

На правах рукописи



Смолина Анастасия Васильевна

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ
ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФУЛЛЕРЕНА C₆₀ НА
ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ МИШЕНИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА**

03.01.02 – биофизика

Автореферат диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Черноголовка – 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте проблем химической физики Российской академии наук.

Научные руководители: **Григорьев Владимир Викторович**, доктор биологических наук, заведующий лабораторией нейрорецепции ФГБУН Института физиологически активных веществ Российской академии наук;

Котельникова Раиса Алексеевна, кандидат физико-математических наук, заведующая лабораторией физико-химической биологии физиологически активных соединений ФГБУН Института проблем химической физики Российской академии наук.

Официальные оппоненты: **Алесенко Алиса Владимировна**, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией нейролипидологии ФГБУН Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук;

Пашенко Владимир Захарович, доктор физико-математических наук, профессор, заведующий сектором биофотоники кафедры биофизики биологического факультета ФГБОУ ВО «Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук.

Защита состоится «__» _____ 2015 г. в ____ на заседании диссертационного совета Д 002.039.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук по адресу: 119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, Ленинский проспект, 38 и на сайте <http://ibcp.chph.ras.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета Д 002.039.01,
кандидат химических наук

Л.И. Мазалецкая

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В последние годы производные фуллеренов привлекают внимание исследователей в области медицинской химии благодаря широкому спектру обнаруженной у них биологической активности, которая позволяет рассматривать их как перспективные соединения для разработки потенциальных лекарственных препаратов, в том числе для лечения социально-значимых заболеваний, таких как нейродегенеративные расстройства, приводящие к деменции. Наиболее распространенной формой деменции является болезнь Альцгеймера (БА), которая признана одной из важнейших медико-социальных проблем современности. Это неизлечимое нейродегенеративное заболевание (НЗ), которое приводит к полному расстройству когнитивных функций. В настоящее время в мире деменции подвержены более 44 млн. человек [Prince M. et al. ADI: World Alzheimer Report 2014. London. 2014. 104 p.]. В России число больных с деменцией альцгеймеровского типа составляет более 1.85 млн. человек [Ушаков Ю. В. и др. Совр. тер. в псих. и неврол. 2014. №1. С. 6]. До сих пор не разработаны лекарственные препараты, позволяющие предотвратить или излечить БА. Современные клинические препараты оказывают только симптоматическое действие и, в лучшем случае, на некоторое время задерживают развитие патологических процессов, многие из них при длительном применении проявляют токсические эффекты. Ключевыми звеньями развития нарушений когнитивных процессов при БА, усложняющих задачу эффективного лечения, являются глутамат-опосредованное нейровоспаление, окислительный стресс, агрегация β -амилоидных белков и гибель нейронов. Поэтому создание лекарственных препаратов, действующих одновременно на несколько ключевых терапевтических мишеней БА, является одной из важнейших задач современной медицины и фармакологии. Таким образом, при разработке лекарственных препаратов особое внимание уделяется подходам, которые опираются на представления о молекулярных механизмах развития БА и позволяют создавать препараты, селективные к ее терапевтическим мишеням. Известно, что производные фуллеренов способны выступать носителями биологически активных группировок и веществ для доставки к специфическим мишеням различных патологий, соединения легко проникают через клеточные мембраны. Многие из них обладают широким спектром биологической активности, в том числе антиоксидантной и нейропротекторной (ингибирование глутаматной эксайтотоксичности, предотвращение агрегации β -амилоидных белков) при низкой токсичности. Эти данные свидетельствуют о том, что водорастворимые производные фуллерена C_{60} (ВРПФ) несомненно представляют интерес для медицинской фармакологии в качестве потенциальных лекарственных средств для терапии социально-значимых заболеваний и, в частности, БА. Исходя из вышесказанного, очевидно, что задача разработки принципов создания эффективных модуляторов когнитивных функций

головного мозга на основе водорастворимых производных фуллеренов является актуальной с точки зрения перспективы создания нового класса эффективных лекарственных препаратов для терапии БА.

Цель и задачи исследования. Цель диссертационной работы – комплексное исследование физико-химических механизмов действия водорастворимых производных фуллерена C₆₀ на терапевтические мишени болезни Альцгеймера для создания эффективных модуляторов когнитивных функций.

Задачи:

1. Исследование способности полизамещенных производных фуллерена C₆₀ проникать в гидрофильные и гидрофобные сайты фосфолипидных мембран.
2. Определение типа ингибирования моноаминоксидазы В водорастворимыми производными фуллерена C₆₀.
3. Оценка антиоксидантного и антирадикального действия ВРПФ.
4. Исследование влияния ВРПФ на функциональную активность ионотропных глутаматных AMPA и NMDA рецепторов.
5. Изучение влияния соединений-лидеров на поведение и память животных.

Научная новизна. Автором впервые показано, что водорастворимые полизамещенные производные фуллерена C₆₀ оказывают влияние на терапевтические мишени болезни Альцгеймера: снижают каталитическую активность MAO-B, ингибируют процесс свободнорадикального окисления липидов, активируют глутаматные ионотропные AMPA рецепторы и не оказывают влияния на NMDA рецепторы центральной нервной системы млекопитающих. Обнаруженная позитивная модуляция AMPA рецепторов производными фуллерена свидетельствует об их потенциальной когнитивно-стимулирующей активности. Впервые показано, что ВРПФ улучшают долговременную память животных и не вызывают побочных психостимулирующих эффектов. Впервые предложен алгоритм оптимизации фармакологического профиля терапевтически перспективных соединений: создание гибридных структур на основе аминокислотных производных фуллерена C₆₀ и фармакологически активных группировок.

Научно-практическая ценность работы. На основании результатов проведенных исследований разработаны принципы направленного создания фуллереновых наноструктур нейропротекторного действия – потенциальных препаратов для лечения и предупреждения когнитивных расстройств.

Предложен путь оптимизации свойств терапевтически перспективных когнитивно-стимулирующих веществ за счет создания гибридных структур на

основе аминокислотных производных фуллерена C_{60} и присоединенных к ним физиологически активных соединений.

