

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ β -ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИ ЗАМЕЩЕННЫХ АНАЛОГОВ α -АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ И НЕКОТОРЫХ ЭНДОГЕННЫХ АНТИОКСИДАНТОВ

Л.Ю. Саакян, Г.М. Симонян, Р.М. Симонян, М.А. Симонян, Э.С. Секоян, А.С. Сагян

Институт фармации ЕГУ, Ереван

Институт биохимии им Г.Х.Бунятыяна НАН РА

С использованием чувствительного метода определения удельной антиоксидантной активности получены новые убедительные доказательства о наличии у β -гетероциклически замещенных аналогов α -аминомасляной кислоты (β -14-АМК и β -789-АМК) антиоксидантной активности. Одновременно результаты сравнительного количественного анализа удельной антиоксидантной активности таких известных антиоксидантов как витамин “С”, таурин и аргинин свидетельствуют, что исследованные β -гетероциклически замещенные аналоги α -аминомасляной кислоты и, особенно, соединение β -14-АМК, по уровню своей антиоксидантной активности почти сопоставимы с таурином, что открывает новые перспективы в плане их дальнейшего изучения как потенциальных антиоксидантов, обладающих мембраностабилизирующим действием.

α-ԱՄԻՆԱԿԵՏՐԱԳԱԹԹՎԻ β-ՆԵՏԵՐՈՅԻՎԻԿ ՏԵՂԱԿԱԼՎԱԾ ԱԾԱՆՅՅԱԼՆԵՐԻ ԵՎ ՈՐՈՇ ԷՆԴՈԳԵՆ ՆԱԿԱՕՔՍԻԴԻՉ ՆՅՈՒԹԵՐԻ ՆԱՄԵՄԱՏԱԻՐԱՆ ՆԱԿԱՕՔՍԻԴԱՆՏՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՆԵՏԱԶՈՏՈՒՄԸ

Լ.Յու. Սահակյան, Գ.Մ. Միմոնյան, Ռ.Մ. Միմոնյան, Մ.Ա. Միմոնյան, Է.Ս.Սեկոյան, Ա.Ս. Սաղյան

Տեսակարար հակաօքսիդանտային ակտիվության որոշման զգայուն մեթոդի կիրառմամբ, սրացվել են նոր, հավասարի արժանի β -հետերոցիկլիկ րեդակալված α -ամինակարագաթթվի ածանցյալների (β -14-АМК и β -789-АМК) մոտ հակաօքսիդիչ հատկությունների առկայության մասին: Միաժամանակ, հայտնի հակաօքսիդանտներ վիտամին “С”-ի, փաուրինի, արգինինի և հերագոպրվոդ ամինաթթուների րեսակարար հակաօքսիդիչ ակտիվությունների համեմատական քանակական վերլուծության արդյունքները վկայում են այն մասին, որ հերագոպրվոդ β -հետերոցիկլիկ րեդակալված α -ամինակարագաթթվի ածանցյալները, և հատկապես β -14-АМК միացությունը, իր հակաօքսիդիչ ակտիվության մակարդակով գրեթե համեմատելի է փաուրինի հետ, ինչը նրանց հերագո ուսումնասիրման նոր հեռանկարներ է բացում, որպես պոպրենցիալ հակաօքսիդիչներ, որոնք ունեն թաղանթակայունացնող ազդեցություն:

COMPARATIVE STUDY OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF β -HETEROCYCLIC SUBSTITUTED ANALOGUES OF α -AMINO BUTYRIC ACID AND SOME ENDOGENOUS ANTIOXIDANTS

L. Yu. Sahakyan, G.M. Simonyan, R.M. Simonyan, M.A. Simonyan, E.S. Sekoyan, A.S. Sagyan

With the use of a sensitive method for the determination of specific antioxidant activity, new convincing data was obtained for the presence of antioxidant activity in β -heterocyclic substituted analogues of α -aminobutyric acid (β -14-АМК and β -789-АМК). Simultaneously, the results of a comparative quantitative analysis of the specific antioxidant activity of such known antioxidants as vitamin “С”, taurine, arginine and the studied amino acids, indicate that the studied β -heterocyclic substituted analogues of α -aminobutyric acid and, especially, the β -14-АМК compound, on the level of its antioxidant activity are almost comparable with taurine, which opens up new prospects of their further study as potential antioxidants possessing membrane-stabilizing action.

