

СИНТЕЗ N-ТРЕТ-БУТОКСИКАРБОНИЛ-(S)-АЛАНИЛГЛИЦИЛ-(S)-β-(3-ИЗОБУТИЛ-4-АЛЛИЛ-5-ТИОКСО-1,2,4-ТРИАЗОЛ-1-ИЛ)-α-АЛАНИНА И ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ТРИПЕПТИДА НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ ЧЕРНОЙ СУБСТАНЦИИ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Ю. М. ДАНГЯН^б, Т. О. САРГСЯН^{а,б}, С. М. ДЖАМГАРЯН^б, Э. А. ГЮЛУМЯН^б,
М. В. ПОГОСЯН^{а,г}, Г. А. ПАНОСЯН^б, Дж. С. САРГСЯН^{а,г} и А. С. САГЯН^{а,б}

^а Ереванский государственный университет
Армения, 0025, Ереван, ул. А. Манукяна, 1
E-mail: pharmacy@ysu.am

^б Научно-производственный центр «Армбиотехнология»
НАН Республики Армения
Армения, 0056, Ереван, ул. Гюрджяна, 14
Факс: (374-10)654183, E-mail: armbiotech@gmail.com

^в Научно-технологический центр органической и фармацевтической химии
НАН Республики Армения
Армения, 0014, Ереван, пр. Азатутян, 26

^г Институт физиологии им. Л.А. Орбели НАН Республики Армения
Армения, 0028, Ереван, ул. Орбели, 22

Поступило 26 VII 2018

Методом активированных эфиров осуществлен синтез N-трет-бutoксикарбонилтрипептида, содержащего глицин и (S)-2-амино-3-(3-изобутил-4-аллил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил)-пропионовую кислоту. Согласно данным программы Pass-Online, полученный трипептид может воздействовать на активность нейронов.

Изучено *in vivo* воздействие N-трет-бutoксикарбонил-(S)-аланилглицил-(S)-β-(3-изобутил-4-аллил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил)-α-аланина на электрическую активность нейронов черной субстанции в условиях модели болезни Паркинсона.

Полученные данные позволяют сделать вывод о способности пептида противостоять перевозбуждению, свойственному патологическим состояниям нервных тканей.

Рис. 3, табл. 1, библиограф. ссылки 5.

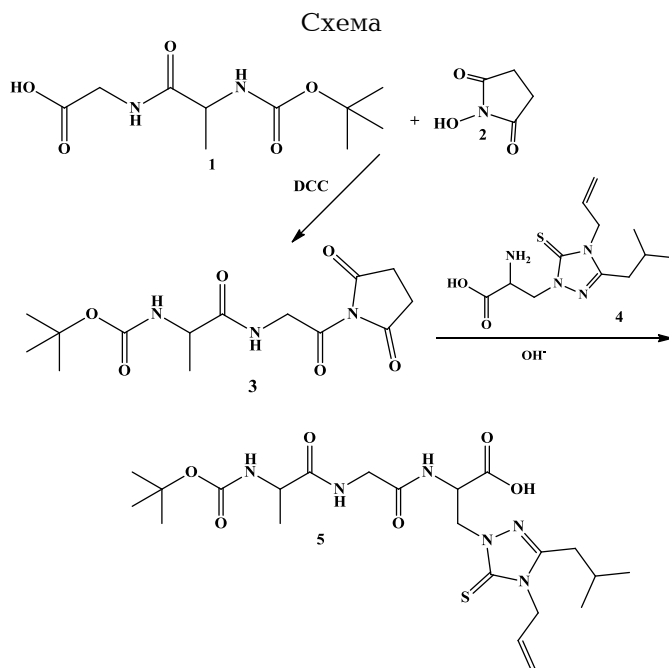
Интерес, проявляемый к пептидам несколько десятков лет назад, сегодня вылился в широкое применение пептидных лекарств в фарма-

цветике, а их количество растет с каждым днем. На рынке лекарств уже известны десятки пептидных препаратов на основе пептидов, выделенных из организмов, а затем полученных химическим, ферментативным и генноинженерным путем. К ним относится инсулин, соматостатин, окситоцин и т.д. [1-2].

В последние два десятилетия большой интерес представляют также короткие пептиды, содержащие небелковые аминокислоты; они легко преодолевают все барьеры вплоть до гематоэнцефалического. При этом субстрат труднее распознается со стороны ферментов, что значительно затрудняет протеолиз и увеличивает время действия препарата [3].