Показано, что водорастворимые полизамещенные производные фуллерена C_{60} являются позитивными модуляторами ионотропных глутаматных AMPA рецепторов, не проявляют нейротоксичных свойств, улучшают память животных и поэтому являются многообещающими соединениями для разработки когнитивно-стимулирующих препаратов.

Результаты диссертационной работы свидетельствуют о перспективности развития направления создания гибридных структур на основе фуллеренов и биологически активных соединений, проявляющих терапевтическое действие на мишени социально значимых заболеваний, с целью разработки эффективных лекарственных препаратов.

Основные положения, выносимые на защиту.

Водорастворимые полизамещенные производные фуллерена C_{60} и гибридные структуры на основе аминокислотного производного фуллерена C_{60} действуют одновременно на несколько ключевых терапевтических мишеней болезни Альцгеймера: эффективно ингибируют каталитическую активность MAO-B, обладают антиоксидантной и антирадикальной активностью, являются позитивными модуляторами ионотропных глутаматных AMPA рецепторов ЦНС млекопитающих.

Водорастворимые полизамещенные производные фуллерена C_{60} и гибридные структуры на основе аминокислотного производного фуллерена C_{60} не проявляют нейротоксичности, так как не активируют ионотропные глутаматные NMDA рецепторы ЦНС млекопитающих.

Водорастворимые полизамещенные производные фуллерена C_{60} и гибридные структуры на основе аминокислотного производного фуллерена C_{60} улучшают долговременную память животных без побочных психостимулирующих эффектов в поведенческих тестах.

Одним из перспективных способов оптимизации фармакологических свойств когнитивно-стимулирующих соединений является направленное конструирование гибридной структуры на основе аминокислотного производного фуллерена C_{60} и фармакологически активных соединений.

Личный вклад автора. Непосредственный вклад автора заключается в проведении анализа литературных данных; планировании и проведении экспериментов по исследованию взаимодействия ППФ с фосфолипидной мембраной, определению антиоксидантной и антирадикальной активности водорастворимых производных фуллерена C_{60} , их влияния на каталитическую активность моноаминоксидаз А и В, определению влияния производных фуллерена C_{60} на функциональное состояние ионотропных глутаматных AMPA рецепторов; в

оформлении, анализе и обсуждении полученных результатов; в участии в подготовке публикаций. Эксперименты по действию исследуемых соединений на ионотропные глутаматные NMDA рецепторы были проведены совместно с нач. радиоизотопного блока О. А. Драным, ст. лаб. С. В. Мезенцевой (ИФАВ РАН), по влиянию ВРПФ на поведение лабораторных животных совместно с с.н.с. Г. И. Ванькиным, асп. Н. А. Марковой, асп. Н. С. Николаевой (ИФАВ РАН).

Апробация работы. Результаты проведенных исследований были представлены в виде устных и стендовых докладов на российских и международных конференциях: «Органические и гибридные наноматериалы» (Иваново, 2009), Юбилейной научной конференции «Химическая физика вчера, сегодня, завтра» (Москва, 2011), Восьмом международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Украина, 2012), «Успехи химической физики» (Черноголовка, 2011, 2013), Первой Российской конференции по медицинской химии с международным участием (Москва, 2013), конкурсе на соискание премии им. С.М. Батурина (Черноголовка, 2014), VI Троицкой конференции «Медицинская физика и инновации в медицине» (Троицк, Москва, 2014).

Публикации. По материалам диссертации опубликована 21 работа, из них 4 - опубликованы в научных рецензируемых журналах: отечественных (входящих в перечень Высшей аттестационной комиссии Министерства образования и науки РФ) и иностранном. Материалы диссертации докладывались на российских и зарубежных конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 143 страницах машинописного текста и включает введение, литературный обзор, экспериментальную часть, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список использованной литературы (291 библиографическая ссылка). Работа содержит 30 рисунков и 4 таблицы.

Благодарности. Автор выражает благодарность научным руководителям работы к.ф.-м.н. Р. А. Котельниковой и д.б.н. В. В. Григорьеву за помощь в постановке задач, организации экспериментальной работы и обсуждении полученных результатов; рецензенту к.б.н. А. А. Терентьеву за ценные замечания при подготовке диссертации; сотрудникам ИФАВ РАН О. А. Драному, С. В. Мезенцевой, к.м.н. Г. И. Ванькину, Н. А. Марковой и Н. С. Николаевой за помощь в организации и проведении исследований, а также к.х.н. П. А. Трошину и к.х.н. В. С. Романовой за предоставление ВРПФ.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектами исследования были выбраны две группы водорастворимых производных фуллерена C_{60} (рисунок 1): полизамещенные производные фуллерена C_{60} (ППФ), синтезированные П. А. Трошиным (ИПХФ РАН), и гибридные структуры на основе аминокислотного производного фуллерена C_{60} (ГСФ), синтезированные В. С. Романовой (ИНЭОС РАН). У ППФ I и III (рисунок 1) к сфероиду фуллерена C_{60} присоединены 5 ионогенных карбоксильных групп, у ППФ II – более 20 недиссоциирующих гидроксильных полярных групп. ГСФ – это наноструктуры, в которых к сфероиду фуллерена C_{60} присоединены два адденда: аминокислота пролин для обеспечения растворимости в воде, а также функциональные группировки (рисунок 1, ГСФ V и VI) или физиологически активное вещество (рисунок 1, ГСФ VIII). Соединение VII (рисунок 1) – аналог димебона, проявляющий нейротропные свойства.

