухолей. Рассматривается в качестве мишени для ингибирования васкуляризации и роста опухолей, выражен на клеточной поверхности почти всех основных опухолевых форм.

Целью данной работы является исследование механизмов действия антиканцерогенных препаратов Ptoх, Батимастата и нами конструированного нового соединения на их структурной основе с улучшением/повышением антиопухолевых свойств, со снижением нежелательных побочных действий.

Методы исследования: Моделирование APN проводилось на основе молекулярной модели трехмерной структуры, взятой из базы данных [PDB ID: 4fyq] RCSB. Структурные формулы исследованных лигандов Ptoх-а и Батимастата были взяты из базы данных PubChem [CID: 10607, 5362422]. С помощью химического редактора

MarvinSketch была создана *in silico* модель лиганда – Pтох-тиофен, скелет которого был взят от Pтох, и в 5 положении В кольца присоединен тиофеновый гетероцикл (активная часть Батимастата). Были установлены физико-химические параметры, а также вероятность прохождения через BBB (blood-brain barrier), с помощью программы SwissADME, результаты которой показали, что Pтох-тиофен соответствует критериям Липинского. После этого был проведен докинг анализ для каждого лиганда с мишенью APN. Для молекулярного докинга использовалась программа AutodockVina [12]. Программа проводит полужесткий докинг, т. е. макромолекула рассматривается как жесткая структура, а лиганд - как гибкая. Обычно докинг-программы используют скоринг функцию, которую можно рассматривать как попытку приблизить стандартные химические потенциалы системы.

Конформационно-зависимая часть скоринг функции AutodockVina выглядит следующим образом:

$$c = \sum_{i < j} f_{t_i} f_{t_j} (r_{ij}),$$

где c – это суммирование по всем парам атомов, которые могут перемещаться относительно друг друга, обычно исключая 1–4 взаимодействия, т.е. атомы, отдаленные 3-мя последовательными ковалентными связями. Здесь каждому атому i назначают тип t_i , а симметричный набор функций взаимодействия f_{t_i} и f_{t_j} межатомного расстояния r_{ij} должен быть определен.

Это значение может быть представлено как сумма внутримолекулярных и межмолекулярных взаимодействий [12].

В ходе развития программы Vina были рассмотрены различные стохастические подходы глобальной оптимизации, в том числе генетические алгоритмы, метод роя частиц, алгоритм имитации отжига и др. Vina использует технику глобального кратного локального оптимизирования (Iterated Local Search global optimizer), аналогично по Abagyan et al. Этот алгоритм включает последовательные стадии, состоящие из мутаций и локальной оптимизации, где каждый шаг принимается в соответствии с критерием Метрополиса. Для реализации локальной оптимизации в программе используется Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (BFGS) метод, который является эффективным квазиньютоновским методом. BFGS использует не только значение скоринг функции, но и ее градиенты, т. е. производные скоринг функции относительно ее аргументов. Аргументами в данном случае являются позиция и ориентация лиганда, а также значения торсионных углов для активных вращающихся связей лиганда и гибких остатков макромолекулы (если таковые имеются).

Для работы Vina использует PDBQT структурные файлы, которые можно рассматривать как расширение файлов формата PDB. Для создания PDBQT файлов и выбора пространства поиска (grid box) используется вспомогательное программное обеспечение AutoDockTools. Все симуляции были проведены при параметре $exhaustiveness = 128$.

Достоверность результатов докинга обеспечивалась 40-кратной повторяемостью для каждого лиганда. Для определения константы связывания исследуемых лигандов с мишенями было использовано следующее уравнение:

$$K_b = e^{-\frac{\Delta G}{RT}},$$

где K_b – константа связывания, ΔG – энергия Гиббса, R – универсальная газовая постоянная (8.312 Дж/(моль)), T – абсолютная температура [1, 3].

