

М. Г. Малакян<sup>1</sup>, Л. А. Вардеванян<sup>1</sup>, Д. Э. Егиазарян<sup>1</sup>, С. А. Баджиян<sup>1</sup>,  
А. Г. Агабабян<sup>2</sup>, Г. А. Геворгян<sup>2</sup>

## АНТИОКСИДАНТНЫЕ И АНТИРАДИКАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОСПИРТОВ

<sup>1</sup> Научный центр радиационной медицины и ожогов МЗ РА, Ереван, Армения,  
E-mail: labbio@web.am;

<sup>2</sup> Научно-технологический центр органической и фармацевтической химии НАН РА.  
Институт тонкой органической химии им. А. Л. Мнджояна, Ереван, Армения,  
E-mail: gyulgev@gmail.com

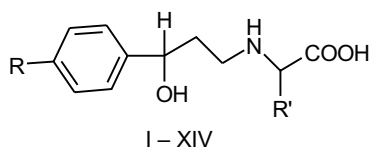
В модельных системах *in vitro* исследованы антиоксидантные/антирадикальные и мембранотропные свойства синтезированных соединений из ряда N-[3-гидрокси-3-(*n*-замещенных фенил)-1-пропил]аминокислот. Согласно полученным данным аминокислотные производные аминoproпанолов не оказывали существенной антиоксидантной или антирадикальной активности ни в системе аскорбатзависимого Fe(II)-стимулируемого перекисного окисления, ни по методу, основанному на спектрофотометрическом мониторинге концентрации стабильного радикала 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила, ни по фотохемилюминесцентному методу анализа. Однако в условиях H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-стимулированного окислительного стресса эритроцитов аминокислотные производные аминoproпанолов проявляли мембраностабилизирующее действие, препятствуя гемолитическому разрушению клеток. В этом плане наиболее интересными оказались производные глицина, лейцина, метионина.

**Ключевые слова:** аминoproпанолы, аминокислоты, антиоксидантные свойства, эритроциты, окислительный стресс, гемолиз, мембранотропное действие

Арилалифатические аминoproпаны известны широким спектром фармакологического действия (адрено-блокирующее, холинолитическое, спазмолитическое и др.) [1, 2]. Рассматривая возможность введения фрагментов аминокислот в структуру арилалифатических аминoproпанов как перспективное направление для получения новых фармакологически активных соединений, мы синтезировали ряд новых аминокислотных производных аминoproпанолов и изучили их антиоксидантную (АОА) и антирадикальную (АРА) активность.

### Экспериментальная часть

Осуществлен синтез аминокислотных производных аминoproпанолов I – XIV из ряда N-[3-гидрокси-3-(*n*-замещенных фенил)-1-пропил]аминокислот, в которых присутствуют фрагменты алифатических α-аминокислот: глицина (I), аланина (II), валина (III), лейцина (IV – VII), метионина (VIII – XI), серина (XII – XIII), треонина (XIV). Общая формула полученных соединений представлена ниже.



R' = R = H(I); R' = CH<sub>3</sub>, R = CH<sub>3</sub>O(II); R' = CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R = H(III);  
R' = CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R = H, CH<sub>3</sub>O, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>O (IV – VII);  
R' = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, R = H, CH<sub>3</sub>O, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>O(VIII – XI);  
R' = CH<sub>2</sub>OH, R = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>O(XII, XIII);  
R' = CH(OH)CH<sub>3</sub>, R = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O(XIV).

Структурная идентификация синтезированных соединений подтверждена методами ИК-спектроскопии, ЯМР и <sup>1</sup>H спектрометрии, а чистота — ТСХ и элементным анализом.

АОА и АРА аминокислотных производных аминoproпанолов I – XIV оценивали с использованием следующих методов:

1. В системе аскорбатзависимого Fe(II)-стимулируемого перекисного окисления — по степени подавления образования малонового диальдегида (МДА) в реакционной среде. Метод основан на способности к окислению кислородом воздуха в разбавленных водных растворах остатков олеиновой кислоты в составе твина-80 в присутствии кофакторов перекисного окисления — двухвалентного железа и аскорбиновой кислоты. АОА изучаемых соединений, вводимых в реакционную среду в концентрации 10<sup>-3</sup> М, характеризовалась по степени уменьшения (в %) содержания образовавшегося в пробах окрашенного комплекса МДА по сравнению с контролем [3].