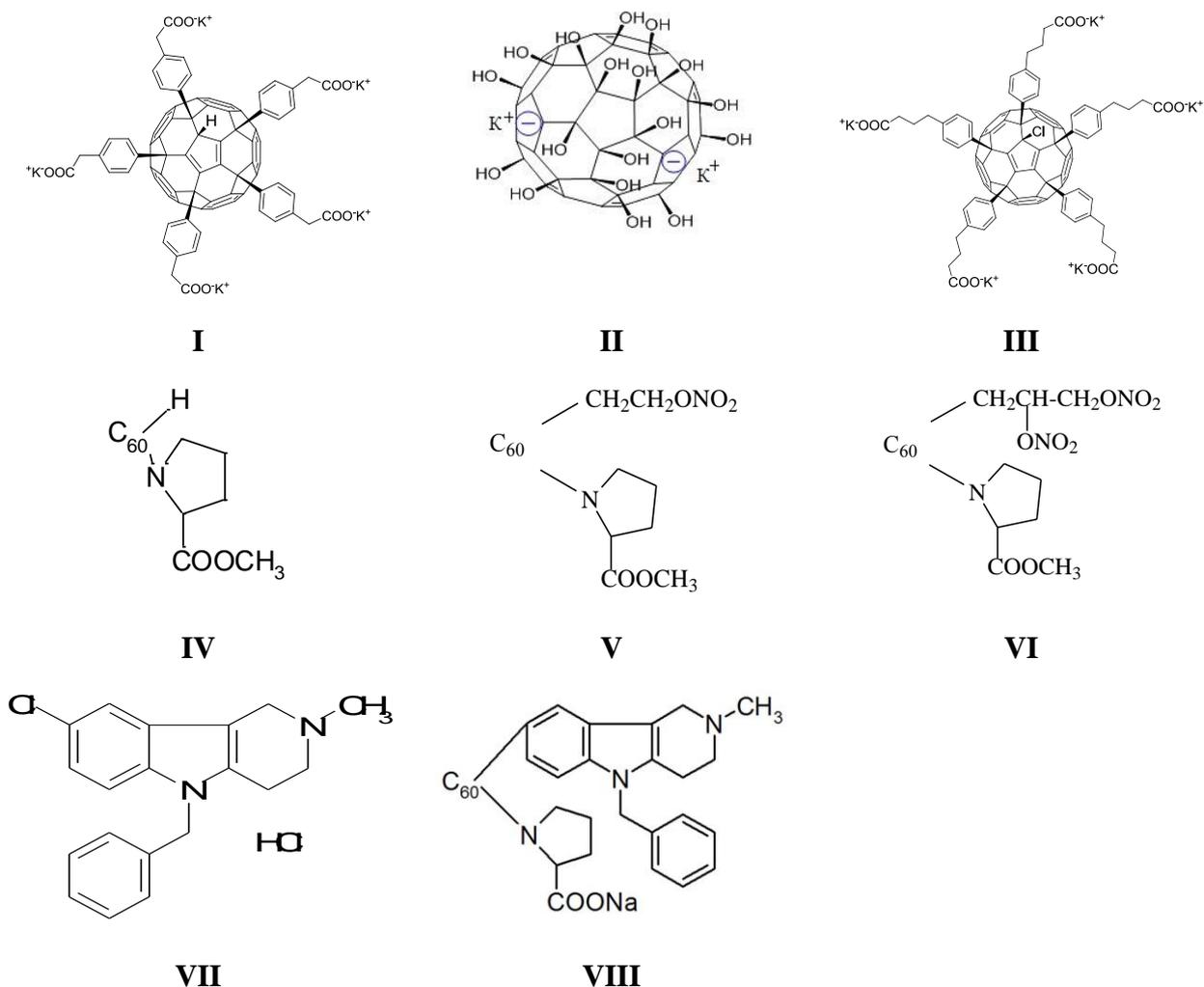


Рисунок 1. Исследуемые соединения: водорастворимые полизамещенные производные фуллерена C_{60} (I-III), гибридные структуры фуллерена C_{60} (IV-VI, VIII) и биологически активное вещество (VII).

Растворимость в воде для ППФ – 10-100 мг/мл, для ГСФ – около 2 мг/мл.

При выполнении настоящей диссертационной работы из ряда ВРПФ отбирались соединения-лидеры по эффективности влияния на терапевтические мишени БА. В работе использовались следующие методы: метод флуоресцентных зондов для исследования взаимодействия ППФ с фосфолипидной мембраной, методы определения антиоксидантной активности по изменению содержания малонового диальдегида (МДА) – конечного продукта пероксидного окисления липидов (ПОЛ), регистрация хемилюминесценции люминола для оценки антирадикального действия, а также исследования влияния соединений на каталитическую активность моноаминоксидазы формы А и В (МАО-А и МАО-В, соответственно), включая кинетический метод исследования механизма ингибирования МАО-В. Эксперименты проводились в условиях *in vitro*: в модельной системе – гомогенате головного мозга мышей. Затем определяли влияние ВРПФ-лидеров на рецепторные мишени БА – ионотропные глутаматные AMPA и NMDA рецепторы свежесекретированных нейронов головного мозга крыс – электрофизиологическим методом patch-clamp и методом радиолигандного связывания с рецепторами, соответственно. Завершающим этапом комплексного исследования соединений-лидеров являлось их тестирование на предмет влияния на поведение и память лабораторных животных (мышей самцах линии С57В1/6 в возрасте 3-4 месяцев) в тестах «Открытое поле» и «Узнавание новой локализации известного объекта». В экспериментальной части диссертационной работы описаны выше перечисленные методы и статистическая обработка результатов.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Исследование влияния водорастворимых полизамещенных производных фуллерена C₆₀ (ППФ) на терапевтические мишени болезни Альцгеймера и поведение животных

В главе 3 оценивалось влияние ВРПФ на терапевтические мишени и процессы БА по следующим критериям:

1. *Ингибирование каталитической активности митохондриального фермента МАО-В.* С одной стороны, этот фермент осуществляет метаболизирование дофамина в мозге до гомованилиновой кислоты, и его ингибирование позволяет пролонгировать эффекты синаптического дофамина, что необходимо для активации когнитивных процессов. С другой стороны, активная работа МАО-В приводит к продукции астроцитами избыточного количества тормозного нейромедиатора γ -аминомасляной кислоты (ГАМК), что ведет к ухудшению

памяти. Ингибиторы МАО-В снижают выработку ГАМК, усиливают синаптическую передачу и, следовательно, улучшают память животных.