Введение. Установлено, что в механизмах мембраностабилизирующего действия β -гетероциклически замещенного аналога α -аминомасляной кислоты (β -789-АМК), проявляющегося в виде ингибирования гемоглобин-индуцируемого рилизинга изоформ NADPH оксидазы (Nox) из мембранных структур, существенная роль принадлежит их антиоксидантной активности [1,2]. В то же время следует отметить, что антиоксидантная активность указанного соединения была выявлена методом обесцвечивания кумасси бриллианта синего супероксидными радикалами, продуцируемые при расщеплении перекиси водорода едким калием к которому не все биосистемы проявляют достаточную толерантность [3]. В настоящее время установлено, что O_2^- продуцируются и при расщеплении перекиси водорода гидроокисью аммония ($NH_4 OH$) по схеме: $O_2^* + HO \rightarrow O_2^- + HO^*$, где O_2^* является возбужденной молекулой

кислорода, образующегося при неферментативном расщеплении перекиси водорода HO^* ионом гидроокиси аммония, при этом, данный “горячий” кислород легко восстанавливается электроном HO^* [4]. Исходные соединения и продукты данной реакции являются активными интермедиатами аэробных метаболических процессов, уровень которых, как проявление компенсаторной реакции организма, повышается при различных патологических состояниях, в частности, при гипераммонемии [5,6].

Цель работы - сравнительное изучение удельной антиоксидантной активности β -гетероциклически замещенных аналогов α -аминомасляной кислоты - β -14-АМК ((2S,3S)-b-[2-тиоксо-2,3-дигидробензимидазол-1-ил]-a-аминомасляная кислота) и β -789-АМК ((2S,3S)-b-[3-бутил-4-пропил]-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-a-аминомасляная кислота) и некоторых эндогенных антиоксидантов.

Материал и методы. Концентрацию перекиси водорода определяли методом перманганометрического титрования. Концентрацию кумасси бриллианта синиего- КБС (М) определяли, используя величину молярного поглощения при 580нм, которое составляет $43.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Стационарную концентрацию O_2^- (М) определяли кинетическим методом, через 15 мин. от начала процесса обесцвечивания КБС супероксидными радикалами. Исходя из кинетических кривых отражающих снижение плотности максимального оптического поглощения КБС (при 580 нм) под влиянием O_2^- , продуцируемые при неферментативном расщеплении перекиси водорода (0,1М) гидроокисью аммония (0,1М) через 15 мин от начала процесса обесцвечивания КБС определяли разницу процента снижения плотности оптического поглощения КБС при 580нм в присутствии O_2^- (контроль) и исследуемых соединений: (витамин "С," таурин, L-аргинин, β -14-АМК и β -789-АМК) в концентрации 0,03мг/мл. В отсутствии O_2^- и исследуемых соединений плотность оптического поглощения КБС принималась за 100%. За единицу удельной антиоксидантной активности принималось количество антиоксидантов (в мг/мл) вызывающие 50% снижение плотности максимального оптического поглощения КБС при 580нм при комнатной температуре. Удельная антиоксидантная активность исследуемых соединений выражалась в ед/мг/мл. Оптические спектры поглощения регистрировались на спектрофотометре «Specord UV/VIS» (Германия) с длиной оптического пробега 1см. В исследованиях были использованы: перекись водорода, гидроокись аммония, кумасси бриллиант синий (КБС), выделенная из печени быка, очищенная, электрофоретически гомогенная и лиофилизованная Cu,Zn-СОД [10], витамин "С", таурин и L-аргинин ("Sigma Chemicals"), синтезированные в Институте фармации ЕГУ β -14-АМК и β -789-АМК [11]. Статистическая значимость различий исследуемых показателей оценивалась по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Обесцвечивание КБС обусловлено его восстановлением под влиянием супероксидных радикалов, продуцируемых при неферментативном расщеплении перекиси водорода гидроокисью аммония. Отдельно перекись водорода и гидроокись аммония не обесцвечивают КБС в приведенных условиях. В результате нагревания при 50-60°C, 15-20 сек., 2,5мл 0,1М перекиси водорода с 2,5мл 0,1М NH_4OH при рН 7,4 наблюдается бурная экзотермическая реакция с неферментативном расщеплении перекиси водорода. При повышении рН среды процесс расщепления перекиси водорода гидроксидом аммония намного усиливается и повышается стационарная концентрация O_2^- . Соответственно, в присутствии скавенджеров HO^\bullet радикалов (спирты, сахара, маннитол) количество продуцированных супероксидов резко возрастает, при этом 1М КБС стехиометрически восстанавливается (обесцвечивается) 1М супероксидными радикалами.