Исходя из вышеизложенного и на основании данных Pass-Online нами был синтезирован пептид, содержащий глицин и (S)-2-амино-3-(3-изобутил-4-аллил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил)-пропионовую кислоту (**4**). Синтез трипептида осуществлен методом активированных эфиров в растворе, отличающимся простотой, позволяющим получать конечные продукты с хорошими выходами и высокой чистотой [4].

Вначале при использовании N-трет-бутилоксикарбонил-(S)-аланилглицина (**1**), дициклогексилкарбодиимида (DCC) и N-гидроксисукцинимида (**2**) был получен соответствующий сукцинимидный эфир (**3**), который далее конденсацией с (S)-2-амино-3-(3-изобутил-4-аллил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил)-пропионовой кислотой (**4**) в щелочной водно-органической среде переведен в целевой N-трет-бутоксикарбонил-(S)-аланилглицил-(S)- β -(3-изобутил-4-аллил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил)- α -аланин (**5**) (схема).



Следующим этапом работы явилось проведение испытаний биологических свойств нового трипептида. В качестве объекта испытаний трипептида были выбраны белые крысы "Альбино", на которых была развита модель болезни Паркинсона.

Проведен сравнительный анализ импульсной активности одиночных нейронов компактной части черной субстанции (SNc) в ответ на высокочастотную стимуляцию (ВЧС) Caudate Putamen (CPu). Для оценки степени выраженности активности нейронов SNc строились круговые диаграммы усредненной частоты спайков (рис. 1).

Анализ частотных показателей активности нейронов привел к следующим результатам. У животных с ротеноновой интоксикацией после применения препарата значения возбуждательных эффектов (ТП ПТП, ТП ПТД) оказались заниженными как по сравнению с нормой, так и по сравнению с интоксикацией (рис. 1).

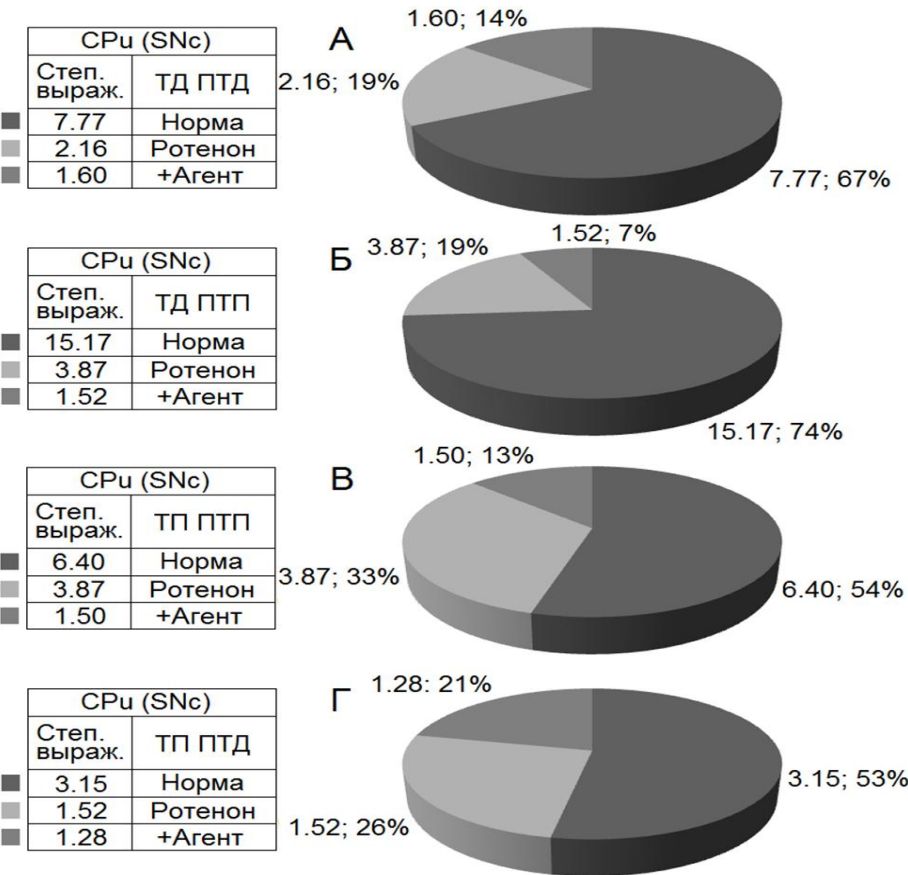


Рис. 1. Процентное соотношение степени выраженности (по усредненной частоте) депрессорных (А), депрессорно-возбудительных (Б), возбудительных (В) и возбудительно-депрессорных (Г) постстимульных эффектов в одиночных нейронах SNc при ВЧС CPu в норме, на модели БП после ведения ротенона с протекцией агентом. Обозначения: степ. выраж. – степень выраженности.