Результаты и обсуждение: Для детального изучения взаимодействия Ртох, Батимастата, Ртох-тиофена с APN. был проведен докинг анализ с выявлением возможных сайтов связывания (Рис. 1) и энергетических характеристик (Табл. 1). Полученные данные свидетельствуют о возможном связывании всех лигандов с мишенями. На основе полученных результатов можно сказать, что Ртох взаимодействует с а.к.о D439, D473, A474, H388. Батимастат с A353, H388, L434, D473, A474, образуя водородные связи, а также электростатические и гидрофобные взаимодействия. Ртох-тиофен взаимодействует с а.к.о A474, D473, S476 (Рис. 1).

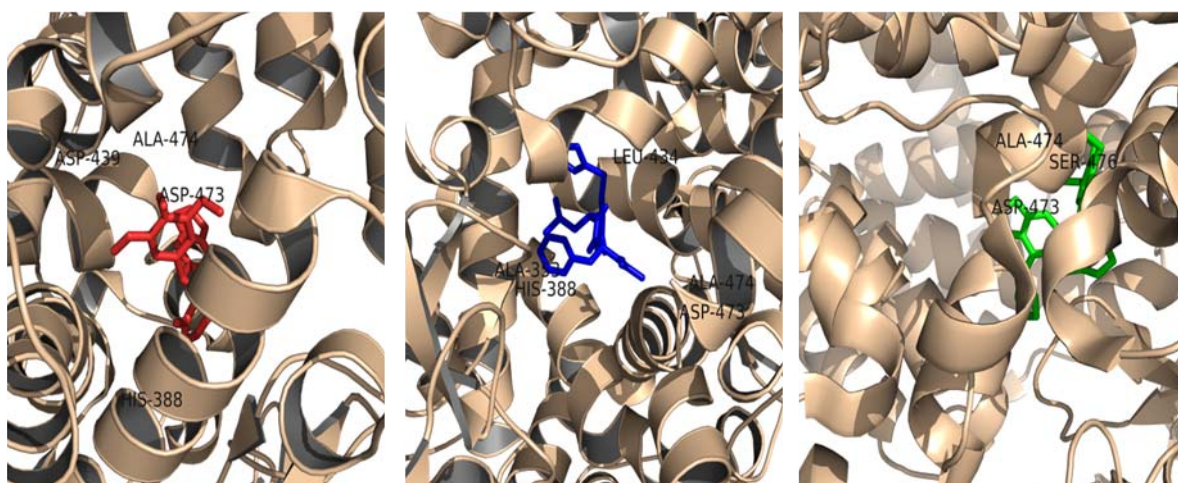


Рис. 1. Взаимодействие APN с Ртох-ом, Батимастатом и Ртох-тиофеном (слева направо).

Примечателен тот факт, что Ртох и Батимастат не взаимодействуют с S476, что характерно для Ртох-тиофена, однако с близлежащей а.к.о. – D473 происходит взаимодействие всех указанных лигандов. Учитывая этот факт, можно предположить, что увеличение минимальной энергии связывания Ртох-тиофена с APN на 9,8 % и 7,9% по сравнению с Ртох и Батимастата соответственно, наверняка связано с взаимодействием полярной группой серина. Следовательно, можно предположить, что связывание Ртох-тиофена с S476 обеспечивает большую активность и устойчивость данного комплекса. Константа связывания с APN для Ртох-тиофена по сравнению с Ртох и Батимастатом увеличивается в 3,4 и 2,4 раза, соответственно (Рис. 2).

Лиганд	Средняя мин. энергия Гиббса (кКал/М)	Константы ассоциации K_b (10^{-4})
Ртох	-7.4 ± 0.03	2,4
Батимастат	-7.6 ± 0.05	3,4
Ртох-тиофен	-8.1 ± 0.05	8,2

Таблица 1. Энергетические параметры взаимодействия Ртох-ом, Батимастатом и Ртох-тиофеном с APN ($p < 0,05$).

В результате проделанных *in silico* экспериментов впервые выявлено возможное взаимодействие Ртох, Батимастата и Ртох-тиофена с APN. Ртох-тиофен – обладает синергическими свойствами Ртох-а и Батимастата. Кроме того, удалось выявить группы, с помощью которых Ртох-тиофен взаимодействует с APN. Ртох-тиофен отличается от Ртох и Батимастата низкой цитотоксичностью и меньшим количеством побочных эффектов.