После инкубации в течение 10-15 мин и охлаждении реакционной смеси получают O_2^- со стабильной стационарной концентрацией (в течение 5-6ч при комнатной температуре наблюдается снижение этой концентрации всего на 15-20%). Интерес к этому методу повышается тем, что легко определить стационарную концентрацию продуцированных O_2^- (М) в данный момент времени, используя величину молярного поглощения КБС при 580нм ($43.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). В контроле к 3 мл реакционной смеси (КБСс $A_{580}=1,3$) добавляли 0,1 мл раствора O_2^- при комнатной температуре и определяли кинетику обесцвечивания КБС (через 5, 10 и 15 мин). В опытных сериях исследований одновременно с O_2^- добавляется по 0,03мг/мл витамина "С", L-аргинина, таурина, β -14-АМК и β -789-АМК в отдельности, и определяется кинетику подавления обесцвечивания КБС супероксидными радикалами.

Полученные данные свидетельствуют, что в контроле под влиянием O_2^- плотность максимального оптического поглощения КБС при 580нм составляет $0,20 \pm 0,003$, в присутствии $5 \times 10^{-8} \text{ M Cu,Zn-СОД}$ $-1,3 \pm 0,01$, ($P < 0,001$), а витамина "С" $-0,93 \pm 0,004$, ($P < 0,001$), рис.1.

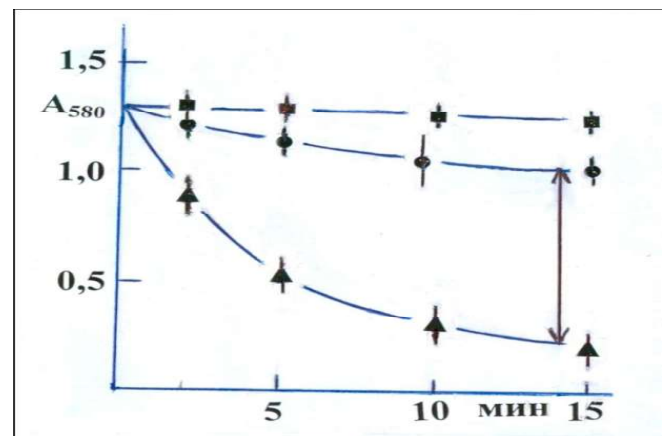


Рис.1. Кинетические кривые снижения плотности максимального оптического поглощения КБС под влиянием O_2^- , продуцируемые при расщеплении H_2O_2 гидроокисью аммония (контроль), в присутствии O_2^- и Cu,Zn-СОД и витамина "С".

В аналогичных условиях плотность максимального оптического поглощения КБС под влиянием O_2^- составляет в контроле $0,21 \pm 0,004$, в присутствии L-аргинина $-0,38 \pm 0,007$, $P < 0,001$ (рис.2)

Как следует из приведенных данных, под влиянием O_2^- плотность максимального оптического поглощения КБС в контроле составляет $0,21 \pm 0,004$, а в присутствии таурина она равняется $0,80 \pm 0,006$, $P < 0,01$ (рис.3).

