

# О Т З Ы В

Официального оппонента на диссертационную работу Макичян Ани Тиграновны "Синтез, *in vitro* и *in silico* исследование антихолинэстеразных свойств производных хромофора зеленого флуоресцентного белка" представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.03- "Органическая химия".

Синтез новых биологически активных соединений для обеспечения нужд здравоохранения и сельского хозяйства является одной из важнейших задач современной органической химии. В связи с распространением в последнее время во всем мире болезни Алцгеймера, исследования в области создания новых эффективных средств борьбы с этим недугом становятся особенно злободневными. Учитывая вышесказанное, выбор диссертантом в качестве цели разработки методов синтеза производных хромофора ЗФБ и изучения их антихолинэстеразных и антирадикальных свойств, а также выявления способов и закономерностей взаимодействия этих лигандов с ацетилхолинэстеразой и с бутирилхолинэстеразой следует считать актуальным и перспективным.

Диссертационная работа Макичян Ани Тиграновны, изложенная на 138 страницах компьютерного набора, состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов собственных исследований, экспериментальной части, выводов, 20 таблиц, 20 рисунков и списка цитируемой литературы (205 библиографических ссылок).

Во введении автор обосновывает выбор темы диссертации, актуальность, научную новизну и практическую значимость работы.

Литературный обзор, включающий 205 ссылок, посвящен синтезу и свойствам аналогов хромофора семейства зеленого флуоресцентного белка наших дней.

Далее автор переходит к обсуждению результатов собственных исследований. Для синтеза целевых 4-имидазолонов автором выбран метод, основанный на применении ненасыщенных 5(4Н)-оксазолонов. В качестве последних были использованы 4-(бензоилоксибензилиден)-2-фенил-5-оксазолоны, синтезированные с использованием смеси уксусного ангидрида и ацетата натрия, а также смеси третбутилпирокарбонат/пиридин. Разработаны

оптимальные условия синтеза вариированием соотношения реагентов, температуры и времени реакции.

Для синтеза дегидротирозинсодержащих амидов и имидазолонов была применена O-бензоильная защитная группа, которая после взаимодействия соответствующих оксазолонов с 1,1,1,3,3,3-гексаметилдисилазаном была удалена с помощью 3-(диметиламино)-1-пропиламина или 2-(диметиламино)-1-этиламина в ацетонитриле при комнатной температуре.

Исследованы антирадикальные и антихолинэстеразные свойства синтезированных бензиламидов и имидазолонов, показано, что эти свойства более выражены у незащищенных аналогов.

Далее автором осуществлен синтез 2-5-дизамещенных имидазол-4-онов –производных хромофора- зеленого флуоресцентного белка взаимодействием ненасыщенных 5(4X)-оксазолонов с гексаметилдисилазаном в этилацетате, которое приводит к первичным амидам дибензоилдегидротирозинов. В случае же кипячения в ДМФА образуются 2,5-дизамещенные 4-имидазолы. Бензоильную группу из полученных амидов и 4-имидазолонов удаляли реакцией с диметиламинопропиламином в среде ацетонитрила. Исследования антихолинэстеразных свойств полученных соединений показали, что все они в той или иной степени обладают антихолинэстеразной активностью, при этом она более выражена у 4-имидазолонов.

В работе в качестве реагентов использовались алкиловые эфиры аминокислот. Учитывая это, автором был разработан способ получения последних взаимодействием аминокислот с дихлордиметилсиланом в соответствующем спирте. Целевые эфиры аминокислот получены с высокими выходами. Этот метод применен также синтеза алкиловых эфиров глицилглицина и ряда фталоиламинокислот.

Некоторые из полученных метиловых эфиров аминокислот были применены для синтеза ненасыщенных дипептидов, содержащих фрагмент дегидротирозина. Целевые пептиды получены азлактонным методом. Дипептиды, содержащие глицин и фенилаланин, получены также однореакторным синтезом, а именно конденсацией метиловых эфиров аминокислот с соответствующими оксазолонами и удалением O-бензоильной защитной группы в одной колбе. Полученные дипептиды также проявляли антирадикальные свойства. Высокую антихолинэстеразную активность по отношению к ацетилхолинэстеразе и бутирилхолинэстеразе проявили

глицинсодержащие пептиды. В ряду дегидротирозинсодержащих дипептидов наибольшую активность проявляли валинсодержащие дипептиды.

Для синтеза 2,3,5-тризамещенных(4X)-имидазол-4-онов аналогов зеленого флуоресцентного белка в качестве исходных веществ применялись метиловые эфиры бензоилдегидротирозилдипептидов. Дегидратация последних гексаметилдисилазаном в диметилформамиде привела к образованию целевых 2,3,5-тризамещенных 4-имидазолонов. Изучение хода этой реакции показало, что в результате образуются как бензоильные производные, так и гидроксипроизводные. Установлено, что в ходе реакции преимущественно происходит удаление бензоильной группы, а затем циклизация в искомый имидазолон.

