

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ

ՍԱՀԱԿՅԱՆ ԼՈՒՍԻՆԵ ՅՈՒՐԻԿԱ

α -ԱՄԻՆԱԿԱՐԱԳԱԹԹՎԻ ՀԵՏԵՐՈՑԻԿԼԻԿ ՈՉ ՍՊԻՏԱԿՈՒՑԱՅԻՆ
ՆՄԱՆԱԿՆԵՐԻ ԿԵՆՍԱՄԻՄԵՏԻԿ ՍԻՆԹԵԶԸ, ՀԱԿԱՕՔՍԻԴԱՆՏԱՅԻՆ ԵՎ
ԹԱՂԱՆԹԱՊԱՇՏՊԱՆԻՉ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

ԺԵ.00.01 - «Դեղագիտություն» մասնագիտությամբ
դեղագործական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ - 2021

НПЦ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА

СААКЯН ЛУСИНЕ ЮРИКОВНА

БИОМИМЕТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ НЕБЕЛКОВЫХ
АНАЛОГОВ α -АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ, ИЗУЧЕНИЕ
АНТИОКСИДАНТНЫХ И МЕМБРАНОЗАЩИТНЫХ СВОЙСТВ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук по специальности
15.00.01 – «Фармацевтика»

ЕРЕВАН - 2021

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ԵՊՀ Ֆարմացիայի ինստիտուտում:

Գիտական ղեկավար՝

ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս, քիմ. գիտ. դոկտոր,
պրոֆեսոր Աշոտ Սերոբի Սադյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

բժշկական գիտությունների դոկտոր,
պրոֆեսոր Նարինե Ռուբենի Միրզոյան
քիմիական գիտությունների դոկտոր,
դոցենտ Սլավիկ Արշակի Դադայան

Առաջատար կազմակերպություն՝

ՀՀ ԳԱԱ Օրգանական և դեղագործական
քիմիայի գիտատեխնոլոգիական կենտրոն

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2021թ. հունիսի 18-ին, ժամը 15⁰⁰-ին ՀՀ ԳԱԱ "Հայկենսատեխնոլոգիա" ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲՈԿ-ի Կենսատեխնոլոգիայի 018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:

Հասցե՝ 0056, ք. Երևան, Գյուրջյան փողոց, 14, հեռ./ֆաքս (374 10) 65 41 80:

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

Սեղմագիրն առաքված է 2021թ. մայիսի 7-ին:

Մասնագիտական խորհրդի
գիտական քարտուղար, կ.գ.թ.



Գ.Ե. Ավետիսյան

Тема диссертации утверждена в Институте Фармации ЕГУ.

Научный руководитель:

академик НАН РА, доктор химических наук,
профессор Ашот Серобович Сагян

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук,
профессор Нарине Рубеновна Мирзоян
доктор химических наук,
доцент Славик Аршакович Дадаян

Ведущая организация:

Научно-технологический центр
органической и фармацевтической химии НАН РА

Защита диссертации состоится 18 июня 2021г. в 15⁰⁰ часов на заседании специализированного совета 018 Биотехнологии ВАК РА, действующего при НПП "Армбиотехнология" НАН РА.

Адрес: 0056, РА, г. Ереван, ул. Гюрджяна 14, тел./факс (374 10) 65 41 80.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НПП "Армбиотехнология" НАН РА.
Автореферат разослан 7 мая 2021 г.

Ученый секретарь специализированного совета, к.б.н.



Г.Е. Аветисова

ԱՇԽԱՏԱՆՔԻ ԸՆԴՀԱՆՈՒՐ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ

Աշխատանքի արդիականությունը: Դեղագործական արդյունաբերության առաջընթացը բնութագրվում է նոր քիմիական մոլեկուլների շարունակական որոնմամբ և ստեղծմամբ, որոնք օժտված կլինեն ավելի էֆեկտիվ և կատարյալ բիոդինամիկական հատկություններով: Դեղի և կենսաբանական թիրախների միջև էնանտիոսպեցիֆիկ փոխազդեցության հաստատումից հետո կտրուկ մեծացել է հետաքրքրությունը քիրալային միացությունների նկատմամբ: Բնական մետաբոլիտների սինթետիկ քիրալային նմանակները, այդ թվում ամինակարագաթթվի հետերոցիկլիկ տեղակալված ածանցյալները կարող են հանդիսանալ պոտենցիալ դեղաբանորեն ակտիվ արժեքավոր նյութեր, ինչպես անհատապես, այնպես էլ պեպտիդների կամ այլ պատրաստուկների կազմում: Նրանց կենսամիմետիկ ասիմետրիկ սինթեզի արդյունավետ մեթոդների մշակումը եղել և մնում է ժամանակակից դեղագործական քիմիայի արդիական խնդիր՝ ինչպես հիմնարար, այնպես էլ կիրառական տեսակետից, իսկ նրանց կենսաբանական հատկությունների նախնական սքրինինգը հեռանկարային կդարձնի հետագա ուսումնասիրումը դեղերի դիզայնի փուլերում:

Հայտնի է, որ պեպտիդային բնույթի դեղանյութի կազմում սպիտակուցային ամինաթթվի փոխարինումը նրա ոչ սպիտակուցային նմանակով բարձրացնում է դեղի կայունությունը պրոտեոլիտիկ ֆերմենտների հանդեպ՝ հանգեցնելով դրա ազդեցության պրոլոնգացմանը և ֆարմակոկինետիկ հատկությունների բարելավմանը: Իրենց հերթին, տարաբնույթ հետերոցիկլիկ խմբերի հետ համակցված ամինաթթուները կարևոր դասի թերապևտիկ ագենտներ են, քանի որ նման համակցումը հանգեցնում է դեղերի մետաբոլիկ հատկությունների, կենսամատչելիության և թափանցելիության բարելավմանը և արդյունքում՝ կարելի է ակնկալել նոր դեղաբանական էֆեկտներ:

α-Ամինակարագաթթուն համարվում է առանցքային քիրալային միջնորդանյութ մի շարք դեղերի սինթեզի համար (լևեթիրացետամ, բրիվարացետամ, էթամբուրոլ), որոնց օպտիկական մաքրությունը կրիտիկական ցուցանիշ է թերապևտիկ անվտանգության և էֆեկտիվության համար: α-Ամինակարագաթթվի ածանցյալները կարելի է դիտարկել որպես ԿՆՀ-ի արգելակիչ նյարդամիջնորդանյութ γ-ամինակարագաթթվի (ԳԱԿԹ) նմանակներ: Բժշկական պրակտիկայում մաքուր ԳԱԿԹ-ի (գամալոն, ամինալոն) և նրա ածանցյալների (ֆենիբուտ, լիորեսալ, բակլոֆեն, գաբապենտին, նոոտրոպիլ, պիրացետամ) լայն կիրառումը մեծացրել է հետաքրքրությունը ամինակարագաթթվի նոր տարաբնույթ տեղակալված նմանակների սինթեզի և բժշկականսաբանական հատկությունների ուսումնասիրության հանդեպ, ինչը կարևոր է մի շարք պաթոլոգիկ վիճակների շտկման համար:

Հարկ է նշել, որ չնայած բարձր պահանջարկին, ամինակարագաթթվի հետերոցիկլիկ տեղակալված օպտիկապես ակտիվ հայտնի ածանցյալների տեսականին խիստ սահմանափակ է:

Ներկայումս, ֆերմենտային հակաօքսիդանտների հետ մեկտեղ, լայնորեն ուսումնասիրվում են ոչ ֆերմենտային հակաօքսիդանտների ազդեցության մեխանիզմները՝ որպես կենսաթաղանթների և այլ կենսահամակարգերի կայունացման գործոններ: Վերջին տարիներին համոզիչ ապացույցներ են ձեռք բերվել այն մասին, որ թթվածնի ակտիվ ձևերով լիպիդների գերօքսիդացման պայմաններում մեծանում է կենսաթաղանթների հոսունությունը և բարձրանում է արտաէրիթրոցիտար հեմոգլոբինի ներթափանցումը դեպի թաղանթներ, որտեղ հեմոգլոբինը ընտրողական, սակայն ոչ կայուն կոմպլեքս է առաջացնում NADPH օքսիդազի (Nox) իզոմերների հետ: Այնուհետև տեղի է ունենում այդ կոմպլեքսի արտազատում (ռիլիզինգ) թաղանթներից դեպի լուծելի ֆազ, խախտելով թաղանթների կառուցվածքային ամբողջականությունը: Հաշվի առնելով, որ Nox-ի իզոմերները հանդիսանում են կարևոր թաղանթային բաղադրամասեր, որոնք մասնակցում են բջջի մի շարք կարգավորիչ մեխանիզմներում, թաղանթներից վերջիններիս ռիլիզինգը ճնշող հակաօքսիդանտային ակտիվությամբ օժտված կենսաակտիվ միացությունների որոնումը կարելի է դիտարկել որպես կենսաբժշկագիտության և դեղագիտության հեռանկարային ուղղություններից մեկը:

Հիմք ընդունելով վերոշարադրյալը և հաշվի առնելով ամինակարագաթթվի հետերոցիկլիկ նմանակների կարևորությունը՝ որպես պոտենցիալ ակտիվ բաղադրատարրեր զանազան դեղապատրաստուկների ստացման գործընթացներում, սույն առենախոսական աշխատանքում հետազոտվել և իրականացվել է տարաբնույթ հետերոցիկլիկ տեղակալիչներ պարունակող α -ամինակարագաթթվի օպտիկապես ակտիվ նմանակների սինթեզը և հակաօքսիդանտային և թաղանթապաշտպանիչ հատկությունների ուսումնասիրումը:

Հետազոտության նպատակն ու խնդիրները: Առենախոսական աշխատանքի նպատակն է եղել սինթեզել կողմնային շղթայում տարաբնույթ հետերոցիկլիկ խմբեր պարունակող α -ամինակարագաթթվի նոր ոչ սպիտակուցային նմանակներ, հետազոտել դրանց հակաօքսիդանտային և թաղանթապաշտպանիչ հատկությունները:

Նպատակի իրագործման համար նախատեսվել էր լուծել հետևյալ հիմնական խնդիրները.