Полученные данные позволяют сделать вывод о способности препарата противостоять перевозбуждению, свойственному патологическим состояниям нервных тканей. Поскольку данное свойство является крайне важным в долгосрочной терапевтической стратегии при любых нейродегенеративных заболеваниях, вполне уверенно можно заявить о необходимости дальнейших, более широких исследований воздействия данного препарата при различных патологических состояниях, поскольку препарат имеет серьезную перспективу в сфере неврологических заболеваний.

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР ^1H регистрировались на приборе Varian "Mercury 300VX" с рабочей частотой 300.08 МГц в растворе ДМСО- d_6 /CCl $_4$ 1/3 с использованием метода двойного резонанса. ТСХ проводили на пластинках "Silufol UV-254" в смеси хлороформ-этилацетат-метанол (4:4:1), проявитель — хлортолуидин. Элементный анализ проводили на элементном CNS-O анализаторе «Euro EA3000».

Оптически чистая небелковая аминокислота предоставлена сотрудниками лаборатории асимметрического синтеза НПЦ «Армбиотехнология».

Синтез N-трет-бутилоксикарбонил-(S)-аланилглицина (1) проводили по известной методике [5].

Синтез N-трет-бутилоксикарбонил-(S)-аланилглицил-(S)- β -(3-изобутил-4-аллил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил)- α -аланина (5). К раствору 1.94 г (7.9 ммоль) N-трет-бутилоксикарбонил-(S)-аланилглицина (1) и 0.95 г (8.2 ммоль) N-гидроксисукцинимид (2) в смеси 15 мл диоксана и 6 мл хлористого метилена при 0°C добавляли 1.87 г (8.5 ммоль) дициклогексилкарбодиимида, предварительно растворенного в 3 мл диоксана. Реакционную смесь перемешивали ~2 ч при 0°C и оставляли на ночь в холодильнике.

Анализ с помощью ТСХ [SiO $_2$, CHCl $_3$ /этилацетат/CH $_3$ OH (2:4:1), проявитель — хлор-толуидин]. Образовавшийся осадок отфильтровывали, растворитель отгоняли на ротонном испарителе, а осадок кристаллизовали из изопропилового спирта. Выход 1.6 г (71%). Полученный сукцинимидный эфир 3 был использован в следующей стадии синтеза N-трет-бутилоксикарбонилтрипептида (5). В плоскодонную колбу с магнитной мешалкой помещали 0.426 г (1.5 ммоль) (S)- β -(3-изобутил-4-аллил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил)- α -аланина (4), 3.1 мл (1.55 ммоль) 0.5M раствора едкого натра (NaOH) и 0.036 г (0.43 ммоль) пищевой соды (NaHCO $_3$). При комнатной температуре добавляли 0.532 г (1.55 ммоль) сукцинимидного эфира N-трет-бутилоксикарбонил-(S)-аланилглицина (3) в 4 мл диоксана, перемешивали реакционную смесь в течение 6 ч и