В аналогичных условиях постановки опыта под влиянием O_2^- плотность максимального оптического поглощения КБС составляет $0,20 \pm 0,005$, достигая в присутствии β -14-АМК $0,86 \pm 0,005$ ($P < 0,001$), а β -789-АМК $-0,63 \pm 0,006$ ($P < 0,001$), (рис.4,5).

Полное подавление процесса обесцвечивания КБС Cu,Zn-СОД свидетельствует, что за обесцвечивания

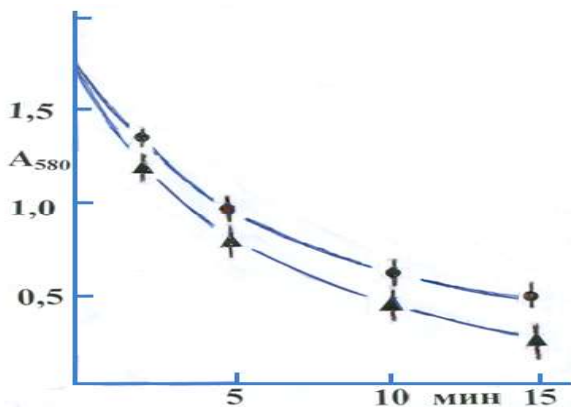


Рис.2. Кинетические кривые снижения плотности максимального оптического поглощения КБС под влиянием O₂⁻, продуцируемые при расщеплении H₂O₂ гидроокисью аммония (контроль) и в присутствии O₂⁻ и L-аргинина

чивание КБС ответственны лишь супероксидные радикалы, продуцируемые при расщеплении перекиси водорода гидроокисью аммония при pH 7,4-8. Удельную антиоксидантную активность исследуемых соединений определяли используя следующие зависимости. 1) $(\Delta A_{580} \times 100\%) / 1,3 \times 50 = a$; 2) удельная активность $= a / 0,03 \text{ед/мг/мл}$, где ΔA_{580} - разница плотности максимального оптического поглощения КБС в контроле и под влиянием исследуемых соединений. Следовательно, могут быть обозначены следующие значения:

- 100% - процент плотности максимального оптического поглощения матричного КБС (до начала реакции обесцвечивания КБС супероксидными радикалами);
- 1,3 - плотность максимального оптического поглощения матричного КБС;
- 50-50% снижение плотности максимального оптического поглощения при 580 нм под влиянием O₂⁻ при комнатной температуре;
- 0,03- количество исследуемых соединений в мг/мл в реакционной смеси.
- A₅₈₀/мин (скорость обесцвечивания КБС)- tg наклона угла касательного кинетических кривых.

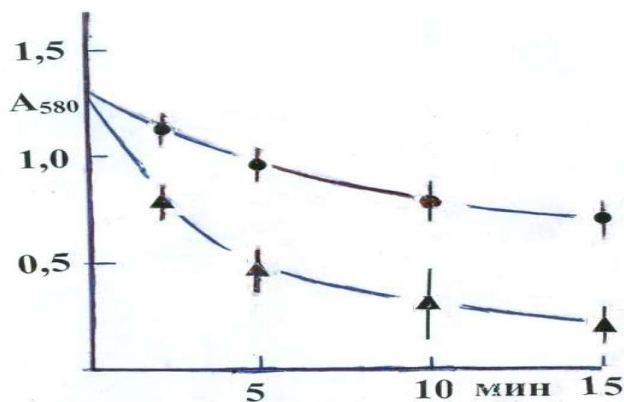


Рис.4. Кинетические кривые снижения плотности максимального оптического поглощения КБС под влиянием O₂⁻, продуцируемые при расщеплении H₂O₂ гидроокисью аммония (контроль) и в присутствии O₂⁻ и beta-14-АМК