2. По методу, основанному на спектрофотометрическом контроле уменьшения концентрации стабильного радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ•, λ<sub>max</sub> = 516 нм) в метаноле под действием исследуемых соединений в концентрациях 10<sup>-3</sup> М, 10<sup>-4</sup> М и 10<sup>-5</sup> М. АРА веществ оценивали по уменьшению оптической плотности раствора ДФПГ• при введении в среду возрастающих концентраций исследуемого вещества и вычислялась как 1/C<sub>50</sub>, где C<sub>50</sub> — количество вещества в молях, необходимое для снижения начальной концентрации ДФПГ• на 50 % [4].

3. В работе использовали также разработанный фирмой-производителем Analytic Jena AG (Германия) специальный ACL-кит, предназначенный для определения АОА жирорастворимых соединений на фотохемилюминесцентном анализаторе “PHOTOCHEM” (Analytic Jena AG, Германия). В основе метода лежит измерение величины антиоксидант-чувствительного ингибирования фотоиндуцированной хемилюминесценции, сопровождающей окисление люминола [5 – 7]. АОА испытуемого ве-

щества автоматически сравнивалась со стандартом тролоксом, вызывающим равнозначное ингибирование фотохемилюминесценции, и выражалась в условных единицах, соответствующих количеству тролокса в наномолях с эквивалентной активностью. В качестве контрольного препарата был выбран бутилированный гидрокситолуен (БГТ), активность которого в подавлении фотохемилюминесценции испытывалась при 10 наномолях количества вещества.

4. По способности веществ препятствовать развитию гемолиза эритроцитов intactных крыс, стимулируемого путем добавления в суспензию эритроцитов (1 % гематокрит) перекиси водорода  $H_2O_2$  в концентрации, достаточной для наступления и развития процессов выраженного гемолитического разрушения красных клеток крови.

Рассматривались следующие контрольные и опытные (с метками К и О) образцы суспензий эритроцитов, приготовленные на физиологическом растворе:

а-К) суспензия эритроцитов без каких-либо включений;

а-О) суспензия эритроцитов с введением в среду исследуемого соединения в концентрации  $10^{-3}$  М — с целью исследования мембранотропного действия изучаемых соединений;

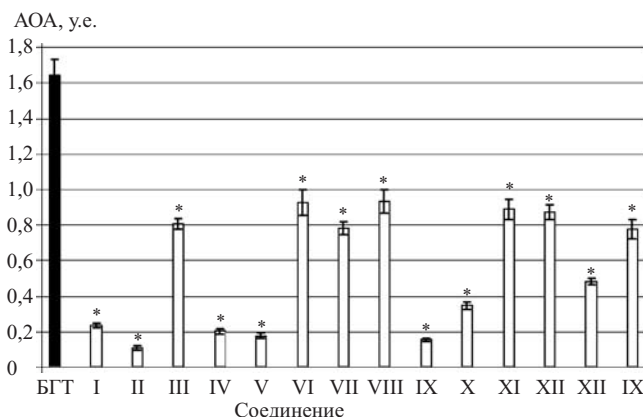
б-К) присутствие в суспензионной среде  $H_2O_2$  в конечной концентрации 0,015 % — с целью стимуляции оксидативного повреждения мембран эритроцитов;

б-О) параллельное введение в эритроцитарную суспензию 0,015 %  $H_2O_2$  и  $10^{-3}$  М исследуемого соединения — с целью исследования антиокислительного, антигемолитического действия тестируемых веществ.

Образцы инкубировали в течение 1 ч при 37 °С в условиях постоянного мягкого встряхивания, после чего образцы центрифугировали при 3000 об/мин для отделения надосадочной жидкости, содержащей вышедший из эритроцитов гемоглобин. На спектрофотометре СФ-46 (ЛОМО) определяли величину оптического поглощения супернатанта при длине волны 541 нм ( $A_{541}$ ). Проводили сравнительный анализ данных, полученных в опытных образцах с веществами и в соответствующих контрольных пробах. Об антигемолитической активности изучаемых веществ и их способности тушить свободные ради-

#### Антиоксидантная (или прооксидантная) активность аминокислотных производных аминпропанолов

Соединение	Степень подавления (↓) или стимулирования (↑) образования МДА в реакционной среде (в % по сравнению с контролем)
I	5,52 ± 0,28 (↓)
II	1,53 ± 0,11 (↓)
III	20,17 ± 0,34 (↓)
IV	1,33 ± 0,14 (↓)
V	11,27 ± 0,25 (↑)
VI	3,34 ± 0,24 (↓)
VII	4,72 ± 0,31 (↓)
VIII	7,22 ± 0,12 (↑)
IX	1,28 ± 0,23 (↓)
X	1,85 ± 0,18 (↓)
XI	11,18 ± 0,22 (↓)
XII	2,26 ± 0,16 (↑)
XIII	1,99 ± 0,30 (↑)
XIV	0,96 ± 0,09 (↑)



**Рис. 1.** Величина подавления фотоиндуцированной хемилюминесценции как мера оценки антиоксидантной активности аминокислотных производных аминпропанолов I – XIV. АОА соединений выражена в условных единицах, равных количеству тролокса в наномолях с эквивалентной активностью; \* эффект достоверен в сравнении с БГТ.