2. *Антиоксидантная активность и, в частности, способность перехватывать свободные радикалы*, так как образование свободных радикалов при нейродегенерации является одним из важнейших факторов развития заболевания. Доказано существование тесной взаимосвязи между снижением содержания митохондриальной супероксиддисмутазы (Cu, Zn-СОД) и интенсификацией процесса генерации супероксидов при БА;
3. *Предотвращение агрегации β -амилоидных белков*. Как известно, накопление β -амилоидных фибрилл препятствует передаче сигналов синапсом, что ведет к ухудшению памяти;
4. *Позитивная модуляция работы ионотропных глутаматных AMPA рецепторов нейронов ЦНС млекопитающих*. Согласно литературным данным, она усиливает синаптическую передачу, а также запускает механизм экспрессии генов, отвечающих за синтез нейротропинов (факторов роста, регулирующих выживание и функционирование нейронов);
5. *Снижение активности ионотропных глутаматных NMDA рецепторов нейронов ЦНС млекопитающих*, так как их гиперактивация ведет к глутаматопосредованной эксайтотоксичности.

Для подтверждения когнитивно-стимулирующей активности соединений-лидеров *in vivo* проводили тест «Узнавание новой локализации известного объекта». Для выявления влияния соединений-лидеров на двигательную активность, тревожность и ориентировочно-исследовательское поведение животных использовали тест «Открытое поле».

Первоначально по характеру тушения флуоресценции водорастворимого зонда 2,7-дибромпрофлавина (рисунки 2, 3) и гидрофобного зонда пирена производными фуллерена C₆₀ I-III (рисунок 1) была исследована локализация соединений в модельных мембранах фосфотидилхолиновых липосом. Известно, что при динамическом взаимодействии молекул тушение люминесценции зонда происходит при молярных концентрациях соединения-тушителя. Из рисунков 2 и 3 видно, что тушение флуоресценции хромофора происходит уже при концентрациях производных фуллерена C₆₀ 10⁻⁶-10⁻⁵ М, поэтому можно предположить, что дезактивация возбужденного состояния красителей совершается в результате образования долгоживущего комплекса зонд-ППФ.

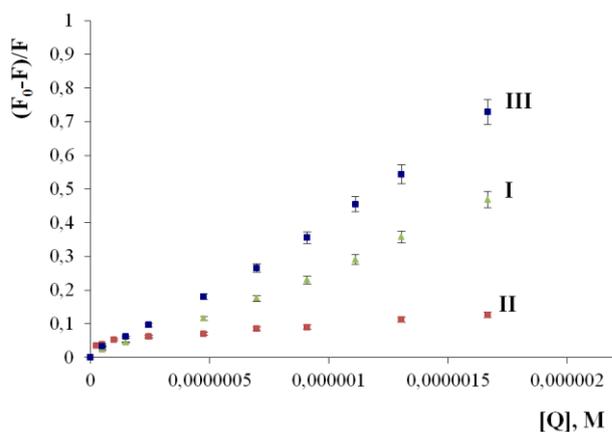


Рисунок 2. Тушение флуоресценции 2,7-дибромпрофлавина в буфере трис-НСl (рН=7.2, 0.02 М) в присутствии ППФ I-III. $K_c(I)=2.85 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$; $K_c(II)=0.60 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ и $K_c(III)=4.50 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$.

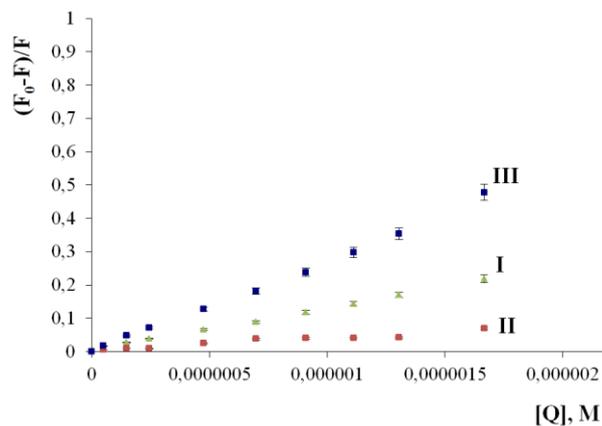


Рисунок 3. Тушение флуоресценции 2,7-дибромпрофлавина в суспензии фосфатидилхолиновых липосом в присутствии ППФ I-III. $K_c(I)=1.30 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$; $K_c(II)=0.38 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ и $K_c(III)=2.85 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$.

Для ППФ I-III в координатах Штерна-Фольмера были определены константы равновесия (K_c), которые характеризуют прочность комплекса 2,7-дибромпрофлавина-ППФ в водном растворе трис-НСl: $2.85 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, $0.60 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ и $4.50 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, соответственно, а также в составе мембран фосфатидилхолиновых липосом: $1.30 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, $0.38 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ и $2.85 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, соответственно (рисунки 2, 3). Полученный результат свидетельствует о включении ППФ в фосфатидилхолиновую мембрану, в сайты локализации зонда 2,7-дибромпрофлавина, а именно в область полярных головок фосфолипидов. Как видно из рисунков 2 и 3, наиболее прочные комплексы (как в водном растворе, так и в липосомах) образуются между зондом и ППФ III.

ППФ I-III в концентрации 10^{-6} - 10^{-5} М тушат флуоресценцию пирена предположительно за счет образования долгоживущих комплексов зонд-ППФ, что свидетельствует о проникновении соединений в гидрофобные сайты мембран. Получены значения констант равновесия комплекса пирен-ППФ (K_c) для ППФ I-III: $0.37 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, $0.53 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ и $0.59 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, соответственно.

Таким образом, было установлено, что исследуемые ППФ включаются в фосфолипидные мембраны липосом и локализуются как в области полярных головок, так и в области жирнокислотных остатков фосфолипидов модельных мембран.

Влияние ППФ на активность MAO-B и свободнорадикальное окисление липидов

В рамках решения задач диссертационной работы исследовалось действие ППФ I-III на каталитическую активность MAO-B и процесс свободнорадикального окисления липидов. В результате проведенных тестов, установлено, что ППФ I и II снижают интенсивность процесса ПОЛ и ингибируют MAO-B (таблица 1). ППФ III не действует на каталитическую активность MAO-B, но также обладает антиоксидантным действием (таблица 1), оно рассматривается как соединение сравнения. Для оценки эффективности соединений как антиоксидантов использовался ионол (таблица 1).

Таблица 1. Влияние ППФ I-III на процесс ПОЛ и каталитическую активность MAO, антирадикальная активность соединений в гомогенате головного мозга мышей ($p < 0.05$).