- Սինթեզել (E)- և (Z)-դեհիդրոամինակարագաթթվի և (S)-BPB քիրալային օժանդակ ռեագենտի Շիֆի հիմքի հարթ-քառակուսային Ni^{II} կոմպլեքսները և հետազոտել դրանց $C=C$ կապին տարաբնույթ նուկլեոֆիլ հետերոցիկլների (1,2,4-տրիազոլներ, թիոդիազոլներ, իմիդազոլներ, պիրիմիդիններ, պիպերիդիններ) ասիմետրիկ միացման ռեակցիաները: Դրական արդյունքների հիման վրա մշակել α -ամինակարագաթթվի հետերոցիկլիկ տեղակալված նմանակների ասիմետրիկ սինթեզի ընդհանուր մեթոդ, ստանալ նմուշները, հետազոտել ու բացահայտել դրանց կառուցվածքը, բացարձակ կոնֆիգուրացիան, քիմիական և օպտիկական մաքրության աստիճանը:
- Ուսումնասիրել α -ամինակարագաթթվի նոր սինթետիկ նմանակների հակաօքսիդանտային ակտիվությունը, դրանց ազդեցությունը տարբեր հյուսվածքներից առանձնացված ցիտոպլազմատիկ, ներբջջային (կորիզային,

միտոքոնդրիալ) և էրիթրոցիտար թաղանթներից NADPH օքսիդազի իզոնների ռիլիզինգի (արտազատման) գործընթացի վրա, օպտիկական սպեկտրալ ցուցանիշների և O_2^- առաջացնող ակտիվության վրա, հետազոտել դրանց թաղանթակայունացնող ազդեցության մեխանիզմները օքսիդատիվ-նիտրոզատիվ սթրեսի պայմաններում և այլն:

Արձանագրված արդյունքների հիման վրա տալ համեմատական բնութագիր դեղագործության ոլորտում ամինակարագաթթվի նոր սինթետիկ նմանակների կիրառման հեռանկարների վերաբերյալ:

Աշխատանքի գիտական նորույթը:

1. Օգտագործելով նախկինում մշակված մեթոդաբանությունը, սինթեզվել են գրականության մեջ չնկարագրված α -ամինակարագաթթվի օպտիկապես մաքուր չորս նոր հետերոցիկլիկ տեղակալված նմանակներ՝

- (2S,3S)- β -[3-(թիոֆեն-2-իլ)-4-պրոպիլ-5-թիոքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ամինակարագաթթու (NSAA-5a),
- (2S,3S)- β -[3-բուրիլ-4-(ֆուրան-2-իլմեթիլ)-5-թիոքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ամինակարագաթթու (NSAA-5b),
- (2S,3S)- β -[3-բուրիլ-4-պրոպիլ-5-թիոքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ամինակարագաթթու (NSAA-5c),
- (2S,3S)-3-[2-թիոքսո-2,3-դիհիդրոբենզիմիդազոլ-1-իլ]- α -ամինակարագաթթու (NSAA-6)

Պարզաբանվել է դրանց կառուցվածքն ու բացարձակ կոնֆիգուրացիան, մշակվել է դրանց կենսամիմետիկ ասիմետրիկ սինթեզի ընդհանուր մեթոդ:

2. Հետազոտվել է NSAA-5c և NSAA-6 ամինաթթուների կենսաակտիվությունը, բացահայտվել է, որ դրանք՝

- ցուցաբերում են խտություն կախյալ հակաօքսիդանտային ակտիվություն՝ շնորհիվ ՍՕԴ-միմետիկ ակտիվության,
- ցուցաբերում են ունիվերսալ թաղանթակայունացնող ազդեցություն՝ շնորհիվ թաղանթային կառուցվածքների կարևոր բաղադրիչ հանդիսացող NADPH օքսիդազների իզոնների հեմոգլոբինոլ հարուցված ռիլիզինգի ընկճման, որը կրում է խտություն-կախյալ բնույթ,
- իրենց տեսակարար հակաօքսիդանտային ակտիվության մակարդակով մոտ են տաուրինին և գրեթե եռակի անգամ գերազանցում են (S)-արգինինին,
- օքսիդատիվ-նիտրոզատիվ սթրեսի մոդելավորման պայմաններում NSAA-6 ամինաթթվի ազդեցությամբ նկատվում է NADPH օքսիդազի գումարային ֆրակցիայի արտազատման ընկճում ինչպես հեպատոցիտների թաղանթներից, այնպես էլ նեյրոնալ թաղանթներից (պլազմատիկ, կորիզային, միտոքոնդրիալ), որն իրականանում է շնորհիվ նրա հակաօքսիդանտային ակտիվության, և որը ռեգիստենտ է ջրածնի պերօքսիդի, սուպերօքսիդային և հիդրօքսիլային ռադիկալների հանդեպ: Դա հիմք է տալիս NSAA-6-ը դիտարկելու որպես նոր հեռանկարային նյարդապաշտպանիչ միջոց:

Աշխատանքի գիտագործնական նշանակությունը: Սինթեզվել են (S)- α -ամինակարագաթթվի օպտիկապես ակտիվ հետերոցիկլիկ տեղակալված 4 նոր

նմանակներ, որոնք ապագայում կարող են կիրառվել ֆիզիոլոգիապես ակտիվ պեպտիդների և այլ դեղապատրաստուկների նախագծման գործընթացներում:

Ստացված տվյալները կարևոր նշանակություն են ձեռք բերում, քանի որ հաստատված է, որ կենսաթաղանթներում արտաէրիթրոցիտային հեմոգլոբինի միջոցով NADPH օքսիդազի քանակության նվազեցումը ուղեկցվում է թաղանթային ֆունկցիաների խանգարումներով:

Իրականացված ուսումնասիրությունների արդյունքները վկայում են այն մասին, որ հեռանկարային է համարվում α -ամինակարագաթթվի β -հետերոցիկլիկ տեղակալված տարբեր ածանցյալների սինթեզի և կենսաբանական տարբեր ակտիվությունների ուսումնասիրությունները, միաժամանակ թելադրելով NSAA-5c և NSAA-6 ամինաթթուների էֆեկտիվության հետագա ուսումնասիրությունների անհրաժեշտությունը, որպես թաղանթակայունացող, նյարդապաշտպան հատկություններով օժտված պոտենցիալ հակաօքսիդանտների:

Աշխատանքի իրականացման վայրը: Աշխատանքն իրականացվել է ԵՊՀ Ֆարմացիայի ինստիտուտում, ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիաթյանի անվան կենսաքիմիայի ինստիտուտի «Ակտիվ թթվածնի նյութափոխանակության» լաբորատորիայում:

Աշխատանքի փորձաքննությունը: Աշխատանքի հիմնական դրույթները ներկայացվել են “Current State of Pharmacy and Prospects of its Development” առաջին միջազգային գիտաժողովում (Երևանի Պետական Համալսարան, 1-3 նոյեմբերի, 2018, Երևան), “Biotechnology: Science and Practice” երիտասարդ գիտնականների չորրորդ միջազգային գիտաժողովում (ՀՀ ԳԱԱ “Հայկենսատեխնոլոգիա” ԳԱԿ ՊՈԱԿ, 28-30 սեպտեմբերի, 2017, Երևան) և “Modern aspects of rehabilitation in medicine” VIII միջազգային գիտաժողովում (13-15 սեպտեմբերի, 2017, Երևան, Ստեփանակերտ): Աշխատանքի նախնական փորձաքննությունը կայացել է ԵՊՀ Ֆարմացիայի ինստիտուտի գիտական խորհրդի նիստի ընթացքում (նիստ թիվ 12, առ 07.07.2020թ.):

Հրապարակված աշխատությունները: Ատենախոսության հիմնադրույթները և բովանդակությունը ներկայացված են գիտական պարբերականներում տպագրված 10 աշխատություններում՝ 7 հոդված և 3 թեզիս, որոնցից երկու հոդվածն՝ առանց համահեղինակների:

Ծավալը և կառուցվածքը: Ատենախոսությունը շարադրված է 141 էջի վրա: Այն բաղկացած է հետևյալ բաժիններից՝ ներածություն, գրական ակնարկ, խնդրի դրվածքը և հետազոտման օբյեկտի ընտրությունը, հետազոտության նյութը և մեթոդները, հետազոտության արդյունքները և դրանց քննարկումը, ամփոփում, եզրակացություններ, օգտագործված գրականության ցանկ, որը ներառում է 205 աղբյուր: Ստացված արդյունքները լուսաբանված են 32 նկարների, 11 աղյուսակների և 9 սխեմաների միջոցով:

ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ՆՅՈՒԹԸ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ

Հետազոտության նպատակի և խնդիրների իրականացման համար կիրառվել են ժամանակակից մեթոդների կոմպլեքս, որոնք ներառում են.

1. ամինաթթուների սինթեզի, մաքրման և կառուցվածքի պարզաբանման մեթոդներ,
2. սինթեզված միացությունների կենսաբանական ակտիվության ուսումնասիրման մեթոդներ:

α-Ամինակարագաթթվի β-հետերոցիկլիկ տեղակալված նմանակների սինթեզի նպատակով նախկինում մշակված մեթոդաբանության համաձայն [Saghiyan A.S., Manasyan L.L. et al, *Tetrahedron: Asymmetry* 2006; Сагиян А.С., Манасян Л.Л. и соавт., *Хим. жур. Арм.*, 2003] հետազոտվել է (E)- և (Z)-դեհիդրոամինակարագաթթվի նիկելային կոմպլեքսների կրկնակի կապին տարբեր հետերոցիկլիկ նուկլեոֆիլների ասիմետրիկ միացման հնարավորությունը: Միացման ռեակցիաներն ընթացել են հիմնային կատալիզի պայմաններում, 50-60°C ջերմաստիճանում: Ռեակցիաների ընթացքին հետևել ենք նրբաշետ քրոմատոգրաֆային մեթոդով [SiO₂, CHCl₃:CH₃COCH₃ (3:1)], ըստ ելային կոմպլեքսի հետքի անհետացման և միացման արգասիք դիաստերեոիզոմերային կոմպլեքսների միջև թերմոդինամիկական հավասարակշռության հաստատման:

Նպատակային ամինաթթուները անջատվել են կոմպլեքսների դիաստերեոմերային խառնուրդի թթվային հիդրոլիզատից՝ ստանդարտ մեթոդաբանությամբ [Belokon' Yu.N., *Pure and Appl. Chem.*, 1992; A. C. Сагиян, *Хим. жур. Арм.*, 2007]:

Նպատակային ամինաթթուների և միջանկյալ դիաստերեոմեր կոմպլեքսների կառուցվածքն ու բացարձակ կոնֆիգուրացիան պարզաբանվել է ¹H, ¹³C ՄՄՌ, էլեմենտային անալիզի, քիրալային ԲԱՀԲ, քլեռաչափական անալիզի մեթոդներով:

Հետազոտվող միացությունների հակաօքսիդանտային ակտիվությունը գնահատվել է սպեկտրադիտական եղանակով՝ ամոնիակով ջրածնի պերօքսիդի քայքայման ժամանակ առաջացող սուպերօքսիդային ռադիկալներով կոմասիբրիլիանտ կապույտ (ԿԲԿ) ներկանյութի գունազրկման ընկճման աստիճանի հաշվարկման մեթոդով [Симосян Р.М., Бабаян М.А. и соавт., *Биол. жур. Арм.* 2017]: Որպես տեսակարար հակաօքսիդանտային ակտիվության միավոր ընդունվել է ուսումնասիրվող միացությունների այն քանակությունը, որը 50%-ով արգելակում է ԿԲԿ-ի մաքսիմալ օպտիկական կլանման խտության նվազումը, 580 նմ-ի տակ, սենյակային ջերմաստիճանում: Այն արտահայտվել է միավոր/մգ/մլ-ով:

Տարբեր հյուսվածքներից բջջային և ներբջջային թաղանթների անջատման և մաքրման, ինչպես նաև հետազայում դրանցից NADPH օքսիդազի իզոմեր գումարային ֆրակցիայի անջատման և մաքրման համար կիրառվել են լիցենզավորված մեթոդներ [Симосян Р.М. и соавт. *Лиц. Изобр. РА N2818 А. 2014; Симосян М.А. и соавт. Лиц. изобр. N 908, 2001*]:

Թաղանթների անջատումը և մաքրումը իրականացվել է սախարոզի 0,25 Մ ջրային լուծույթում համապատասխան հյուսվածքների հոմոգենատների դիֆերենցիալ ցենտրիֆուգման մեթոդով: Արդյունքում ստացվել են պլազմատիկ, կորիզային և միտոքոնդրիալ գործնականորեն մաքուր թաղանթների ջրային խառնուրդներ:

Կենսաթաղանթներից NADPH օքսիդազի իզոմերների գումարային ֆրակցիայի (Nox1+Nox2) հեմոգլոբինով հարուցված արտազատման և այդ գործընթացի վրա հետազոտվող միացությունների ազդեցության ուսումնասիրման

համար ստուգիչում հետազոտվող թաղանթների ջրային հոմոգենատները ինկուբացվել են ֆերիհեմոգլոբինի հետ, pH 9,5: Փորձնական խմբերում վերոնշյալ խառնուրդին ավելացվել է ուսումնասիրվող ամինաթթվի լուծույթ, pH 9,5: Նմուշները 1 ժամ 37°C-ում ինկուբացնելուց և ապա սառեցնելուց հետո ցենտրիֆուգվել են (14000 պտ/ր, 15 ր), իսկ սուպերնատանտները ենթարկվել են իոնափոխանակային քրոմատոգրաֆման՝ DE-52 ցելյուլոզով լցված աշտարակով: Հետազոտվող թաղանթներից արտազատված Nox1+Nox2 իզոմերների գումարային ֆրակցիան աշտարակից էլուացվել է 0,1 M կալիումֆոսֆատային բուֆերով pH 7,4: Արդյունքում հետազոտվող թաղանթներից ստացվել են Nox1+Nox2 իզոմերների գումարային նատիվ ֆրակցիա: Այնուհետև ստուգիչում և փորձնական խմբերում գրանցվել են ստացված Nox-երի բնութագրական կլանման օպտիկական սպեկտրները և որոշվել այդ ֆերմենտի արտազատված քանակությունը մգ/մլ-ով, կիրառելով վերջինիս մոլյար էքստինքցիայի գործակիցը 530 նմ ալիքի երկարության տակ:

NADPH օքսիդազի իզոմերների NADPH-կախյալ սուպերօքսիդ գոյացնող ակտիվությունը որոշվել է նիտրոտետրազոլային կապույտի (ՆՏԿ) մեթոդով՝ հաշվարկելով $O_2^{\cdot-}$ ռադիկալներով ՆՏԿ-ի վերականգնման արդյունքում ստացված ֆորմազանի առաջացման խթանման տոկոսը (560 նմ-ի տակ): Nox-ի NADPH-կախյալ $O_2^{\cdot-}$ գոյացնող տեսակարար ակտիվության միավոր է ընդունվել այն քանակությունը, որը ֆորմազանի առաջացումը ստուգիչի հանդեպ խթանում է 50%-ով:

Օքսիդատիվ-նիտրոզատիվ սթրեսի մոդելավորումը՝ ամինաթթվի թաղանթապաշտպանիչ ազդեցության ուսումնասիրման նպատակով: α -Ամինակարագաթթվի հետերոցիկլիկ տեղակալված նոր սինթեզված ածանցյալի (NSAA-6) թաղանթապաշտպանիչ ակտիվությունը գնահատվել է հիպերամոնեմիայի փորձարարական մոդելում [Thenmozhi A. J., Subramanian P., Evid. Based Complement. Alternat. Med., 2011]: Փորձերն իրականացվել են 180-220 գ կշռով 30 ոչ ցեղային, սպիտակ արու առնետների վրա, որոնք պահվել են ստանդարտ լաբորատոր վիճարկումի պայմաններում, 22±2°C ջերմաստիճանի և 45-70% խոնավության պայմաններում: Լուսավորման ցիկլը եղել է ստանդարտ՝ 12/12 լույս/մութ: Խմելու ջուրը և կերը եղել են անսահմանափակ: Կենդանիները բաշխվել են (10-ական) հետևյալ խմբերում.

I խումբ – կենդանիներ, որոնց մոտ ՕՆՍ-ի մոդելը վերարտադրվել է ամոնիումի քլորիդի 1 մլ լուծույթի ներդրվայնային ներարկմամբ՝ 100 մգ/կգ դրզայով, շաբաթական 3 անգամ, 5 շաբաթվա ընթացքում:

II խումբ – կենդանիներ, որոնց մոտ նույն սխեմայով ամոնիումի քլորիդի ներմուծմանը զուգահեռ, 20 մգ/կգ դրզայով ներդրվայնային ներարկվել է ֆիզիոլոգիական լուծույթում լուծված NSAA-6 ամինաթթվի 1 մլ լուծույթ, շաբաթական 2 անգամ, 5 շաբաթվա ընթացքում:

III խումբ – կենդանիների ստուգիչ խումբ, որոնց նույն սխեմայով ներդրվայնային ներարկվել է 1 մլ ֆիզիոլոգիական լուծույթ:

Հետազոտության ընթացքում կիրառվել են «Sigma-Aldrich», «Pharmcal Fine Chemicals», «Merck», «Silufol», «Whatman», «Peaxim» ֆիրմաների արտադրության բարձր մաքրության ռեակտիվներ, լուծիչներ և այլ նյութեր:

Երկտեղակալված 5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլները սինթեզվել են ԵՊՀ օրգանական քիմիայի ամբիոնում, իսկ 2-մերկապտոբենզիմիդազոլը ձեռք է բերվել «Sigma-Aldrich» ֆիրմայից:

NADPH օքսիդազի իզոնների անջատման և մաքրման նպատակով օգտագործվել է դոնորական արյան էրիթրոցիտներից անջատված էլեկտրոֆորետիկ հոմոգեն ֆերիհեմոգլոբին, ցելյուլոզ DE-52: Հակաօքսիդանտային ակտիվության որոշման համար օգտագործվել է լիոֆիլացված Cu, Zn-ՍՕԴ, որն առանձնացվել և մաքրվել է ցուլի լարդից, վիտամին C, տաուրին, L-արգինին («Sigma Chemicals»), «USP» ստանդարտ նմուշի մեքսիդոլ:

Ստացված արդյունքների վիճակագրական մշակումն իրականացվել է IBM STATISTICA 6 և GraphPad Prism 4 համակարգչային ծրագրերով: Հետազոտվող ցուցանիշների միջև տարբերությունների վիճակագրական նշանակալիության գնահատումը իրականացվել է *Ստյուդենտի t*-չափանիշի միջոցով:

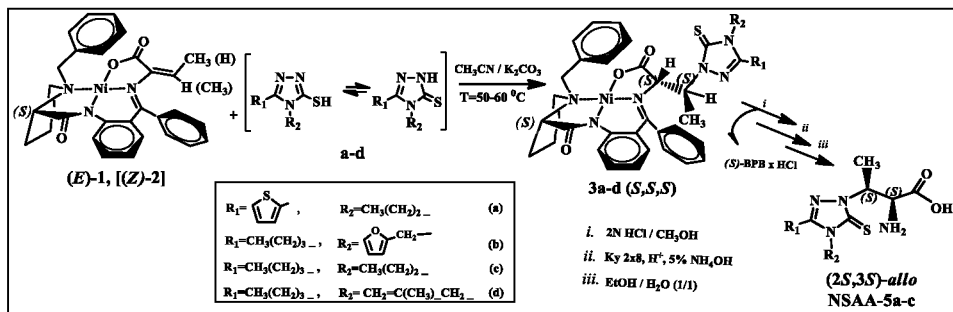
ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐԸ ԵՎ ԴՐԱՆՑ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄԸ

1. Հետերոցիկլիկ տեղակալված α-ամինակարագաթթվի օպտիկապես ակտիվ նմանակների կենսամիմետիկ սինթեզը

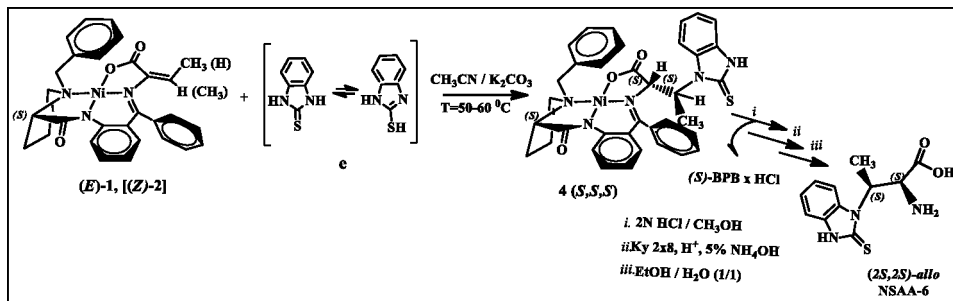
Հիմք ընդունելով նախկինում մշակված մեթոդաբանությունը, հետազոտվել է Ni^{II} իոնի հետ (S)-BPB քիրալային օժանդակ ռեագենտի և (E)- և (Z)-դեհիդրոամինակարագաթթվի Շիֆի հիմքերի առաջացրած կոմպլեքսների $\text{C}=\text{C}$ կապին տարբեր հետերոցիկլիկ նուկլեոֆիլների ասիմետրիկ միացման ռեակցիաները: Ընդ որում, դեհիդրոամինակարագաթթվի կոմպլեքսներն օգտագործվել են ինչպես անհատական մաքուր (E)- և (Z)-երկրաչափական իզոմերների տեսքով (1 և 2), այնպես էլ անմիջապես սինթեզի արդյունքում ստացված նրանց խառնուրդի տեսքով՝ $(E)/(Z) = 5/1$ հարաբերությամբ:

Որպես հետերոցիկլիկ նուկլեոֆիլներ հետազոտվել են 3 և 4 դիրքերում տարաբնույթ տեղակալված 2-մերկապտո-1,2,4-տրիազոլներ, թիոդիազոլներ, օքսազոլներ, տեղակալված պիրիմիդիններ, իմիդազոլներ, պիպերիդիններ: Սակայն դրական արդյունքներ են արձանագրվել 3-(թիոֆեն-2-իլ)-4-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլի (a), 3-բութիլ-4-(ֆուրան-1-իլ-մեթիլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլի (b), 3-բութիլ-4-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլի (c), 3-բութիլ-4-(2-մեթիլ-ալիլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլի (d), 2-մերկապտոբենզիմիդազոլի (e) միացման ռեակցիաներում: Նուկլեոֆիլների միացման ռեակցիաները ընթանում են հիմնային կատալիզի պայմաններում: Ընդ որում, 1 և 2 կոմպլեքսների դեհիդրոամինաթթվային մնացորդի $\text{C}=\text{C}$ կապին տեղակալված 5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլների (a-d) և 2-մերկապտոբենզիմիդազոլի (e) միացումը հետազոտվել է տարբեր լուծիչների, հիմքերի և ջերմաստիճանային պայմաններում: Լավագույն արդյունքներ արձանագրվել են $\text{CH}_3\text{CN}/\text{K}_2\text{CO}_3$ միջավայրում, 50-60°C տաքացման պայմաններում (սխեմաներ 1 և 2):

Միսնա 1.