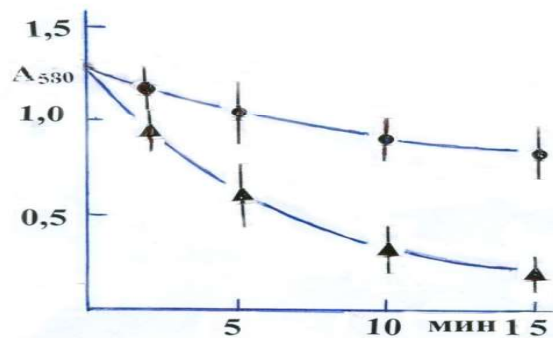


Рис.3. Кинетические кривые снижения плотности максимального оптического поглощения КБС под влиянием O₂⁻, продуцируемые при расщеплении H₂O₂ гидроокисью аммония (контроль) и в присутствии O₂⁻ и таурина

Таким образом, исходя из того, что 1М O₂⁻ стехиометрически обесцвечивает 1М КБС, легко определить скорость обесцвечивания КБС (М/мин) указанными радикалами.

Как следует из представленных данных, из исследуемых соединений наиболее высокий уровень удельной антиоксидантной активности выявлен у витамина "С". По уровню удельной антиоксидантной активности таурин лишь несколько уступает витамину "С". Обращает на себя особое внимание, что синтезированные beta-гетероциклически замещенные аналоги alpha-аминомасляной кислоты (beta-14-АМК и beta-789-АМК) по уровню удельной антиоксидантной активности лишь несколько уступают таурину, более чем втрое превосходя антиоксидантную активность L-аргинина. Одновременно обнаружено, что стационарная концентрация продуцируемых O₂⁻ увеличивается со снижением удельной антиоксидантной активности исследуемых соединений (табл.).

Таким образом, с использованием разработанного чувствительного метода определения удельной антиоксидантной активности получены новые убедительные доказательства о наличии beta-гетероциклически замещенных аналогов alpha-аминомасляной кислоты (beta-14-АМК и beta-789-

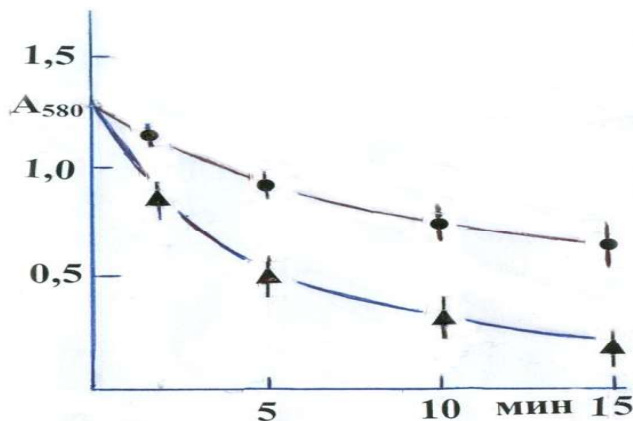


Рис.5. Кинетические кривые снижения плотности максимального оптического поглощения КБС под влиянием O₂⁻, продуцируемые при расщеплении H₂O₂ гидроокисью аммония (контроль) в присутствии O₂⁻ и beta-789-АМК

Таблица. Удельная антиоксидантная активность исследуемых соединений и скорость продуцирования O_2^- при расщепления перекиси водорода гидроокисью аммония

Исследуемые соединения	Удельная антиоксидантная активность (ед/мг/мл)	Скорость продуцирования O_2^- ($\times 10^{-6}$ М/мин)
Витамин "С"	36,0	0,9
Таурин	29,5	1,0
β -14-АМК	27,5	1,5
β -789-АМК	22,0	2,5
L-Аргинин	7,5	4,0*

*- скорость продуцирования O_2^- в отсутствии антиоксидантов составляет 5×10^{-6} М/мин