калы кислорода, индуцированные в водной среде посредством  $H_2O_2$ , судили по степени уменьшения оптического поглощения в опытных образцах. На основе данных, полученных в пробах б-К и б-О, оценивали мембранотропное действие тестируемых соединений после одночасовой их инкубации в эритроцитарной суспензии.

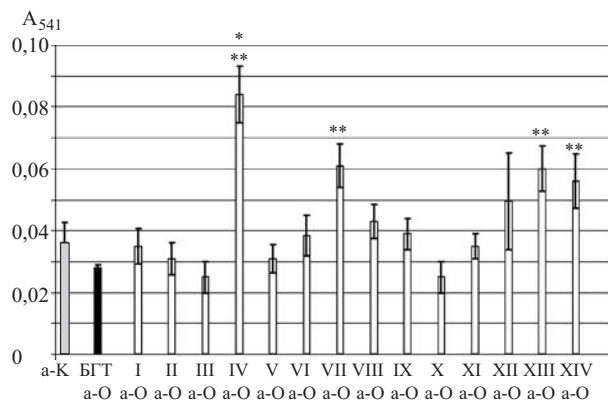
Все эксперименты были повторены по 3 раза для подтверждения постоянства полученного эффекта. Данные, характеризующие этот эффект, представлены в виде средних арифметических значений исследованных параметров и среднеквадратических ошибок. Результаты экспериментов обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента. Эффект считался статистически достоверным при  $p < 0,05$ .

#### Результаты и их обсуждение

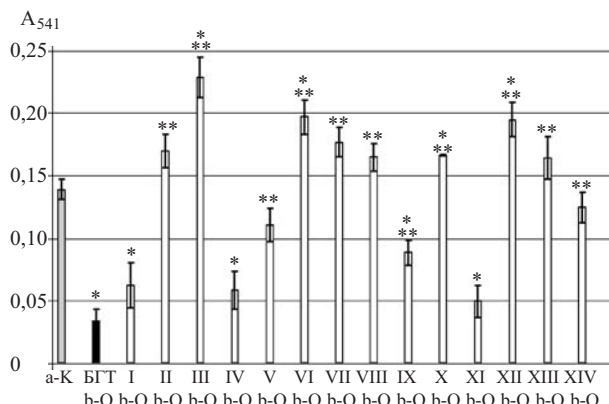
Согласно полученным данным в системе аскорбатзависимого, Fe(II)-катализируемого перекисного окисления липидов большинство аминокислотных производных аминпропанолов не проявляет существенной активности за исключением соединений III и XI, оказывающих антиоксидантное действие, и соединения V с прооксидантными свойствами (таблица).

По данным спектрофотометрических исследований аминокислотные производные аминспиртов не обладают достаточной активностью для нейтрализации 50 % присутствующего в метаноле стабильного радикала ДФПГ<sup>•</sup>: они снижают концентрацию радикала лишь до 70 – 80 % от его исходной концентрации в рабочем растворе, что не позволяет вычислить величину  $1/C_{50}$ , характеризующую АРА соединений. Исходя из этого, можно сделать вывод о весьма слабых антирадикальных свойствах испытуемых аминокислотных производных аминпропанолов I – XIV.

Как показали данные фотохемилюминесцентного анализа, представленные на рис. 1, АОА, проявляемая 10 наномолями исследуемых аминокислотных производных аминпропанолов, находилась в пределах активности 0,1 – 1,0 наномолей тролокса, тогда как АОА 10 наномолей БГТ была эквивалентна активности, оказываемой 1,643 наномолей тролокса. Исходя из этих данных, мож-



**Рис. 2.** Величина  $A_{541}$  надосадочной жидкости различных образцов суспензий эритроцитов (гематокрит 1 %) через 1 ч после инкубации: “а-К” — контрольный образец, суспензия эритроцитов без каких-либо включений; “а-О” — образцы с препаратом сравнения БГТ и соединениями I–XIV в концентрации  $10^{-3}$  М; \* —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; \*\* —  $p < 0,05$  по сравнению с БГТ.