Միսնա 2.



Նուկլեոֆիլ միացման ռեակցիաների ընթացքը վերահսկվել է ՆՇՔ եղանակով: Նուկլեոֆիլների միացումը ընթանում է ամինաթթվային մնացորդի 2 և 3 դիրքերում նոր քիրալային կենտրոնների գեներացմամբ, ինչի արդյունքում առաջանում է դիաստերեոմեր կոմպլեքսների խառնուրդ՝ (S,S,S)-բացարձակ կոնֆիգուրացիայով դիաստերեոմերի (**3a-d**, **4**) բարձր ավելցուկով (90-96%):

Հիմնական արգասիք կոմպլեքսները (**3a-d** և **4**), քրոմատոգրաֆացվել են [SiO₂, 3x40 սմ, CHCl₃:CH₃COCH₃, (3:1)] և նրանց կառուցվածքն ու բացարձակ կոնֆիգուրացիան պարզաբանվել է սպեկտրադիտական մեթոդներով: Արգասիք կոմպլեքսների ամինաթթվային մնացորդի α-ածխածնի ատոմի (S)-բացարձակ կոնֆիգուրացիան որոշվել է օպտիկական պտույտի դրական արժեքով՝ 589 նմ ալիքի երկարության տակ, իսկ β-ածխածնի ատոմի բացարձակ կոնֆիգուրացիան որոշվել է 'H ՄՄՌ մեթոդով՝ β-մեթիլային պրոտոնների ազդանշանների քիմիական շեղումներով: Դեհիդրոամինակարագաթթվի կոմպլեքսներին նուկլեոֆիլների միացման ռեակցիաների դիաստերեոսելեկտիվությունը գնահատվել է ինչպես ՆՇՔ, այնպես էլ 'H ՄՄՌ սպեկտրադիտական (ըստ N-բենզիլպրոլինի մնացորդի բենզիլային խմբի մեթիլենային պրոտոնների ազդանշանների ինտեգրալների հարաբերության՝ 3.55-3.70 և 4.35-4.44 p.p.m. մարզում) անալիզի մեթոդներով, ինչպես նաև կոմպլեքսների դիաստերեոմերային խառնուրդից անջատված

ամինաթթվային խառնուրդի (մինչև բյուրեղացումը) քիրալային ԲԱՀՔ անալիզի մեթոդով: Արդյունքները ներկայացված են աղյուսակ 1 և 2-ում:

Աղյուսակ 1.

Կոմպլեքս 1-ին փրիազոլների (a-d) միացման արդյունքները

№	Նուկլեոֆիլ	Հարաբերակցություն, % *			Ժամանակ (ժ)	Քիմիական ելք, %**
		(S,S,S)	(S,R,S)	(S,S,R)		
1	3-(թիոֆեն-2-իլ)-4-պրոպիլ-5-թիոքսո-1,2,4-տրիազոլ (a)	95,4	2,6	2,0	8	83
2	3-բուրիլ-4-(ֆուրան-1-իլ-մեթիլ)-5-թիոքսո-1,2,4-տրիազոլ (b)***	95,2 (94,18)	1,9 (2,37)	2,9 (3,45)	7	75
3	3-բուրիլ-4-պրոպիլ-5-թիոքսո-1,2,4-տրիազոլ (c)	94,2	2,4	3,4	7,5	87
4	3-բուրիլ-4-(2-մեթիլ-ալիլ)-5-թիոքսո-1,2,4-տրիազոլ (d)	96,5	1,8	1,7	7,5	77

*-Դիաստերեոմերների հարաբերակցությունը ըստ ¹H ՄՄՌ տվյալների:

**-Դիաստերեոմեր կոմպլեքսների խառնուրդի քիմիական ելքը, նուկլեոֆիլ միացման փուլում՝ ըստ ՆՇՔ տվյալների:

***-Փակագծերում նշված են դիաստերեոմերների հարաբերակցությունը ըստ քիրալային ԲԱՀՔ անալիզի տվյալների:

Աղյուսակ 2.

Կոմպլեքս 1-ին փրաբեր պայմաններում 2-մերկապրոբենզիմիդազոլի միացման արդյունքները

№	Միջավայր/հիմք	Հարաբերակցություն, %			Ժամանակ, (ժ)	Քիմիական ելք, %***
		(S,S,S)	(S,R,S)	(S,S,R)		
1. *	CH ₃ CN/ K ₂ CO ₃	96,3 (95,98)	2,1 (2,27)	1,6 (1,75)	12	90
2. **	ԴՄՖ/ K ₂ CO ₃	70	10	20	25	40
3. **	CH ₃ CN/ Na ₂ CO ₃	60	20	20	47	30
4.	CH ₃ CN/ NaOH	ռեակցիայի ընթացք չի դիտվում				

*-Դիաստերեոիզոմերների հարաբերակցությունը ըստ քիրալային ԲԱՀՔ անալիզի տվյալների: Փակագծերում բերված է դիաստերեոմերների հարաբերակցությունը ըստ ¹H ՄՄՌ տվյալների:

**-Դիաստերեոմերների հարաբերակցությունը ըստ ՆՇՔ տվյալների:

***-Դիաստերեոմեր կոմպլեքսների խառնուրդի քիմիական ելքը նուկլեոֆիլ միացման փուլում՝ ըստ ՆՇՔ տվյալների:

Ըստ ՆՇՔ տվյալների, (E)-դեհիդրոամինակարագաթթվի կոմպլեքսին (1) նուկլեոֆիլների միացման արագությունը գերազանցում է (Z)- կոմպլեքսին (2) նուկլեոֆիլների միացման արագությանը: Հավանաբար դա պայմանավորված է տարածական գործոններով, քանի որ (Z)- կոմպլեքսի (2) դեպքում նուկլեոֆիլի մոտեցումը C=C կապին տարածապես դժվարացված է ինչպես N-բենզիլպրոլինի մնացորդի ֆենիլային օղակի կողմից Շիֆի հիմքի հարթության տարածական էկրանացմամբ, այնպես էլ սեփական դեհիդրոամինաթթվային մնացորդի β-CH₃ խմբի ստեղծած լրացուցիչ տարածական էկրանացմամբ: Վերջինս բացակայում է (E)-դեհիդրոամինակարագաթթվի կոմպլեքսի (1) դեպքում:

Նպատակային հետերոցիկլիկ տեղակալված ամինաթթուները անջատվել են ստանդարտ եղանակով, բյուրեղացվել են ջրային էթանոլից (սխեմաներ 1 և 2): Նոր սինթեզված ամինաթթուների, ինչպես նաև նրանց միջանկյալ կոմպլեքսների կառուցվածքն ու բացարձակ կոնֆիգուրացիան պարզաբանվել են ֆիզիկաքիմիական անալիզի ժամանակակից մեթոդներով: Աղյուսակ 3-ում բերված են սինթեզված ամինաթթուների բանաձևերը և քիրաօպտիկական տվյալները:

Աղյուսակ 3.

Նոր սինթեզված ամինաթթուների բնութագրական տվյալները

№	Ամինաթթու	Կառուցվածքային բանաձև	ee, %	$[\alpha]_D^{20}$	$T_{\text{հալ.}}^{\circ}\text{C}$
1.	(2S,3S)-β-[3-(թիոֆեն-2-իլ)-4-պրոպիլ]-5-թիոքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ամինակարագաթթու (NSAA-5a)		98,2	+ 10,232°	204-205
2.	(2S,3S)-β-[3-բուրիլ-4-(ֆուրան-2-իլմեթիլ)-5-թիոքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ամինակարագաթթու (NSAA-5b)		98,6	- 30,36°	197-199
3.	(2S,3S)-β-[3-բուրիլ-4-պրոպիլ]-5-թիոքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ամինակարագաթթու (NSAA-5c)		98,9	- 10,67°	204,5
4.	(2S,3S)-β-[2-թիոքսո-2,3-դիհիդրոբենզո[4,5-d]իզազոլ-1-իլ]-α-ամինակարագաթթու (NSAA-6)		98,1	- 20,91°	153-154

Այսպիսով, սույն ատենախոսական աշխատանքի շրջանակներում իրականացված հետազոտությունների արդյունքում հաջողվել է ստանալ (S)-α-ամինակարագաթթվի հետերոցիկլիկ տեղակալված չորս նոր նմանակներ, պարզաբանվել է դրանց կառուցվածքն ու բացարձակ կոնֆիգուրացիան, մշակվել է դրանց կենսամիմետիկ ասիմետրիկ սինթեզի ընդհանուր եղանակ:

2. α-Ամինակարագաթթվի նոր սինթեզված ածանցյալների հակաօքսիդանտային ակտիվության և բջջային և ներբջջային թաղանթների NADPH օքսիդազի իզոնների արտազատման գործընթացի վրա ազդեցության ուսումնասիրությունը

Հաստատվել է, որ NSAA-5c և NSAA-6 ամինաթթուները ցուցաբերում են խտություն կախյալ հակաօքսիդանտային ակտիվություն՝ շնորհիվ վերջիններիս մոտ առկա ՍՕԴ-միմետիկ ակտիվության: Ջրածնի պերօքսիդի քայքայման հետևանքով առաջացած սուպերօքսիդ ռադիկալները չեզոքացվում են այդ ամինաթթուներով և ընկճվում է ԿԲԿ-ի վերականգնումը այդ ռադիկալներով, ինչի արդյունքում նկատվում է ԿԲԿ-ի մաքսիմալ օպտիկական կլանման խտության անկում 580 նմ ալիքի տակ:

Ամինաթթուների տեսակարար հակաօքսիդանտային ակտիվությունը որոշվել է էքստրապոլման միջոցով, որը կազմել է համապատասխանաբար $20,0 \pm 0,2$ և $27,5 \pm 3,7$ միավոր/մգ/մլ ($P < 0,01$, $n = 6$):

Ուսումնասիրվել է NSAA-5c-ի ազդեցությունը սպիտակ ոչ ցեղային առնետների թոքային և երիկամային հյուսվածքներից առանձնացված բջջային և ներբջջային (կորիզային, միտոքոնդրիալ), ցուլի լյարդի միտոքոնդրիալ, ինչպես նաև դոնորական արյան էրիթրոցիտների թաղանթներից NADPH օքսիդազի իզոմերների (Nox1+Nox2) գումարային ֆրակցիայի ֆերիHb-ով հարուցված արտազատման (ռիլիզինգի) գործընթացի վրա: Պարզվել է, որ ամինաթթուն $0,3$ մգ/մլ կոնցենտրացիայով ցուցաբերում է թաղանթներից Nox-երի ֆրակցիայի ֆերիհեմոգլոբինով հարուցված ընտրողական արտազատումն (ռիլիզինգը) ընկճելու ունակություն (աղյուսակ 4), չազդելով վերջիններիս օպտիկ-սպեկտրալ հատկանիշների վրա: NSAA-5c-ի ազդեցությամբ վիճակագրորեն նշանակալի ձևով, նվազում է թաղանթներից անջատված Nox1+Nox2 իզոմերների β -կլանման խտությունը 530 նմ ալիքի տակ, ինչը վկայում է հետազոտվող միացության թաղանթակայունացնող ազդեցության մասին:

Աղյուսակ 4.

Nox-երի ֆրակցիայի առավելագույն օպտիկական կլանման խտության արժեքները (530 նմ)

<i>Առնետների թոքային հյուսվածքից առանձնացված թաղանթներ</i>	<i>ցիտոպլազմային թաղանթներ (n=6)</i>	<i>կորիզային թաղանթներ (n=6)</i>	<i>միտոքոնդրիալ թաղանթներ (n=6)</i>
Ստուգիչ խումբ	$0,33 \pm 0,006$	$0,41 \pm 0,009$	$0,26 \pm 0,008$
Փորձնական խումբ	$0,21 \pm 0,008$ $P < 0,001$	$0,28 \pm 0,003$ $P < 0,001$	$0,18 \pm 0,005$ $P < 0,05$
Տարբերություն, %	$\downarrow 36,4$	$\downarrow 31,7$	$\downarrow 30,8$
<i>Առնետների երիկամային հյուսվածքից առանձնացված թաղանթներ</i>	<i>ցիտոպլազմային թաղանթներ (n=6)</i>	<i>կորիզային թաղանթներ (n=6)</i>	<i>միտոքոնդրիալ թաղանթներ (n=6)</i>
Ստուգիչ խումբ	$0,24 \pm 0,006$	$0,31 \pm 0,008$	$0,21 \pm 0,008$
Փորձնական խումբ	$0,18 \pm 0,006$ $P < 0,001$	$0,23 \pm 0,005$ $P < 0,001$	$0,18 \pm 0,008$ $P < 0,05$
Տարբերություն, %	$\downarrow 25,0$	$\downarrow 25,8$	$\downarrow 14,3$
-	<i>Ցուլի լյարդի միտոքոնդրիալ թաղանթներ (n=6)</i>	<i>Էրիթրոցիտների թաղանթներ (n=6)</i>	
Ստուգիչ խումբ	$0,24 \pm 0,008$	$0,23 \pm 0,005$	
Փորձնական խումբ	$0,16 \pm 0,006$ $P < 0,001$	$0,12 \pm 0,004$ $P < 0,001$	
Տարբերություն, %	$\downarrow 33,6$	$\downarrow 47,8$	

Հաստատված է, որ ուսումնասիրված բջջային և ներբջջային թաղանթների վրա NSAA-5c-ի պաշտպանիչ ազդեցության հիմքում ընկած է վերջինիս հակաօքսիդանտային ակտիվությունը՝ լիպիդային գերօքսիդացման գործընթացների արգելակմամբ, և թաղանթակայունացնող ազդեցությունը, որն իրականացվում է

թաղանթային կառուցվածքների կարևոր բաղադրիչ հանդիսացող NADPH օքսիդազների իզոմերների գումարային ֆրակցիայի հեմոգլոբինով հարուցված ռիլիզինգի ընկճմամբ:

Հարկ է նշել, որ, ի տարբերություն հակաօքսիդանտային ակտիվության գլխավոր ֆերմենտի՝ Cu,Zn-UO²-ի, որը ապասկտիվանում է ավելորդ գեներացվող HO[•] ռադիկալներով, NSAA-5c ամինաթթուն, ընդհակառակը, արգելակում է թաղանթային գոյացություններում ազատռադիկալային օքսիդացման գործընթացները, ինչն ընդհանուր առմամբ վկայում է հետազոտվող ամինաթթվի մոտ ունիվերսալ թաղանթապաշտպանիչ հատկությունների առկայության մասին:

α-Ամինակարագաթթվի նոր սինթեզված ածանցյալների և որոշ էնդոգեն հակաօքսիդանտների (վիտամին C, տաուրին, L-արգինին) տեսակարար հակաօքսիդանտային ակտիվությունների համեմատական քանակական վերլուծության արդյունքում պարզ է դարձել, որ NSAA-5c և NSAA-6 ամինաթթուները (հատկապես NSAA-6-ը) իրենց տեսակարար հակաօքսիդանտային ակտիվության մակարդակով համարյա հավասարազոր են տաուրինին, գրեթե եռակի անգամ գերազանցում են սպիտակուցային ամինաթթու L-արգինինի հակաօքսիդանտային ակտիվությանը: Միաժամանակ հայտնաբերվել է, որ գոյացող սուպերօքսիդային ռադիկալների ստացիոնար կոնցենտրացիան համապատասխանաբար մեծանում է հետազոտվող միացությունների տեսակարար հակաօքսիդանտային ակտիվությունների նվազմանը զուգընթաց (աղյուսակ 5):

Աղյուսակ 5.

Հեպազոտվող միացությունների տեսակարար հակաօքսիդանտային ակտիվությունները և սուպերօքսիդային ռադիկալների գոյացման արագությունը

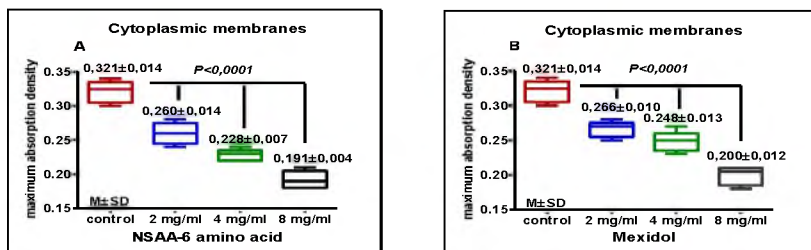
Հեպազոտվող միացություններ	Տեսակարար հակաօքսիդանտային ակտիվություն (միավոր/մգ/մլ) $M \pm SD$	O₂^{•-}-ի առաջացման արագություն ($\times 10^6 U/րոպե$)
Վիտամին “C”	36,0 $\pm$ 4,8	0,9
Տաուրին	29,5 $\pm$ 3,4	1,0
NSAA-6 ամինաթթու	27,5 $\pm$ 3,7	1,5
NSAA-5c ամինաթթու	22,0 $\pm$ 2,1	2,5
L-արգինին	7,5 $\pm$ 1,6	4,0*

* սուպերօքսիդային ռադիկալների գոյացման արագությունը հակաօքսիդանտների բացակայության պայմաններում կազմում է $5 \times 10^{-6} U/ր$

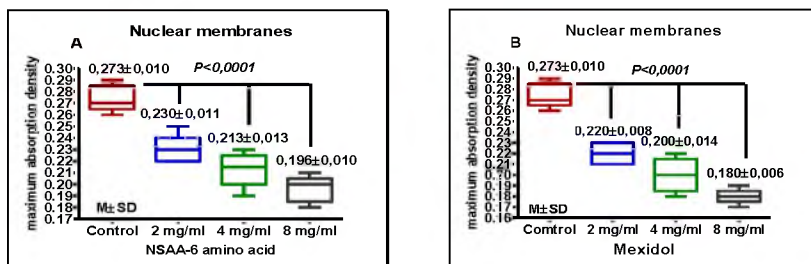
Ստացված արդյունքները նոր հեռանկարներ են բացում նշված ամինաթթուների հետագա ավելի խորը ուսումնասիրությունների համար՝ որպես թաղանթակայունացող հատկություններով օժտված պոտենցիալ հակաօքսիդանտների:

3. Նեյրոնալ թաղանթներից (պլազմատիկ, կորիզային, միտոքոնդրիալ) NADPH օքսիդազի իզոնների արտազատման գործընթացի վրա NSAA-6 ամինաթթվի և մեքսիդոլի արգելակող ազդեցության համեմատական ուսումնասիրությունը

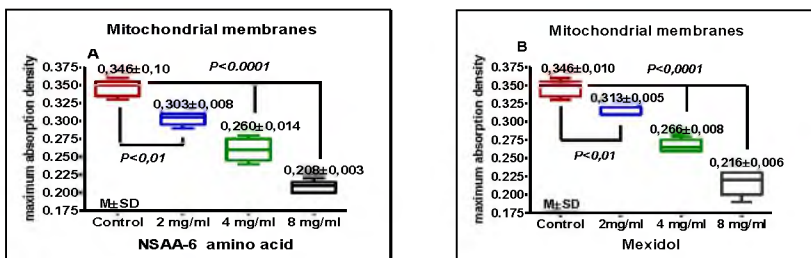
Ուսումնասիրության արդյունքում հաստատվել է, որ սպիտակ, ոչ ցեղային առնետների ուղեղային հյուսվածքից առանձնացված նեյրոնալ թաղանթների ինկուբացիան NSAA-6 ամինաթթվի և թաղանթակայունացնող հատկություններով օժտված մեքսիդոլի հետ հանգեցնում է Nox-երի գումարային ֆրակցիայի ֆերիHb-ով հարուցված արտազատման ընկճման և այն կրում է դոզա-կախյալ բնույթ (նկ. 1-4):