оставляли на ночь. На следующий день к содержимому колбы добавляли 6 мл этилацетата и 5.6 мл 10% лимонной кислоты. После интенсивного перемешивания органический слой отделяли, а водный слой два раза экстрагировали этилацетатом (по 10 мл). Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, затем растворитель упаривали до суха. Вязкий остаток растворяли при нагревании в смеси 10 мл гексана и 3 мл этилацетата и оставляли на ночь. Выпавший белый осадок отфильтровывали на нутч-филтре, промывали холодным этилацетатом (1 мл), после чего пептид сушили при температуре 65°C. Выход 66.2%, т.пл. 72°C. Найдено, %: С 51.50; Н 7.02; N 16.34. $C_{22}H_{36}N_6O_6S$ Вычислено, %: С 51.55; Н 7.08; N 16.39. Спектр ЯМР 1H (DMSO, δ , м. д., Гц): 0.93 (6H д, J=6.6, 2CH₃), 1.17 (3H д, J=6.9, CH₃CH), 1.37 (9H с, 3CH₃), 2.03 (1H м, J=6.9, CHCH₃), 2.48 (2H д, J=6.9, CH₂CH), 3.68 (2 H д, J=5.4, CH₂), 3.92-4.02 (1H м, CHCH₃), 4.24 (1H дд, J=13.7, 7.8, CH₂), 4.58 (1H дд, J=13.7, 5.9, CH₂), 4.63 (2H уш.д, J=4.8, CH₂All), 4.78 (1H ддд, J=8.2, 7.8, 5.9, CH), 4.98 (1H уш.д, J=17.2, = CH₂), 5.17 (1H уш.д, J=10.5, = CH₂), 5.85 (1H ддт, J=17.2, 10.5, 4.8, = CH), 6.91 (1H уш.д, J=7.3 NH), 7.82 (1H уш.т, J=5.4, NHCH₂), 8.22 (1H д, J=8.2, NH CH), 12.57 (1H ш.с, COOH).

Изучение воздействия трипептида N-трет-бутоксикарбонил-(S)-аланил-глицил-(S)- β -(3-изобутил-4-аллил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил)- α -аланина (5) на электрическую активность нейронов черной субстанции в условиях модели болезни Паркинсона. Работы проводились в лаборатории физиологии компенсации функций ЦНС Института физиологии им. Л.А. Орбели. Проведен сравнительный анализ импульсной активности одиночных нейронов компактной части черной субстанции (SNc) в ответ на высокочастотную стимуляцию (ВЧС) Caudate Putamen (CPu). Опыты проводились на крысах линии "Альбино" (250-300 г) в 3 сериях (132 нейрона, n=7).

1. В норме (33 клетки, n=2);

2. На модели болезни Паркинсона (БП), индуцированной ротеноном, получившей одностороннюю интрацеребральную инъекцию ротенона (0.5 мкг 0.5 мкл димексида со скоростью 1 мкл/мин), в медиальный пучок переднего мозга "medial forebrain bundle" по координатам (AP+0.2; L $\pm$ 2.3; DV+8.6 мм) и выдержанных 4 недели после инъекции ротенона (73 клетки, n=3);

3. На животных с инъекцией ротенона и последующей протекцией посредством внутримышечного введения трипептида в количестве 14 инъекций, вводимых через день, на следующий день после инъекции ротенона и выдержанных 4 недели (26 клеток, n=2). Анализ проводился на основе усредненного количества спайков, с расчетом межимпульсных интервалов и частоты в Гц. Постстимульный уровень активности сравнивался с престимульным уровнем. В ходе экспериментов были исследованы изменения выраженности депрессорных и возбудительных тета-

нических реакций — тетанической депрессии (ТД) и тетанической потенциации (ТП), сопровождаемых посттетанической депрессией ПТД и посттетанической потенциацией (ПТП). Выполнялась регистрация нейрональной активности компактного отдела черной субстанции SNc по координатам (AP-5.0; L±2; DV 8.2 мм) в ответ на высокочастотную (ВЧС, 100 Гц) электрическую стимуляцию стриатума CPu (AP+2; L±2,5; DV 5 мм), что представлено на схеме эксперимента (рис. 2).