**Рис. 3.** Величина  $A_{541}$  надосадочной жидкости различных образцов суспензий эритроцитов (гематокрит 1 %) через 1 ч после инкубации на фоне 0,015 %  $H_2O_2$ : “b-К” — контрольный образец; “b-О” — образцы с препаратом сравнения БГТ и соединениями I–XIV в концентрации  $10^{-3}$  М; \* —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; \*\* —  $p < 0,05$  по сравнению с БГТ.

но сделать заключение о довольно слабо выраженных антиоксидантных свойствах изученных соединений.

Как видно из рис. 2, после инкубации в течение 1 ч фоновый уровень гемолиза эритроцитов (образцы “а-К”), так называемый спонтанный гемолиз, характеризуется оптическим поглощением супернатанта, равным  $0,037 \pm 0,007$ . В образцах, в которых присутствует БГТ, уровень гемолиза несколько ниже контрольного уровня, что свидетельствует о его мембраностабилизирующем действии. Вместе с тем, инкубация эритроцитов в присутствии соединений IV, VII, XII–XIV способствует повышению уровня оптического поглощения инкубационной среды, что свидетельствует об их гемолитическом действии.

В условиях оксидативного повреждения эритроцитов, стимулированного введением  $H_2O_2$  в среду инкубации, в результате деструкции клеточных мембран и выхода гемоглобина во внешнюю среду в контрольном образце “b-К” наблюдается существенное возрастание величины  $A_{541}$  до уровня  $0,139 \pm 0,008$  (рис. 3). Соединения I, IV, V, IX, XI и XIV, равно как БГТ, оказывают выраженное мем-

браностабилизирующее действие и проявляют антигемолитический эффект, тогда как соединения II, III, VI–VIII, X, XII и XIII усиливают  $H_2O_2$ -стимулированный гемолиз эритроцитов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. О. М. Авакян, *Фармакологическая регуляция функции адренорецепторов*, Москва, Медицина (1988).
2. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Новая волна, Москва (2007).
3. С. Г. Благородов, А. П. Шепелев, Н. А. Дмитриева и др., *Хим.-фарм. журн.*, **21**(3), 292–294 (1987).
4. W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset, *Lebensm. Wiss. Technol.*, **28**(1), 25–30 (1995).
5. I. N. Popov, G. Lewin, *J. Biochem. Biophys. Methods.*, **31**(1–2), 1–8 (1996).
6. I. N. Popov, G. Lewin, *Luminescence*, **14**(3), 169–174 (1999).
7. L. F. Wang, H. Y. A. Zhang, *Bioorg. Med. Chem. Let.*, **13**, 3789–3792 (2003).

Поступила 08.09.09

## ANTIOXIDANT AND ANTIRADICAL PROPERTIES OF NEW AMINO ACID DERIVATIVES OF AMINOALCOHOLS

M. H. Malakyan<sup>1</sup>, L. A., Vardevanyan<sup>1</sup> D. E. Yeghiazaryan<sup>1</sup>, S. A. Badzhinyan<sup>1</sup>, H. G. Agababyan<sup>2</sup>, and G. A. Gevorgyan<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Scientific Center of Radiation Medicine and Burns, Ministry of Public Health of Armenia, Yerevan 0048, Armenia; e-mail: labbio@web.am;

<sup>2</sup> Scientific and Technological Centre of Organic and Pharmaceutical Chemistry, Mndzhoyan Institute of Fine Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Armenia, Yerevan 0048, Armenia; e-mail: gyulgev@gmail.com

Antioxidant, antiradical, and membranotropic properties of newly synthesized compounds of the group of N-[3-hydroxy-3-(n-substituted phenyl)-1-propyl]amino acids were studied on the model systems in vitro. According to the results obtained, amino acid derivatives of aminopropanols did not exhibit any significant antioxidant or antiradical activity. Evidence for this activity was provided neither in the system of Fe(II)-stimulated ascorbate-dependent peroxidation, nor by the method of spectrophotometric monitoring of a decrease in the concentration of stable 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical or by photoluminescent techniques. However, under conditions of  $H_2O_2$ -stimulated oxidative stress of erythrocytes these compounds revealed a membrane stabilizing effect preventing the hemolytic destruction of cells. In this aspect, the derivatives of glycine, leucine, and methionine were most interesting.

**Key words:** Aminopropanols, amino acids, antioxidant properties, antiradical activity, erythrocytes, oxidative stress, hemolysis, membranotropic properties