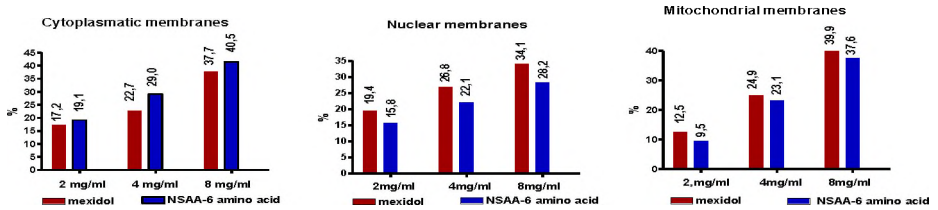
Նկար 1. Նեյրոնների առանձնացված բջջաթաղանթներից Nox-երի ռիլիզինգի վրա NSAA-6 ամինաթթվի (A) և մեքսիդոլի (B) աճող քանակությունների արգելակող ազդեցությունը



Նկար 2. Նեյրոնների առանձնացված կորիզաթաղանթներից Nox-երի ռիլիզինգի վրա NSAA-6 ամինաթթվի (A) և մեքսիդոլի (B) աճող քանակությունների արգելակող ազդեցությունը



Նկար 3. Նեյրոնների առանձնացված միտոքոնդրիալ թաղանթներից Nox-երի ռիլիզինգի վրա NSAA-6 ամինաթթվի (A) և մեքսիդոլի (B) աճող քանակությունների արգելակող ազդեցությունը



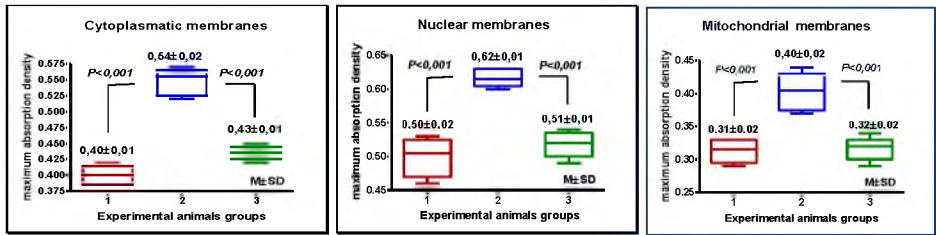
Նկար 4. Առանձնացված նեյրոնալ թաղանթներից Nox-երի ռիլիզինգի վրա NSAA-6 ամինաթթվի և մեքսիդոլի ածող քանակությունների արգելակող ազդեցության համեմատական քանակական բնութագիրը (%-ով)

Որոշվել և համեմատվել են նաև նշված միացությունների տեսակարար հակաօքսիդանտային ակտիվության արժեքները: Մասնավորապես հաստատվել է, որ NSAA-6 ամինաթթուն, թեև իր տեսակարար հակաօքսիդանտային ակտիվության ցուցանիշով (27,5 միավոր/մգ/մլ) զիջում է մեքսիդոլին (40,1 միավոր/մգ/մլ), նրանց արգելակող ազդեցության արտահայտվածությունը նեյրոնների բջջային և ներբջջային թաղանթներից Nox-երի արտազատման վրա գրեթե համարժեք են: Հետևապես, հիմքեր կան եզրակացնելու, որ նեյրոնալ թաղանթների վրա NSAA-6 ամինաթթվի նյարդապաշտպան և թաղանթակայունացնող ազդեցության հիմքում ընկած է պաշտպանական մի քանի մեխանիզմների համադրություն. NADPH օքսիդազի իզոձների արտազատման արգելակումը և հակաօքսիդանտային ակտիվությունը:

4. α-Ամինակարագաթթվի նոր սինթեզված ածանցյալի թաղանթապաշտպանիչ ազդեցության մեխանիզմները օքսիդատիվ-նիտրոզատիվ սթրեսի (ՕՆՍ) պայմաններում

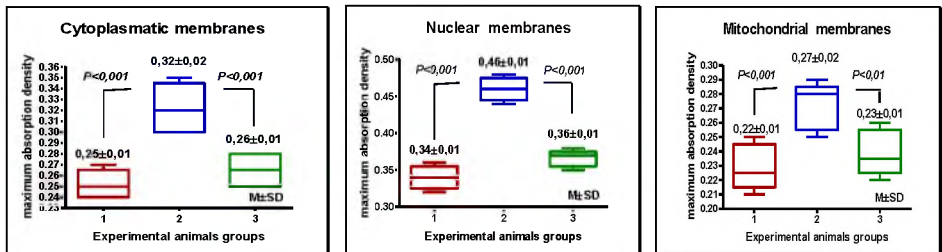
Հիպերամոնեմիայի փորձարարական մոդելի մոտ հետազոտվել է NSAA-6 ամինաթթվի կանխատեսվող մոդուլացնող ազդեցությունը ուղեղային և յարդային հյուսվածքների առանցքային պրոօքսիդանտային համակարգերի մակարդակի վրա: Ուսումնասիրվել է ՕՆՍ-ի ժամանակ առնետների նեյրոնների և հեպատոցիտների պլազմատիկ, կորիզային և միտոքոնդրիալ թաղանթների NADPH օքսիդազի իզոձների գոմարային ֆրակցիայի (Nox1+Nox2) քանակական և որակական փոփոխությունները և դրանց վրա NSAA-6 ամինաթթվի թողած ազդեցությունը: Պարզվել է, որ ՕՆՍ-ով կենդանիների շրջանում (I խումբ) նեյրոնալ թաղանթներից արտազատված Nox-երի օպտիկական կլանման խտության արժեքի փոփոխությունը (360 նմ) վիճակագրորեն նշանակալիորեն բարձր է (համապատասխանաբար 35%, 24% և 13%-ով) ստուգիչ խմբի համեմատ:

Հատկանշական է, որ II խմբի կենդանիների մոտ ՕՆՍ-ի զարգացման ֆոնին NSAA-6 ամինաթթվի ներորովայնային ներմուծումից հետո (20 մգ/կգ) նկատվում է Nox-երի օպտիկական կլանման խտության արժեքի վիճակագրորեն նշանակալի նվազում՝ նեյրոնալ բջջաթաղանթների մոտ՝ 20%-ով, կորիզային թաղանթների մոտ՝ 18%-ով և միտոքոնդրիալ թաղանթների մոտ՝ 20%-ով (նկ. 5):



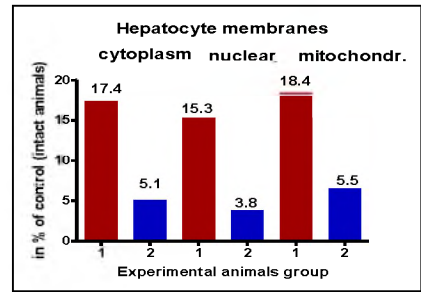
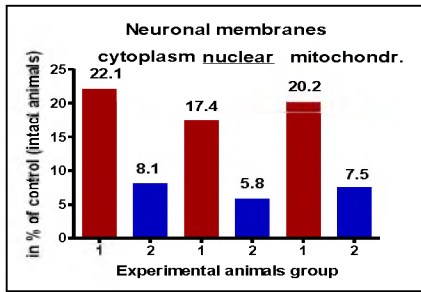
Նկար 5. Ներյոնալ թաղանթներից անջատված Nox-երի ֆրակցիայի մաքսիմալ օպտիկական կլանման ինտենսիվությունները 360 նմ ալիքի երկարության տակ (1- սպուգիչ խումբ, 2- ՕՆՍ, 3- NSAA-6 ամինաթթվի ներմուծում ՕՆՍ-ի ժամանակ)

ՕՆՍ-ով կենդանիների շրջանում հեպատոցիտների նշված թաղանթներից արտազատված Nox-երի օպտիկական կլանման խտության արժեքի փոփոխությունը (360 նմ) վիճակագրորեն նշանակալիորեն բարձր է (համապատասխանաբար՝ 28%, 35% և 23%-ով) ստուգիչ խմբի համեմատ: ՕՆՍ-ի զարգացման ֆոնին NSAA-6 ամինաթթվի ներդրվայնային ներմուծումից հետո (20 մգ/կգ) նկատվում է Nox-երի օպտիկական կլանման խտության արժեքի վիճակագրորեն նշանակալի նվազում՝ հեպատոցիտների բջջաթաղանթների մոտ՝ 19,4%-ով, կորիզային թաղանթների մոտ՝ 22,8%-ով և միտոքոնդրիալ թաղանթների մոտ՝ 15%-ով (նկ. 6):



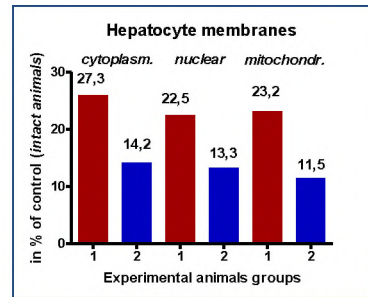
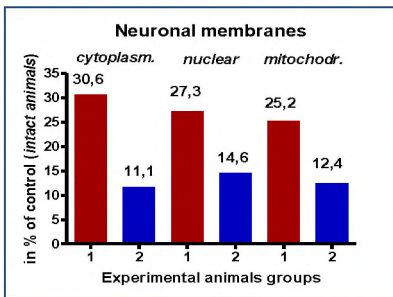
Նկար 6. Հեպատոցիտների թաղանթներից անջատված Nox-երի ֆրակցիայի մաքսիմալ օպտիկական կլանման ինտենսիվությունները 360 նմ ալիքի երկարության տակ (1- սպուգիչ խումբ, 2- ՕՆՍ, 3- NSAA-6 ամինաթթվի ներմուծում ՕՆՍ-ի ժամանակ)

ՕՆՍ-ով կենդանիների շրջանում 360 նմ-ի տակ NADPH օքսիդազի մաքսիմալ օպտիկական կլանման խտության մեծացումը վկայում է ներյոնների թաղանթային կառուցվածքներում հետազոտվող Nox-երի կազմում FAD-ի մակարդակի բարձրացման մասին, ինչը նպաստում է նշված կենսաաղբյուրներից վերջիններիս սուպերօքսիդ-առաջացնող ակտիվության մեծացմանը: NSAA-6 ամինաթթվի թաղանթապաշտպանիչ ազդեցության դրսևորումներից է նաև նրա ունակությունը կանխելու ՕՆՍ-ի ժամանակ դիտվող Nox1+Nox2-ի իզոմների NADPH կախյալ սուպերօքսիդ-գոյացնող ակտիվության բարձրացումը (նկ. 7): NSAA-6-ի ազդեցությամբ դիտվում է Nox-ի իզոմների սուպերօքսիդ առաջացնող ակտիվության մոտեցում նորմային (ստուգիչի ցուցանիշներին):