В случае метилового эфира дибензоилдегидротирозилаланина реакция приводит к смеси веществ, из которой удалось выделить 2-фенил-5-(4-гидроксibenзилиден)-4-имидазолон. Образование последнего автор объяснил термическим разложением с выбросом молекулы метилового эфира акриловой кислоты.

Исследования антирадикальных и антихолинэстеразных свойств синтезированных соединений они обладают от слабой до средней антирадикальной активностью. Одно из производных имидазол-4-она проявило сравнительно высокую антиацетилхолинэстеразную активность.

С целью поиска новых потенциально активных производных 4-имидазолонна осуществлен синтез соединений, содержащих в молекуле два остатка 5-(4-гидроксibenзилиден)-4-имидазолонна. Синтез проводили взаимодействием оксазолонов с тетраметилендиамином и с гексаметилендиамином в хлороформе при комнатной температуре. При помощи диметиламинопропиламина O-защитная группа была удалена, а полученные бис-амиды были циклизованы кипячением с гексаметилдисилазаном в диметилформамиде.

И в этом случае O-добензоильные производные по своим антирадикальным и антихолинэстеразным свойствам уступают бис-амидам, содержащим фенольную гидроксильную группу. В этом ряду найдено одно производное бис-имидазолонна, которое по своей активности превосходило контрольное вещество-галловую кислоту и не уступало витамину С.

Установлено, что соединение 36 является самым активным блокатором как для ацетилхолинэстеразы, так и для бутирилхолинэстеразы. В связи с тем, что данное производное имидазолонна одновременно проявило высокую

антирадикальную активность, оно было предложено для дальнейших углубленных биологических исследований.

Для выяснения способов взаимодействия синтезированных соединений с холинэстеразами осуществлен молекулярный докинг как с ацетилхолинэстеразой, так и с бутирилхолинэстеразой. При этом установлено, что синтезированные соединения образуют комплексы с ацетилхолинэстеразой за счет гидрофобных и водородных связей. Для сравнения были выбраны несколько известных лекарственных препаратов (донепесил, ревастигмин, такрин и галантамин), использующиеся на сегодняшний день в профилактике и лечении болезни Альцгеймера. Расчеты биофизических параметров комплексообразования (энергия связывания и константа связывания) показали, что многие синтезированные автором лиганды превосходят вышеупомянутые лекарства. Изучены также фармакокинетические свойства и токсичность исследуемых соединений.

Обобщая сказанное выше, следует отметить, что диссертантом проделана большая и интересная работа на хорошем научном и экспериментальном уровне. Для подтверждения своих умозаключений и выводов автором применен весь арсенал современных физикохимических методов установления структуры синтезированных соединений, а также возможности современных компьютерных программ.

К содержанию и оформлению диссертации имеются следующие замечания:

1. В литературном обзоре автор приводит способы получения аналогов хромофора семейства зеленого флуоресцентного белка. Хотелось бы, чтоб автор провел бы анализ их биологической активности.

2. Обсуждение результатов собственных исследований излишне перегружено экспериментальными подробностями (температура, время реакции и т.п.).

3. Утверждение, что образование имидазолна 36 объясняется термическим разложением с отрывом молекулы метилового эфира акриловой кислоты можно было подтвердить уловив ее.

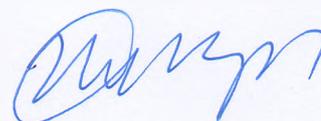
4. Следовало бы провести сравнение предложенного метода синтеза эфиров аминокислот с другими методами для выявления преимуществ одного.

Сделанные замечания носят рекомендательный характер и не умаляют достоинств диссертации, которая по своему объему, актуальности, научной новизне и практической значимости соответствует требованиям ВАК РА,

предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Макичян Ани Тиграновна заслуживает присвоения ей ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.03-“Органическая химия”.

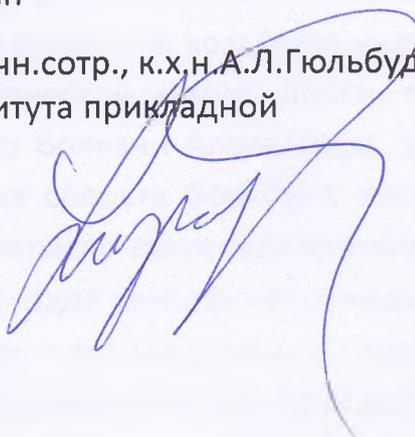
Автореферат и опубликованные статьи полностью отражают содержание диссертации.

Заведующий отделом Института прикладной  
химии АРИАК  
к.х.н



А.Л.Гюльбудагян

Подпись ст.научн.сотр., к.х.н.А.Л.Гюльбудагяна заверяю  
Директор Института прикладной  
Химии АРИАК  
Р.Г.Асратян



14.11.2023