Соединение	Содержание МДА, мкМ/мг белка	Светосумма, %	Активность фермента, мМ NH ₃ /мг белка	
			MAO-B	MAO-A
Контроль	2.2±0.1	100±4.5	3.2±0.2	1.7±0.2
I [10 ⁻⁵ М]	1.0±0.1	84.9±5.1	1.8±0.2	0.9±0.2
II [10 ⁻⁵ М]	1.4±0.1	71.8±4.9	1.9±0.2	2.9±0.3
III [10 ⁻⁵ М]	1.2±0.1	78.0±4.6	3.5±0.3	2.0±0.2
Ионол	0.6±0.0	82.1±4.9		

В работе изучалась кинетика влияния ППФ I и II на реакцию дезаминирования бензиламина, катализируемую ферментом MAO-B, в гомогенате головного мозга мышей. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата в присутствии ингибитора и без него оценивали в обратных координатах Лайнуивера-Берка. Как видно из рисунков 4 и 5, ППФ I конкурентно ингибирует MAO-B с константой ингибирования $K_i = 0.34 \cdot 10^{-6}$ М, а ППФ II неконкурентно ингибирует MAO-B с константой ингибирования $K_i = 1.12 \cdot 10^{-6}$ М. Таким образом, ППФ I и II могут способствовать активации когнитивных процессов.

ППФ-лидеры обладают противоположным действием на MAO-A: ППФ I является ингибитором MAO-A, в то время как ППФ II активизирует MAO-A (таблица 1). ППФ III не влияет на активность фермента (таблица 1). Следовательно, ППФ I возможно будет оказывать антидепрессивный эффект, а ППФ II снимать повышенное возбуждение нервной системы, что может быть важно при лечении НЗ с соответствующими симптомами.

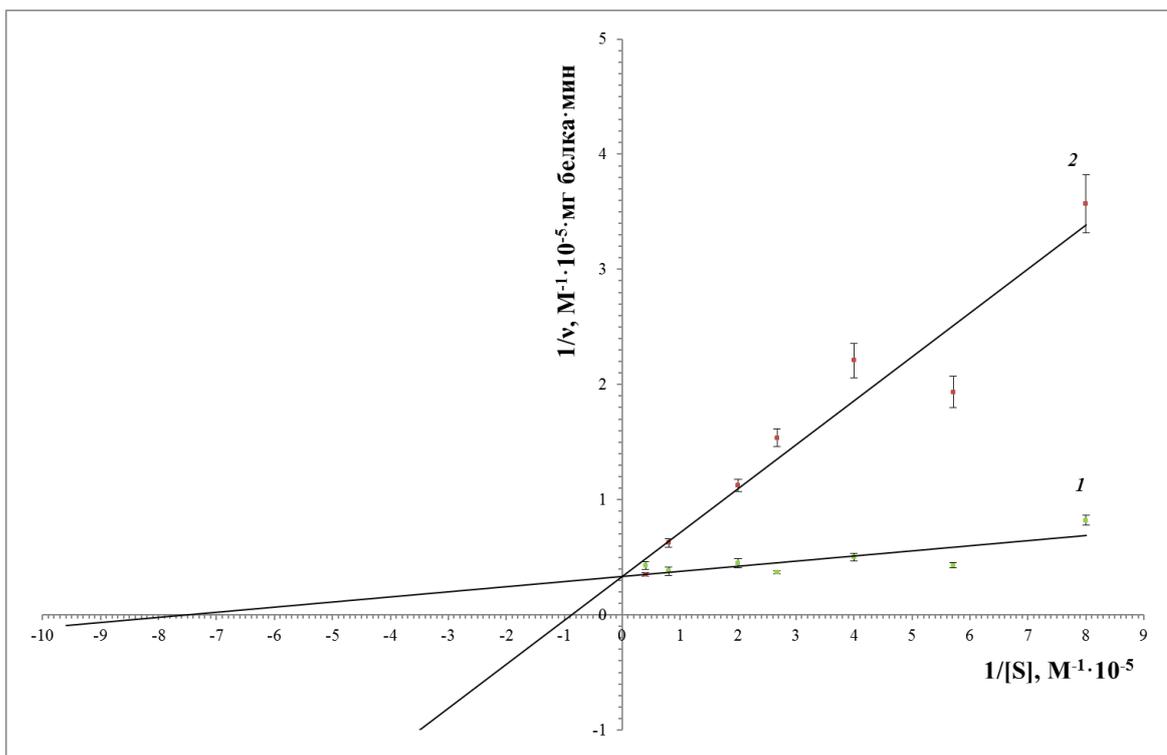


Рисунок 4. Конкурентное ингибирование реакции дезаминирования бензиламина, катализируемой моноаминоксидазой В, при действии ППФ I. 1 – контроль (в отсутствии ингибитора); 2 – в присутствии ППФ I в концентрации $2.5 \cdot 10^{-6}$ М. $K_i=0.34 \cdot 10^{-6}$ М. [S] – концентрация бензиламина (субстрата MAO-B); v – скорость ферментативной реакции.