Նկար 7. Նեյրոնների և հեպատոցիտների պլազմատիկ, կորիզային և միտոքոնդրիալ թաղանթներից անջատված Nox1+Nox2-ի իզոմերների NADPH կախյալ սուպերօքսիդ-գոյացնող ակտիվության համեմատական փոփոխությունը %-ով (1- ՕՆՍ, 2- NSAA-6 ամինաթթվի ներմուծում ՕՆՍ-ի ժամանակ)

Հաջորդ քայլով ուսումնասիրվել է NSAA-6 ամինաթթվի ազդեցությունը ՕՆՍ-ի ժամանակ նեյրոնների և հեպատոցիտների պլազմատիկ, կորիզային և միտոքոնդրիալ թաղանթներից Nox1+Nox2-ի իզոմերների գումարային ֆրակցիայի հեմոլիզինով հարուցված արտազատման աստիճանի վրա: Հաստատվել է, որ փորձարարական կենդանիների մոտ նշված թաղանթներից Nox-ի իզոմերների արտազատման ժամանակ դրանց β -կլանման մաքսիմալ օպտիկական խտությունը 530 նմ-ի տակ զգալիորեն բարձրանում է ՕՆՍ-ի զարգացման ժամանակ, համեմատած ստուգիչ խմբի հետ: NSAA-6 ամինաթթվի ազդեցությամբ նկատվում է Nox-ի իզոմերների գումարային ֆրակցիայի մակարդակի մոտեցում ստուգիչի ցուցանիշներին՝ ինչպես հեպատոցիտների, այնպես էլ նեյրոնալ թաղանթների մոտ (նկ.8):



Նկար 8. Նեյրոնների և հեպատոցիտների պլազմատիկ, կորիզային և միտոքոնդրիալ թաղանթներից արտազատված Nox1+Nox2-ի իզոմերների գումարային ֆրակցիայի β -կլանման մաքսիմալ օպտիկական խտության մակարդակի համեմատական փոփոխությունը 530 նմ ալիքի երկարության վրակ (1- ՕՆՍ, 2- NSAA-6 ամինաթթվի ներմուծում ՕՆՍ-ի ժամանակ)

Փորձարարական կենդանիների մոտ ՕՆՍ-ի մոդելի պայմաններում α -ամինակարագաթթվի հետերոցիկլիկ տեղակալված նոր ածանցյալի՝ NSAA-6 ամինաթթվի մոտ հայտնաբերված թաղանթապաշտպանիչ ազդեցությունը նեյրոնալ բջջաթաղանթների, կորիզային և միտոքոնդրիալ թաղանթների նկատմամբ, որն

իրականանում է շնորհիվ վերջինիս հակաօքսիդանտային ակտիվության, հիմք է տալիս նրան դիտարկելու որպես նոր հեռանկարային նյարդապաշտպանիչ միջոց:

ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. Մշակվել է α -ամինակարազաթթվի հետերոցիկլիկ նմանակների ասիմետրիկ կենսամիմետիկ սինթեզի ընդհանուր մեթոդ ($de \sim 90\%$): Հետազոտվել են (E)- և (Z)-դեհիդրոամինակարազաթթվի և (S)-BPB քիրալային օժանդակ ռեագենտի Շիֆի հիմքի հարթ-քառակուսային Ni^{II} կոմպլեքսների էլեկտրոֆիլ $C=C$ կապին տարաբնույթ հետերոցիկլերի նուկլեոֆիլ միացման ռեակցիաները:
2. Բարձր էնանտիոմերային մաքրությամբ ($ee > 98\%$) սինթեզվել են α -ամինակարազաթթվի 4 նոր հետերոցիկլիկ տեղակալված նմանակներ, հետազոտվել և բացահայտվել են դրանց կառուցվածքը, բացարձակ կոնֆիգուրացիան և օպտիկական մաքրության աստիճանը:
3. Բացահայտվել է, որ α -ամինակարազաթթվի նոր սինթետիկ նմանակները՝ NSAA-5c և NSAA-6 ամինաթթուները ցուցաբերում են դոզա-կախյալ հակաօքսիդանտային ազդեցություն, շնորհիվ ՍՕԴ-միմետիկ ակտիվության: Նրանց տեսակարար հակաօքսիդանտային ակտիվությունները կազմել են համապատասխանաբար $22,0 \pm 0,2$ և $27,5 \pm 0,2$ միավոր/մգ/մլ ($P < 0,01$, $n=6$):
4. Բացահայտվել է, որ NSAA-5c ամինաթթուն ընկճում է տարբեր հյուսվածքներից առանձնացված բջիջների պլազմատիկ, միտոքոնդրիալ, կորիզային, ինչպես նաև էրիթրոցիտար թաղանթներից NADPH օքսիդազի իզոձների գոմարային ֆրակցիայի ֆերիHb-ով հարուցված արտազատումը, ինչը վկայում է հետազոտվող միացության թաղանթակայունացնող ազդեցության մասին:
5. Համեմատական քանակական վերլուծության արդյունքում բացահայտվել է, որ այդ ամինաթթուները, և հատկապես՝ NSAA-6-ն, իրենց տեսակարար հակաօքսիդանտային ակտիվության մակարդակով գրեթե հավասարագոր են էնդոգեն հակաօքսիդանտ տաուրինին և համարյա եռակի անգամ գերազանցում են L-արգինինին:
6. Բացահայտվել է, որ NSAA-6 ամինաթթվի և մեքսիդոլի դոզա-կախյալ արգելակող ազդեցությունը առանձնացված նեյրոնների պլազմատիկ, միտոքոնդրիալ և կորիզային թաղանթներից NADPH օքսիդազի իզոձների ռիլիզինգի վրա գրեթե համարժեք է, չնայած որ NSAA-6-ն իր տեսակարար հակաօքսիդանտային ակտիվության արժեքով զիջում է մեքսիդոլին:
7. Ցույց է տրվել, որ օքսիդատիվ-նիտրոզատիվ սթրեսի մոդելավորման պայմաններում NSAA-6 ամինաթթուն ցուցաբերում է թաղանթակայունացնող ազդեցություն նեյրոնների և հեպատոցիտների պլազմատիկ, միտոքոնդրիալ և կորիզային թաղանթների նկատմամբ, ընկճում է դրանցից NADPH օքսիդազի գոմարային ֆրակցիայի արտազատումը, արտահայտված նվազեցում է վերջինիս սուպերօքսիդ գոյացնող ակտիվությունը:

**ԱՏԵՆԱՆՈՍՈՒԹՅԱՆ ԹԵՄԱՅՈՎ ՀՐԱՏԱՐԱԿԱԾ ԳԻՏԱԿԱՆ
ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐԻ ՑԱՆԿ**

1. Саакян Л.Ю., Симонян Р.М., Симонян Г.М., Симонян М.А., Секоян Э.С., Сагян А.С. Механизмы мембранопротекторного действия нового β -гетероциклически замещенного синтетического аналога α -аминомасляной кислоты при оксидативно-нитрозативном стрессе // Вопросы теоретической и клинической медицины, 2018, 21, N4 (123), 26-31.
2. Саакян Л.Ю. Сравнительное ингибирующее действие β -гетероциклически замещенного аналога α -аминомасляной кислоты и мексидола на процесс рилизинга изоформ NADPH-оксидаз нейрональных мембран, Медицинская наука Армении НАН РА 2018, т. LVIII №4, 50-58.
3. Саакян Л.Ю., Симонян Г.М., Симонян Р.М., Симонян М.А., Секоян Э.С., Сагян А.С. Сравнительное изучение антиоксидантной активности β -гетероциклически замещенных аналогов α -аминомасляной кислоты и некоторых эндогенных антиоксидантов // Вопросы теоретической и клинической медицины, 2018, 21, N1 (118), 3-6.
4. Саакян Л.Ю. Асимметрический синтез (2S,3S)-3-(2-тиоксо-2,3-дигидробензимидазол-1-ил)-2-аминомасляной кислоты // Химический журнал Армении, 2018, N71, 1-2, 117-125.
5. Саакян Л.Ю., Симонян Р.М., Симонян Г.М., Симонян М.А., Секоян Э.С., Сагян А.С. Механизмы протекторного действия β -гетероциклически замещенного аналога α -аминомасляной кислоты на клеточные и субклеточные мембраны // Вопросы теоретической и клинической медицины, 2017, 20, N4 (114), 16-19.
6. Саакян Л.Ю., Симонян Г.М., Симонян Р.М., Симонян М.А., Секоян Э.С., Сагян А.С. Антиоксидантная активность и механизмы мембраностабилизирующего действия нового β -гетероциклически замещенного аналога α -аминомасляной кислоты // Вопросы теоретической и клинической медицины, 2017, 20, N2 (112), 64-67.
7. Сагян А.С., Саакян Л.Ю., Симонян А.М., Петросян С.Г., Мкртчян А.Ф., Самвелян М.А., Кочикян Т.В., Лангер П. Асимметрический синтез новых гетероциклически замещенных аналогов α -аминомасляной кислоты, содержащих замещенные триазольные группы в боковом радикале // Химический журнал Армении, 2017, N70, 1-2, 71-81.
8. Sahakyan L., Simonyan H., Petrosyan S., Mkrtchyan A., Saghyan A., Sekoyan E. Asymmetric synthesis of optically active derivatives of α -aminobutyric acid containing triazole groups in the side chain radical // "Current State of Pharmacy and Prospects of its Development" 1st International Scientific Conference, November 01-03, 2018, Yerevan, Book of abstracts, 106-107.
9. Sahakyan L., Saghyan A., Simonyan H., Petrosyan S., Mkrtchyan A. Asymmetric synthesis of enantiomerically enriched analog of α -aminobutyric acid containing heterocycle in the side chain radical // IV International Scientific Conference of Young

Researcher, Biotechnology: Science and Practice, September 28-30, 2017, Yerevan, Book of abstracts, 141-142.

10. Sahakyan L.Yu., Simonyan H.M., Petrosyan S.Gh., Mkrtchyan A.F., Simonyan M.A., Saghyan A.S., Sekoyan E.S. Asymmetric synthesis and biological activity of novel heterocycle substituted analogues of α -aminobutyric acid // VIII International Conference, Modern Aspects of Rehabilitation in Medicine, September 13-15, 2017, Yerevan (Artsakh), Book of abstracts, 344.

СААКЯН ЛУСИНЕ ЮРИКОВНА

**БИОМИМЕТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ НЕБЕЛКОВЫХ
АНАЛОГОВ α -АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ, ИЗУЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНЫХ
И МЕМБРАНОЗАЩИТНЫХ СВОЙСТВ**

РЕЗЮМЕ

Ключевые слова: *небелковые аминокислоты, α -аминомасляная кислота, биомиметический асимметрический синтез, оптическая активность, энантиомеры, антиоксидантная активность, супероксидный радикал, NADPH оксидаза, клеточные мембраны.*

Диссертационная работа посвящена биомиметическому асимметрическому синтезу оптически активных, новых небелковых аналогов α -аминомасляной кислоты, содержащих различные гетероциклические группы в боковом радикале, и изучению их антиоксидантных и мембранозащитных свойств.