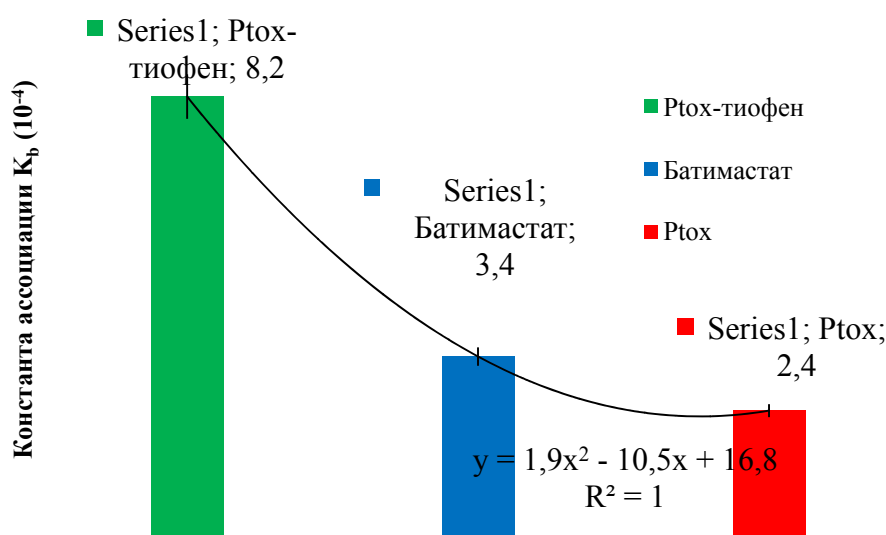


Рис. 2. Константа ассоциации для Ртох-тиофен, Батимастата и Ртох с APN ($p < 0,05$)

Для каждого лиганда с помощью программ CLC-Pred и PASS было проведено *in silico* прогнозирование цитотоксического действия химических соединений в нетрансформированных, раковых клеточных линиях, и были выявлены вероятные биологические активности и возможные побочные эффекты лигандов (результаты не приводятся), на основе которых впервые выявлено, что Ртох-тиофен отличается от Ртох-а и Батимастата низкой цитотоксичностью и меньшим количеством побочных эффектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] **Базаров И.**, Термодинамика, Москва, Высшая школа, 1991, с. 376.
- [2] **Вардапетян Р. Р., Рязанова А. Р., Антонян А. П.**, Некоторые особенности связывания подофиллотоксина и этопозида с ДНК различного ГЦ-содержания, Ученые записки ЕГУ, 2011, сс. 29-33.
- [3] **Ландау Л. и Лифшиц Е.**, Статистическая физика, Часть 1, Издание 3-е, дополненное М: Наука, 1976, с. 584.
- [4] **AbdElhamid H., Settin A., Elnaby S. H.**, Genetic Polymorphisms of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Egyptian Women with Breast Cancer, The Egyptian Journal of Hospital Medicine, 2015, 60, pp. 290-302.
- [5] **Chakraborty A., Bhattacharya D., Ghanta S., Chattopadhyay S.**, An Efficient Protocol for in vitro Regeneration of Podophyllum Hexandrum, a Critically Endangered Medicinal Plant, Indian J. Biotechnol, 2010, 9, pp. 217–220.
- [6] **Corbel M. et al.** Inhibition of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice by the Matrix Metalloproteinase Inhibitor Batimastat, The Journal of Pathology, 2001, 193 (4), pp. 538-545.
- [7] **Gordaliza M. et al.** Podophyllotoxin: Distribution, Sources, Applications and New Cytotoxic Derivatives, Toxicol, 2004, 44 (4), pp. 441-459.
- [8] **Gupta Y. et al.** RAS Oncogenes: Weaving a Tumorigenic Web, Nature Reviews Cancer, 2011, № 11, pp. 761-774.
- [9] **Knapinska A. M., Estrada C. A., Fields G. B.** The Roles of Matrix Metalloproteinases in Pancreatic Cancer, Progress in Molecular Biology and Translational Science, 2017, 148, pp. 339-354.
- [10] **Qian Liu Y., Yang L., Tian X.** Podophyllotoxin: Current Perspectives, Current Bioactive Compounds, 2007, 3 (1), pp. 37-66.
- [11] **Stuckey J. A. et al.** Hydrolytic catalysis and Structural Stabilization in a Designed Metalloprotein, Nature Chemistry, 2012, 4, № 2, pp. 118-123.
- [12] **Trott O., Olson A. J.**, AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading, Journal of Computational Chemistry, 2010, 31 (2), pp. 455-461.