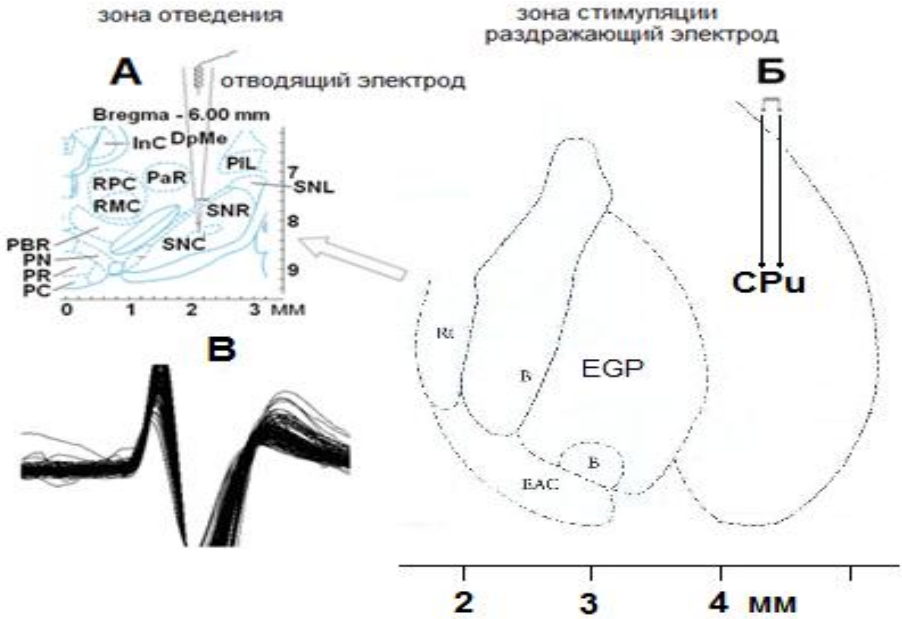


Рис 2. Схема стимуляции CPu (Б) и регистрации активности нейронов SNc (А), представленная с помощью стереотаксических координат: Образец потенциала действия нейрона SNc (Г). CPu – Caudate-Putamen nucleus, комплекс хвостатого ядра и скорлупы.

Все опыты проводились согласно «Правилам ухода за лабораторными животными», публикации NIH за № 85-23, исправленной в 1985 году. Проводился программный математический анализ спайковой активности нейронов в режиме on-line. Использовали построения комплексных усредненных и суммированных перистимульных временных гистограмм (РЕТН) числа спайков с разностной кривой и гистограмм частоты, с вычислением средней частоты спайков. Регистрацию производили с помощью программы, позволяющей селекцию спайков амплитудной дискриминацией, с выводом «растеров» перистимульного спайкинга, построением гистограмм суммы и диаграмм усредненной частоты спайков. Анализ данных проводили по разработанному алгоритму, обеспечивающему достоверность перистимульных изменений межспайковых интервалов (рис. 3).