Разработаны высокоселективные методы асимметрического присоединения ряда гетероциклических нуклеофилов к C=C связи Ni^{II} комплексов оснований Шиффа (E)- и (Z)-дегидроаминомасляной кислоты с хиральными вспомогательными реагентом (S)-BPB. В результате были получены четыре новые оптически активные гетероциклические производные (S)- α -аминомасляной кислоты: (2S, 3S)- β -[3-(тиофен-2-ил)-4-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аминомасляная кислота (NSAA-5a), (2S, 3S)- β -[3-бутил-4-(фуран-2-илметил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аминомасляная кислота (NSAA-5b), (2S, 3S)- β -[3-бутил-4-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аминомасляная кислота (NSAA-5c), (2S, 3S)-3-[2-тиоксо-2,3-дигидробензимидазол-1-ил]- α -аминомасляная кислота (NSAA-6): Структура и абсолютная конфигурация аминокислот, а так же их промежуточных комплексов исследованы и установлены современными физико-химическими методами анализа (1H - и ^{13}C -ЯМР, элементный анализ, хиральные ВЭЖХ анализ, поляриметрические измерения и т.д.).

Исследование антиоксидантной активности новых аналогов α -аминомасляной кислоты показало, что аминокислоты NSAA-5c и NSAA-6 проявляют дозозависимую антиоксидантную активность за счет своей SOD-миметической активности. Супероксидные радикалы, образующиеся при разложении перекиси водорода, нейтрализуются этими аминокислотами, и подавляется восстановление КБС этими радикалами, что приводит к снижению плотности максимальной оптического

поглощения этого красителя при 580 нм. Удельная антиоксидантная активность аминокислот составила $20,0 \pm 0,2$ и $27,5 \pm 3,7$ ед./мг/мл соответственно ($P < 0,01$, $n=6$).

При исследовании влияния NSAA-5с на процесс гемоглобин-индуцированного высвобождения суммарной фракции изоформ NADPH оксидазы (Nox1+Nox2) из клеточных и внутриклеточных (ядерные, митохондриальные) мембран, выделенных из легочной и почечной тканей белых беспородных крыс, митохондриальных мембран бычьей печени, а так же из мембран эритроцитов донорской крови, установлено, что аминокислота в концентрации 0,3 мг/мл обладает способностью ингибировать рилизинг фракции Nox из мембран, не влияя на оптико-спектральные свойства последних, что указывает на мембраностабилизирующий эффект исследуемого соединения.

Сравнительный количественный анализ удельной антиоксидантной активности NSAA-5с и NSAA-6 аминокислот и некоторых эндогенных антиоксидантов, (витамин С, таурин, L-аргинин) показал, что аминокислоты обладают антиоксидантной активностью почти эквивалентную таурину, и в три раза превосходящую антиоксидантную активность небелковой аминокислоты L-аргинина.

Сравнительное изучение ингибирующего действия аминокислоты NSAA-6 и мексидола на рилизинг изоформ NADPH оксидазы из изолированных нейрональных мембран (плазматической, ядерной, митохондриальной) выделенных из ткани мозга белых беспородных крыс и их антиоксидантной активности показало, что хотя по уровню показателя удельной антиоксидантной активности NSAA-6 ($27,5$ ед./мг/мл) значительно уступает мексидолу ($40,1$ ед./мг/мл), степень выраженности их дозозависимого ингибирующего действия на рилизинг изоформ Nox1+Nox2 из нейрональных мембран в количественном отношении примерно равнозначна. Следовательно, имеются основания заключить, что в основе реализации нейропротекторного действия NSAA-6 на нейронные мембраны лежит совокупность механизмов защиты: ингибирование рилизинга изоформ NADPH оксидаз и антиоксидантное действие.

На экспериментальной модели гипераммонемии изучено действие NSAA-6 на уровень изоформ NADPH оксидазы мембран нейронов и гепатоцитов (плазматической, ядерной, митохондриальной) белых беспородных крыс при оксидативно-нитрозативном стрессе (ОНС).

Как следует из представленных данных, у животных с ОНС показатель изменения плотности максимального оптического поглощения (при 360 нм) для суммарной фракции изоформ Nox1+Nox2 из указанных мембран нейронов и гепатоцитов статистически значимо выше, чем в контрольной группе, а на фоне развития ОНС после курсового в/в введения животным NSAA-6 (20 мг/кг) отмечается статистически значимое снижение показателя плотности максимального оптического поглощения для фракции Nox. Также было показано, что максимальная оптическая плотность их β -поглощения при 530 нм во время высвобождения Nox из указанных мембран у экспериментальных животных значительно выше при ОНС по сравнению с контрольной группой. Под влиянием аминокислоты NSAA-6 наблюдается близость

уровня общей фракции изоформ Nox к контрольным показателям как в гепатоцитах, так и в мембранах нейронов, что свидетельствует о мембранозащитном эффекте данного соединения.

Работа выполнена в Институте фармации ЕГУ и в лаборатории «Метаболизм активного кислорода» Института биохимии им. Г. Бунятяна НАН РА.

LUSINE Yu. SAHAKYAN

BIOMIMETIC SYNTHESIS OF HETEROCYCLIC NON-PROTEIN ANALOGUES OF α -AMINOBUTYRIC ACID, STUDY OF ANTIOXIDANT AND MEMBRANE PROTECTIVE PROPERTIES

SUMMARY

Key words: *non-protein amino acids, α -aminobutyric acid, biomimetic asymmetric synthesis, optical activity, enantiomers, antioxidant activity, superoxide radical, NADPH oxidase, cell membranes.*

The dissertation is devoted to the biomimetic asymmetric synthesis of optically active, new non-protein analogs of α -aminobutyric acid containing various heterocyclic groups, as well as to the study of their antioxidant and membrane-protective properties.

Highly selective methods of asymmetric addition of various heterocyclic nucleophiles to the C=C bond of N^{II} of complexes of Schiff bases (*E*)- and (*Z*)-dehydroaminobutyric acid with chiral auxiliary reagent (*S*)-BPB have been developed. As a result, four novel optically active heterocyclic derivatives of (*S*)- α -aminobutyric acid were synthesized: (2*S*, 3*S*)- β -[3-(thiophen-2-yl)-4-propyl-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -aminobutyric acid (NSAA-5a), (2*S*, 3*S*)- β -[3-butyl-4-(furan-2-ylmethyl)-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -aminobutyric acid (NSAA-5b), (2*S*, 3*S*)- β -[3-butyl-4-propyl-5-thioxo-1,2,4-triazole-1-yl]- α -aminobutyric acid (NSAA-5c), (2*S*, 3*S*)-3-[2-thioxo-2,3-dihydrobenzimidazol-1-yl]- α -aminobutyric acid (NSAA-6): The structure and absolute configuration of amino acids, as well as their intermediate complexes, were studied and determined by modern physicochemical methods of analysis (1H - and ^{13}C -NMR, elemental analysis, chiral HPLC analysis, polarimetric measurements, etc.).

The study of the antioxidant activity of new analogs of α -aminobutyric acid showed that the amino acids NSAA-5c and NSAA-6 exhibit dose-dependent antioxidant activity due to their SOD-mimetic activity. Superoxide radicals formed during the decomposition of hydrogen peroxide are neutralized by these amino acids, and the reduction of cummasibrilliant blue by these radicals is suppressed, which leads to a decrease in the maximum optical absorption density of this dye at 580 nm. The specific antioxidant activity of amino acids was 20.0 ± 0.2 and 27.5 ± 3.7 units/mg/ml, respectively ($P < 0.01$, $n=6$).

The study of effect of NSAA-5c on the process of hemoglobin-induced releasing of the total fraction of NADPH oxidase isoforms (Nox1+Nox2) from cellular and intracellular (nuclear, mitochondrial) membranes isolated from the lung and kidney tissues of white outbred rats, mitochondrial membranes of bovine liver and also from the membranes of

erythrocytes of donor blood, revealed that the amino acid at a concentration of 0.3 mg/ml has the ability to inhibit the releasing of the Nox fraction from the membranes, without affecting its optical properties, which indicates the membrane-stabilizing effect of the compound.

Comparative quantitative analysis of the specific antioxidant activity of NSAA-5c and NSAA-6 amino acids and some endogenous antioxidants (vitamin C, taurine, L-arginine) showed that amino acids have an antioxidant activity almost equivalent to taurine, and three times higher than the antioxidant activity of non-protein amino acid L -arginine.

A comparative study of the inhibitory effect of the amino acid NSAA-6 and mexidol on the releasing of NADPH oxidase isoforms from isolated neuronal membranes (plasma, nuclear, mitochondrial) isolated from the brain tissue of white outbred rats and their antioxidant activity showed that although the level of the specific antioxidant activity of NSAA- 6 (27.5 U/mg/ml) is significantly inferior to mexidol (40.1 U/mg/ml), the severity of their dose-dependent inhibitory effect on the releasing of Nox1 + Nox2 isoforms from neuronal membranes is quantitatively approximately equivalent. Therefore, there are grounds to conclude that the implementation of the neuroprotective effect of NSAA-6 on neuronal membranes is based on a set of defense mechanisms: inhibition of the release of NADPH oxidase isoforms and antioxidant action.

An experimental model of hyperammonemia was used to study the effect of NSAA-6 on the level of NADPH oxidase isoforms in the membranes of neurons and hepatocytes (plasma, nuclear, mitochondrial) in white outbred rats under oxidative-nitrosative stress (ONS).

It was obtained that the optical absorption value of Nox isoforms (360 nm) released from the indicated membranes of neurons and hepatocytes in animals with ONS was statistically significantly higher than in the control group. It is noteworthy that against the background of the development of ONS, after intra-abdominal administration of the amino acid NSAA-6 (20 mg/kg) to animals, a statistically significant decrease of value of the optical absorption for the Nox fraction is observed.

It has also been shown that the maximum optical density of β -absorption at 530 nm during the releasing of Nox from these membranes in experimental animals is significantly higher during the ONS, compared with the control group. Under the influence of NSAA-6, the level of the Nox isoforms is observed to be close to the control values of both hepatocytes and neuronal membranes, indicating the membrane protective effect of this compound.

The work was carried out at the Institute of Pharmacy of YSU and at the laboratory "Metabolism of active oxygen" of the Institute of Biochemistry after H. Buniatyan NAS RA.