Манукян Амалия

ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИОПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ IN SILICO КОНСТРУИРОВАННОГО ЛИГАНДА – ПОДОФИЛЛОТОКСИН-ТИОФЕНА

Ключевые слова: антиопухолевая активность, аминопептидаза, подофиллотоксин, Батимастат, подофиллотоксин-тиофен, in silico моделирование, молекулярный докинг.

В результате проделанных *in silico* экспериментов впервые выявлено возможное взаимодействие подофиллотоксина, Батимастата и их производного с APN. Подофиллотоксин-тиофен обладает синергическими свойствами подофиллотоксина и Батимастата, константа связывания которого с APN по сравнению с подофиллотоксина и Батимастата увеличивается в 3,4 и 2,4 раза соответственно. Действие подофиллотоксин-тиофена, в отличие от Ptox и Батимастата, характеризуется низкой цитотоксичностью и меньшими побочными эффектами для трансформированных и нормальных клеток.

Մանուկյան Ամալյա

IN SILICO ՄՈՂԵՎԱՎՈՐՎԱԾ ԼԻԳԱՆԴԻ՝ ՊՈՂՈՖԻԼՈՏՈՔՍԻՆ-ԹԻՈՖԵՆԻ ՀԱՎԱՔԱՂՑԿԵՂԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԲԱՑԱՀԱՅՏՈՒՄԸ

Բանալի բառեր՝ հակաքաղցկեղային ակտիվություն, ամինոպեպտիդազ, պոդոֆիլոտոքսին, բատիմաստատ, պոդոֆիլոտոքսին-թիոֆեն, *in silico* մոդելավորում, մոլեկուլային դոքինգ:

In silico փորձերի շնորհիվ առաջին անգամ հայտնաբերել ենք պոդոֆիլոտոքսինի, բատիմաստատի և պոդոֆիլոտոքսին-թիոֆենի փոխազդեցությունը APN-ի հետ: Կապման գործակիցը պոդոֆիլոտոքսին-թիոֆենի դեպքում 3.4 և 2.4 անգամ գերազանցում է պոդոֆիլոտոքսինի և բատիմաստատի կապման գործակիցներին համապատասխանաբար: Ցույց է տրվել, որ պոդոֆիլոտոքսինի և բատիմաստատի համեմատությամբ նորմալ բջիջների վրա պոդոֆիլոտոքսին-թիոֆենի ազդեցությունը բնութագրվում է ցածր ցիտոտոքսիկությամբ և կողմնակի ավելի քիչ ազդեցություններով:

Manukyan Amalya

DETECTION OF ANTI-TUMOUR ACTIVITY FOR IN SILICO DESIGNED LIGAND-PODOFILLOTOXIN-THIOPHENE

Key words: antitumour activity, aminopeptidase, podophyllotoxin, Batimastat, podophyllotoxin-thiophene, *in silico* modeling, molecular docking.

As a result of *in silico* experiments, for the first time we have revealed the possible interaction of Ptox, Batimastat and Ptox-thiophene with APN. Podophyllotoxin-thiophene possesses synergistic properties of podophyllotoxin and Batimastat. The binding constant with APN for Ptox-thiophene compared with Ptox and Batimastat increases in 3.4 and 2.4 times, respectively. The action of Ptox-thiophene in contrast to Ptox and Batimastat is characterized by low cytotoxicity and less side effects for transformed and normal cells.