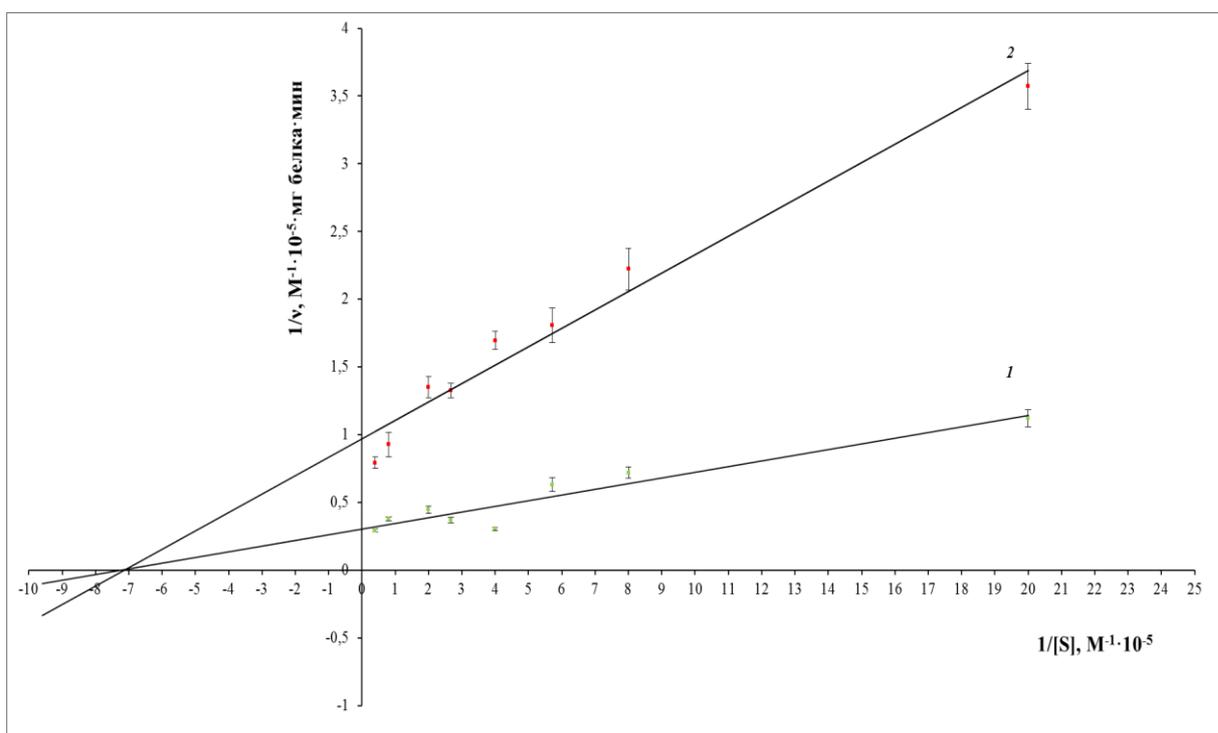


Рисунок 5. Неконкурентное ингибирование реакции дезаминирования бензиламина, катализируемой моноаминоксидазой В, при действии ППФ II. 1 – контроль (в отсутствии ингибитора); 2 – в присутствии ППФ II в концентрации $2.5 \cdot 10^{-6}$ М. $K_i=1.12 \cdot 10^{-6}$ М. [S] – концентрация бензиламина (субстрата MAO-B); v – скорость ферментативной реакции.

Известно, что образование свободных радикалов при нейродегенерации является одним из важнейших факторов развития этого заболевания, поэтому способность терапевтически перспективных веществ к захвату активных радикалов является необходимым свойством для потенциальных препаратов для лечения БА. Антирадикальная активность соединений оценивалась методом хемилюминесценции по изменению люминесценции люминола (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндиона). Содержание свободных радикалов в модельной системе (гомогенате головного мозга мышей) определяли по изменению светосуммы: площади под кинетической кривой изменения интенсивности свечения люминола при взаимодействии его с активными формами кислорода. Как видно из таблицы 1, в присутствии ППФ происходит уменьшение светосуммы, значит, в модельной системе снижается содержание активных радикалов кислорода. Очевидно, что антирадикальная активность ППФ определяется в основном акцепторными свойствами сфероидов фуллерена. Для сравнения использовался известный антиоксидант ионол, который перехватывает 18% свободных радикалов (таблица 1). Наиболее эффективно ППФ II: оно снижает содержание активных радикалов в системе на 28%.

Аналоги ППФ I и II проявляют высокую антиамилоидную активность: в экспериментах *in vitro* предотвращают образование фибрилл β -амилоида и разрушают зрелые фибриллы [Bobylev A. G. et al. *Org. Biomol. Chem.* 2011. 9 (16). P. 5714-5719]. ППФ I и III мало токсичны в отношении объекта исследований – мыши, а ППФ II – практически нетоксично [Корнев А. Б. и др. *Иван. гос. ун-т, Иваново.* 2013. С. 439-446]. Таким образом, ППФ I и II отвечают критериям первичного отбора потенциальных позитивных модуляторов когнитивных процессов.

Влияние ППФ на функциональное состояние ионотропных глутаматных AMPA и NMDA рецепторов

Известно, что позитивная модуляция работы ионотропных глутаматных AMPA рецепторов нейронов ЦНС млекопитающих усиливает синаптическую передачу, способствуя формированию и улучшению памяти, а также запускает механизм экспрессии генов, отвечающих за синтез нейротропинов (факторов роста, регулирующих выживание и функционирование нейронов) и всегда свидетельствует о потенциальной когнитивно-стимулирующей активности исследуемых соединений. В рамках настоящей работы мы исследовали влияние ППФ на функциональное состояние AMPA рецепторов нейронов ЦНС крыс: ППФ I и II в диапазоне концентраций 10^{-10} - 10^{-5} М вызывают позитивную модуляцию ответов AMPA рецепторов с максимумом потенциации при концентрации ППФ 10^{-7} М: 63% и 49%, соответственно (рисунок 6). При отмывке нейронов от соединений амплитуда токов восстанавливается до уровня контрольных значений,

что указывает на обратимость действия ППФ. Показано, что соединение ППФ III потенциации токов не вызывает (рисунок 6).

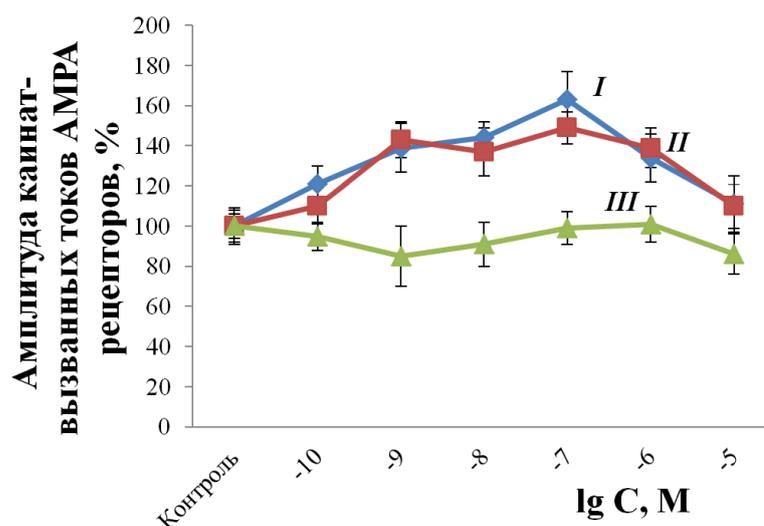


Рисунок 6. Действие ППФ I-III на амплитуду каинат-вызванных токов AMPA рецепторов нейронов Пуркинье мозжечка крыс ($p < 0.05$). Примечание: по оси абсцисс – логарифм концентрации соединений в молях.