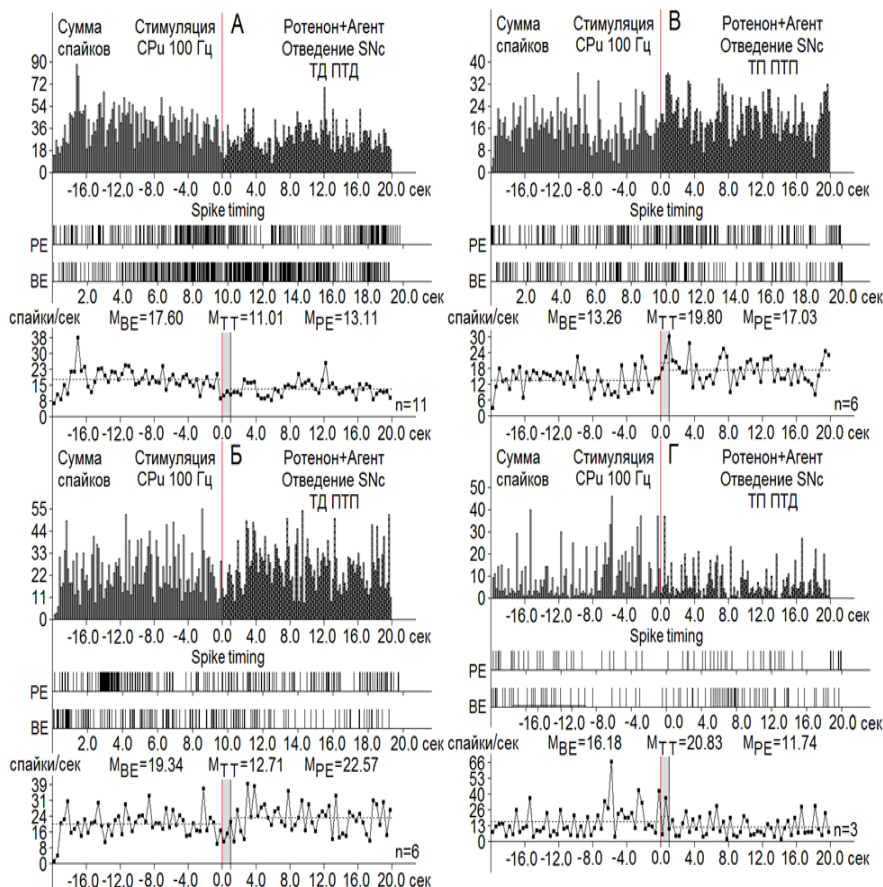


Рис. 3. А-Г сверху – гистограммы суммы спайков пре- и постстимульных депрессорных проявлений спайковой активности ТД ПТД (А), депрессорно-возбудительных – ТД ПТП (Б), возбудительных ТП ПТП (В) и возбудительно-депрессорных ТП ПТД (Г) в реальном времени (до и после стимуляции) нейронов SNc, вызванных ВЧС CPu на модели БП, после введения агента. В середине – raster активности – произвольно избранные одиночные нейроны из данной анализируемой группы. Снизу – диаграммы частоты спайков, представленных в гистограммах, с усредненными значениями (М) для временных отрезков до стимуляции (М BE - before event), на время тетанизации (М TT - time tetanization) и после стимуляции (М PE - post event). Справа от диаграмм – количество испытаний (n).

Однородность двух независимых выборок контролировалась t-критерием Стьюдента. С целью повышения статистической достоверности изменений межспайковых интервалов использовали также двухвыборочный критерий Вилкоксона-Манна-Уитни (Wilcoxon-Mann-Whitney test). В качестве непараметрического, оценивающего однородность независимых двух выборок использовалась разновидность указанного теста – z-тест, определяющий его асимптотическую нормальность. Учет критических значений в сравнении с таковыми нормального распределения при уровнях 0.05, 0.01 и 0.001 показал, что в большинстве случаев спайкинга статистически значимое изменение достигало как минимум уровня 0.05.

Таким образом, биологические исследования полученного трипептида позволяют сделать вывод о его способности противостоять перевозбуждению, свойственному патологическим состояниям нервных тканей.

N-SRԵՏ-ԲՈՒՏՕՔՍԻԿԱՐԲՈՆԻԼ-(S)-ԱԼԱՆԻԼԳԼԻՅԻԼ-(S)-β-(3-ԻՉՈՐՈՒՏԻԼ-4-ԱԼԼԻԼ-5-ԹԻՕՔՍՈ-1,2,4-ՏՐԻԱԶՈԼ-1-ԻԼ)-α-ԱԼԱՆԻՆ ՏՐԻՊԵՊՏԻԴԻ ՍԻՆԹԵԶԸ և ԱԶԴԵՅՈՒԹՅԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ԳՈՐԾ ՆՅՈՒԹԻ ՆԵՅՐՈՆՆԵՐԻ ԷԼԵԿՏՐԱԿԱՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱՎՊԱՐԿԻՆՍՈՆԻ ՏԻՎԱՆԴԱՌՅԱՆ ՄՈԴԵԼԻ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

ՅՈՒ. Մ. ԴԱՆԴՅԱՆ, Տ. Ն. ՍԱՐԳՍՅԱՆ, Ս. Մ. ԺԱՄԳԱՐՅԱՆ, Է. Ա. ԳՅՈՒԼՈՒՄՅԱՆ, Մ. Վ. ՊՈԳՈՍՅԱՆ, Ն. Ա. ՓԱՆՈՍՅԱՆ, Զ. Ս. ՍԱՐԳՍՅԱՆ և Ա. ՍԱԳԿԱՆ

Ակտիվացված էսթերների մեթոդի կիրառմամբ սինթեզվել է N-տրեո-բուտօքսիկարբոնիլտրիպեպտիդ, որը պարունակում է գլիցին և (S)-2-ամինո-3-(3-իզոբուտիլ-4-ալիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ)-պրոպիոնաթթու:

“Pass-Online” ծրագրի տվյալների հիման վրա բացահայտվել է, որ սինթեզված տրիպեպտիդը կարող է ազդել նեյրոնների ակտիվության վրա:

Իրականացվել է N-տրեո-բուտօքսիկարբոնիլ-(S)-ալանիլգլիցիլ-(S)-β-(3-իզոբուտիլ-4-ալիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ)-α-ալանին տրիպեպտիդի ազդեցության ուսումնասիրություն գործնական նյութի նեյրոնների էլեկտրական ակտիվության վրա՝ Պարկինսոնի հիվանդության մոդելի պայմաններում:

Ստացված տվյալները թույլ են տալիս եզրակացնել, որ սինթեզված պեպտիդը օժտված է դիմակայելու ներվային համակարգի գերզգույնացմանը՝ ինչը բնորոշ է նյարդային հյուսվածքների պաթոլոգիկ վիճակներին:

SYNTHESIS OF N-TRET-BUTOXYCARBONYL-(S)-ALANYLGLYCYL-(S)-β-(3-ISOBUTYL-4-ALLYL-5-THIOXO-1,2,4-TRIAZOL-1-YL)-α-ALANINE AND STUDY OF TRIPEPTIDE EFFECT ON ELECTRIC ACTIVITY OF NEURONS OF BLACK SUBSTANCE IN CONDITIONS OF MODEL OF PARKINSON DISEASE

Yu. M. DANGHYAN^b, T. H. SARGSYAN^{a, b}, S. M. JAMGARYAN^b, E. A. GYULUMYAN^b, M. V. POGHOSYAN^{a, d}, H. A. PANOSYAN^c, J. S. SARGSYAN^{a, d} and A. S. SAGHYAN^{a, b}

^aYerevan State University

1, A. Manoukyan Str., Yerevan, 0025, Armenia

^bScientific and Production Center “Armbiotechnology” NAS RA

14, Gyurjyan Str. Yerevan, 0056, Armenia

^cThe Scientific Technological Center of Organic and Pharmaceutical Chemistry NAS RA

26, Azatutyan Str., Yerevan, 0014, Armenia

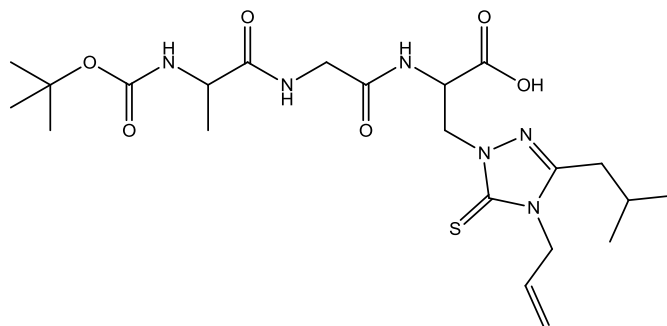
^dL.A.Orbeli Institute of Physiology NAS RA

22, Orbeli Bros. Str., 0028, Yerevan, Armenia

Several decades’ interest towards peptides today has resulted in a widespread use of peptide drugs in pharmaceuticals, the number of which is multiplying every day. Dozens of peptide preparations based on peptides isolated from organisms, and then obtained by chemical, enzymatic and genetically engineered methods, are already known in the drug market. These include insulin, somatostatin, oxytocin, etc.

In the last two decades, short peptides containing non-protein amino acids are also of great interest. They easily overcome all barriers up to the blood-brain ones. In this case, it is more difficult to recognize the substrate from the side of enzymes, which considerably complicates proteolysis and increases the duration of the preparation action.

The peptide containing glycine and (S)-2-amino-3-(3-isobutyl-4-allyl-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl)-propionic acid, which according to the Pass-Online data can affect the activity of neurons, has been synthesized by the method of activated esters.



The effect of N-t-butoxycarbonyl-(S)-alanylglycyl-(S)-β-(3-isobutyl-4-allyl-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl)-α-alanine on the electric activity of neurons of black substance in the conditions of model of Parkinson disease was studied on white rats “Albino”.

A comparative analysis of the impulse activity of single neurons of a compact part of black substance (SNc) in response to high-frequency stimulation (HFS) Caudate Putamen (CPu) was performed. To estimate the degree of manifestation of the activity of neurons SNc, circular diagrams of the average frequency of spikes were constructed.

The analysis of the frequency indicators of the activity of neurons led to the following results. In animals with rotenone intoxication after application of the drug, the values of excitatory effects decreased, both in comparison with the norm and intoxication.

The obtained results allow to conclude that the peptide is able to resist overexcitation relevant to the pathological states of nerve tissues.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Vlieghe P, Lisowski V, Martinez J, Khrestchatsky M. // Drug Discov Today, 2010, v.15, issue 1-2, p. 40.
- [2] Jolene L. Lau, Michael K. Dunn // Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2018, v. 26, issue 10, p. 2700.
- [3] Gregory A. Grant Synthetic peptides Oxford University press, Second edition, 2002.
- [4] Nefkens G., Tesser G. // J. Amer. Chem. Soc., 1961, v. 83, issue. 5, p.1263.
- [5] Дангян Ю.М., Саргсян Т.О., Джамгарян С.М., Гюлумян Э.А., Паносян Г.А., Сагиян А.С. // Хим. ж. Армении, 2010, т. 63, №1, с. 95.