АМК), антиоксидантной активности. Одновременно результаты сравнительного количественного анализа удельной антиоксидантной активности таких известных антиоксидантов как витамин "С" и таурин свидетельствуют, что исследованные β -гетероциклически замещенные аналоги α -аминомасляной кислоты и, особенно, соединение β -14-АМК, по уровню своей антиоксидантной активности сопоставимы с таурином, что открывает новые перспективы в плане их дальнейшего изучения как потенциальных антиоксидантов, обладающих мембраностабилизирующим действием.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Саакян Л.Ю., Симонян Г.М. и др. *Вопр.теорет. клин. мед.*, 2017; 20(2):64-67.
2. Саакян Л.Ю., Симонян Р.М. и др. *Вопр.теорет. клин. мед.* 2017; 20(4):16-19.
3. Симонян Р.М., Бабаян М.А. и др. *Биолог. журн. Армении.* 2017; LXIX, 2:53-58.
4. Simonyan M.A. *Biochem.Biophys.Res.Com.* 1982;108(4):1751-1756.
5. García M.V., López-Mediavilla C. et al. *Brain Res.* 2004;1001(1-2):159-163.
6. Jasmin Lena P., Subramanian P. J. *Pharm.Tech.Research. CODEN (USA).* 2015;8(8):74-78.
7. Poljsak B., Raspor P. J. *Appl.Toxicol.* 2008;28(2):83-188.
8. Jong C.J., Azuma J., Schaffer S. *Amino Acids* 2012; 42(6):2223-2232.
9. Ahmad A., Sattar M.Z. et al. *Acta Pol. Pharm.* 2015; 72(2):245-252.
10. Симонян М.А. *Открытия Изобретения (СССР).* 1988, N28:107, AC 1413139.
11. Сагиян А.С., Саакян Л.Ю., Симонян А.М. и др. *Хим. журн. Армении*, 2017, 1-2, 70:71-81.

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ЛЕЧЕНИЮ ЛЕЙКОПЛАКИИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА

Н.Э. Авакян, Г.С. Бабаджанян, Л.В. Арутюнян, С.Г. Ераносян

ЕГМУ им.М.Гераци, кафедра терапевтической стоматологии и пародонтологии факультета постдипломного и непрерывного образования

ԲԵՐԱՆԻ ԽՈՌՈՉԻ ԼՈՐՉԱԹ-ԱՂԱՆԹԻ ԼԵՅԿՈՂԱԿԻԱՅԻ ԲՈՒԺՄԱՆ ԺԱՄԱՆԱԿԱԿԻՑ ՄՈՏԵՅՈՒՄՆԵՐԸ

Ն.Է. Ավագյան, Գ.Ս. Բաբաջանյան, Լ.Վ. Նարությունյան, Ս.Գ. Երանոսյան

Նորվաժում ներկայացված են բերանի խոռոչի յորձաթաղանթի լեյկոպլակիայի դասակարգումը, էթիոպաթոգենները, կլինիկան: Մանրամասնորեն նկարագրված են բուժման նորագույն մոտեցումները, սկզբունքները և ժամանակակից եղանակները: Քանի որ լեյկոպլակիան դասվում է ֆակուլտարորիկ նախաբաղկերկային հիվանդությունների շարքին, հողվաժում նկարագրված են նրա կլինիկական բոլոր ձևերի մալիգնիզացիայի նշանները և ընդգծված է հիվանդության կանխարգելման անհրաժեշտությունը և կարևորությունը:

THE MODERN APPROACHES TO TREATMENT OF ORAL MUCOUS MEMBRANE LEUKOPLAKIA

N.E. Avagyan, G.S. Babajanyan, L.V. Harutyunyan, S.G. Yeranosyan

The article presents the classification, etiology, pathogenesis and clinical picture of oral mucous membrane leukoplakia. The latest detailed treatment approaches, principles and modern options are described. Since leukoplakia is classified as a facultative precancerous disease, the symptoms of malignancy in all its clinical forms are described, the necessity and importance of disease prevention are emphasized.

Актуальность. Лейкоплакия достаточно часто встречающееся заболевание слизистой оболочки полости рта (СОПР). По данным американской статистики [1], ее распространенность составляет 0,5%-

3,46%, а частота озлокачествления – 0,7-2,9%. По данным Нижегородской государственной медицинской академии [7] распространенность лейкоплакии среди заболеваний СОПР составляет 6,3%, лейко-