Известно, что гиперактивация ионотропных глутаматных NMDA рецепторов нейронов ЦНС млекопитающих приводит к глутамат-опосредованной эксайтотоксичности, а впоследствии – гибели нейронов. В настоящей работе определялось наличие взаимодействия исследуемых ППФ с участками связывания МК-801 и ифенпродила на NMDA рецепторах. Для этого были использованы два радиоактивных лиганда: [³H]МК-801 и [³H]ифенпродил. Установлено, что ППФ I-III в диапазоне концентраций 10^{-9} - 10^{-6} М в условиях *in vitro* не конкурируют за сайты связывания на NMDA рецепторах ни с МК-801, ни с ифенпродилом. Таким образом, исследуемые соединения не проявляют нейротоксичности, так как не влияют на функциональную активность NMDA рецепторов.

Исследование ППФ-лидеров в поведенческих тестах

Для подтверждения когнитивно-стимулирующей активности соединений-лидеров и выявления их влияния на двигательную активность, тревожность и ориентировочно-исследовательское поведение мышей использовались тесты «Узнавание новой локализации известного объекта» и «Открытое поле». Соединения вводились однократно зондом в желудок. Установлено, ППФ I и II, которые являются позитивными модуляторами AMPA рецепторов, улучшают долговременную память животных при введении в малой дозе – 1 мг/кг. Напротив, соединение сравнения ППФ III, которое не действует на AMPA рецепторы, не влияет на память мышей. ППФ I снижает тревожность в дозе 0.5 мг/кг. ППФ II в дозе 0.1 мг/кг повышает вертикальную исследовательскую активность мышей.

3.2. Исследование влияния гибридных структур на основе аминокислотных производных фуллерена C₆₀ (ГСФ) на терапевтические мишени болезни Альцгеймера и поведение животных

Влияние ГСФ на активность MAO-B и свободнорадикальное окисление липидов

Исследуемыми ГСФ являются нитраты аминокислотных производных фуллерена C₆₀ (рисунок 1, V и VI), особенностью которых является их способность выступать в качестве доноров монооксида азота [Котельников А. И. и др. Альм. клин. мед. 2008. 17 (2). С. 340-343]. Интерес к созданию и изучению молекулярных механизмов биологического действия доноров NO обусловлен особенностями физиологической роли этого газа, а также литературными данными по нейропротекторному действию этой группы соединений.

Для установления механизма взаимодействия соединений с ферментом MAO-B в предлагаемой работе исследовалась кинетика влияния ГСФ V и VI на каталитическую активность MAO-B в гомогенате головного мозга мышей. Установлено, что ГСФ V и VI конкурентно ингибируют MAO-B с $K_i=0.47 \cdot 10^{-6}$ М и $1.41 \cdot 10^{-6}$ М, соответственно. Напротив, ГСФ IV не является ингибитором MAO-B (таблица 2).

Методом хемилюминесценции по изменению интенсивности люминесценции люминола в гомогенате головного мозга мышей установлено, что одним из механизмов антиоксидантной активности ГСФ IV-VI является способность этих соединений перехватывать свободные радикалы. Как видно из рисунка 7, при действии каждого из соединений уменьшается светосумма, что свидетельствует о снижении содержания свободных радикалов в образцах. Очевидно, что антирадикальная активность ГСФ определяется в основном акцепторными свойствами фуллеренового сфероида.

Ранее в исследованиях [Файнгольд И. И. и др. LAP LAMBERT Academic Publishing. 2011. 112 с.] было показано, что ГСФ V и VI активируют MAO-A, что, согласно литературным данным, может приводить к снятию нервного возбуждения в результате снижения содержания адреналина в крови; показано, что исследуемые ГСФ транспортируются через фосфолипидный бислой мембраны; установлено, что они мало токсичны в отношении объекта исследований – мыши. Эти данные подтверждают перспективность исследования ГСФ в качестве ингибиторов нейродегенеративных процессов.

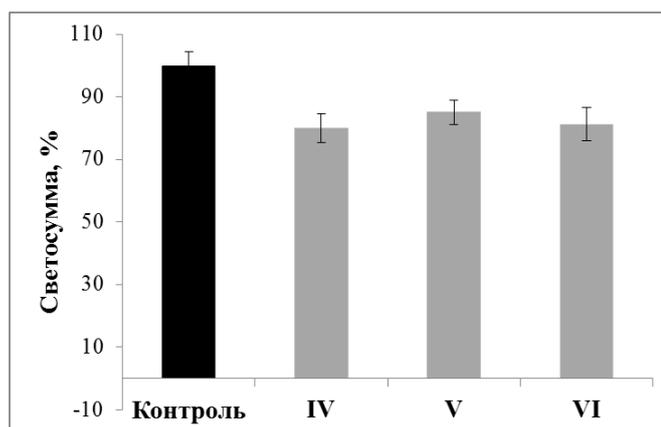


Рисунок 7. Изменение светосуммы люминесценции люминола при действии ГСФ IV-VI в концентрации 10^{-5} М в гомогенате головного мозга мышей; $p < 0.05$ относительно контроля. В качестве инициатора использовали трет-бутил-гидропероксид.

Обнаружено, что ГСФ V и VI также препятствуют образованию β -амилоидных фибрилл [Бобылев А. Г. и др. Биофизика. 2010. 55 (3). С. 394-399], что является важным критерием при отборе соединений для разработки на их основе лекарственных препаратов для лечения БА.

Влияние ГСФ на функциональное состояние ионотропных глутаматных AMPA и NMDA рецепторов

При исследовании влияния ГСФ на AMPA рецепторы ЦНС млекопитающих обнаружено, что ГСФ VI является их позитивным модулятором: в концентрациях 10^{-6} М и 10^{-5} М соединение усиливает каинат-вызванные токи рецепторов (рисунок 8) и, как следствие, может участвовать в процессах формирования памяти, что важно при лечении когнитивных расстройств. При отмывке ГСФ амплитуда токов восстанавливалась до уровня контрольных значений. Этот факт свидетельствует об обратимости действия ГСФ на AMPA рецепторы. ГСФ IV и V не влияют на функциональную активность AMPA рецепторов (рисунок 8).

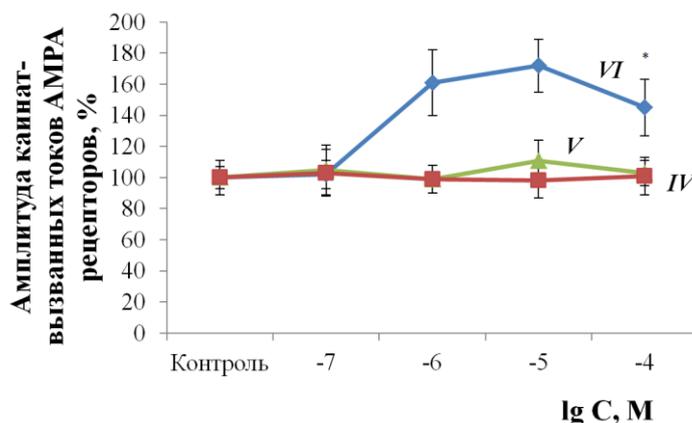


Рисунок 8. Влияние ГСФ IV-VI на амплитуду токов AMPA рецепторов нейронов Пуркинью мозжечка крыс ($p < 0.05$). * – $p > 0.05$ относительно контроля. Примечание: по оси абсцисс – логарифм концентрации соединений в молях.

Установлено, что ГСФ VI-лидер в диапазоне концентраций 10^{-9} - 10^{-6} М в условиях *in vitro* не влияет на связывание радиоактивных лигандов МК-801 и ифенпродила с ионотропными глутаматными NMDA рецепторами ЦНС млекопитающих, а значит, не проявляет нейротоксичных свойств.

Исследование ГСФ-лидера в поведенческих тестах

Исследование влияния ГСФ VI на долговременную память и поведенческие характеристики животных показало, что соединение в дозе 1.5 мг/кг улучшает память мышей и увеличивает вертикальную исследовательскую активность на 38% относительно контроля. Таким образом, ГСФ VI является перспективным с точки зрения создания на его основе лекарственного препарата для лечения БА и улучшения когнитивных процессов.

Направленное создание гибридной наноструктуры на основе аминокислотного производного фуллерена C₆₀ и фармакологически активного соединения для коррекции когнитивных процессов

В рамках настоящей работы для оптимизации терапевтических свойств нейротропного соединения VII (рисунок 1) была сконструирована гибридная наноструктура на основе аминокислотного производного фуллерена C₆₀ и этого соединения (рисунок 1, ГСФ VIII). Установлено, что исходное соединение VII ингибирует процесс ПОЛ в гомогенате головного мозга крыс, снижает каталитическую активность MAO-B и MAO-A (таблица 2) и оказывает положительное модулирующее действие на AMPA рецепторы нейронов Пуркинье мозжечка крыс (рисунок 9): в диапазоне концентраций 10^{-9} - 10^{-7} М оно увеличивает амплитуду каинат-вызванных токов (максимум потенциации – 50% при концентрации 10^{-8} М). При исследовании фармакологической активности соединения VII установлено, что оно улучшает долговременную память мышей, но при этом было выявлено побочное психостимулирующее действие, которое не позволяет рассматривать это соединение в качестве потенциального лекарственного препарата.

Так как ранее было показано, что аминокислотные производные фуллерена активируют MAO-A, что должно приводить к снижению возбуждения животных, то мы предположили, что сконструированная гибридная структура VIII может стать решением задачи по оптимизации фармакологического профиля исходного соединения VII. Действительно, установлено, что созданная гибридная структура (ГСФ VIII) сохраняет антиоксидантную активность, ингибирует MAO-B, является позитивным модулятором AMPA рецепторов, также улучшает долговременную память животных, но, в отличие от исходного соединения VII, не вызывает

побочного психомоторного возбуждения мышей, возможно, за счет активации MAO-A (таблица 2).

Таблица 2. Влияние ГСФ IV и VIII, а также биологически активного соединения VII на процесс ПОЛ и каталитическую активность MAO в гомогенате головного мозга крыс ($p < 0.05$).

Соединение ($2 \cdot 10^{-5}$ М)	Содержание МДА, мкМ/мг белка	Активность MAO-B, мМ NH ₃ /мг белка	Активность MAO-A, мМ NH ₃ /мг белка
Контроль	1.4±0.1	2.5 ± 0.1	2.4±0.1
IV	1.2±0.0	3.0 ± 0.1	2.4±0.1
VII	1.3±0.1	1.8 ± 0.1	2.1±0.1
VIII	0.9±0.0	1.8 ± 0.1	4.0±0.1

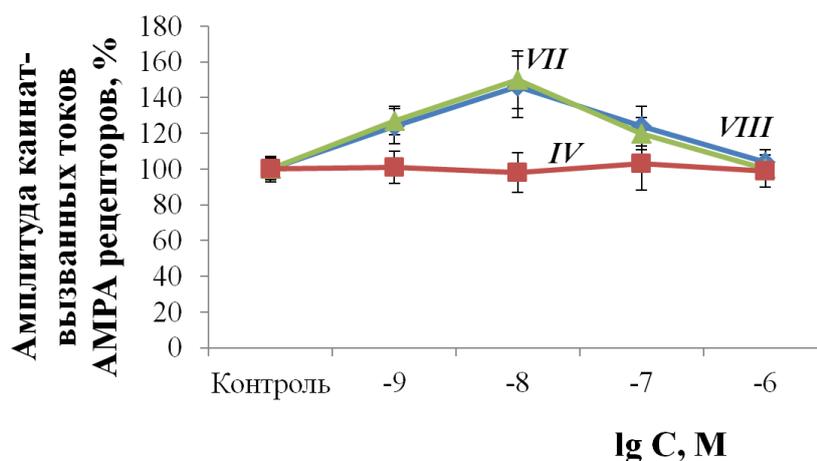


Рис. 9. Действие ГСФ IV и VIII, а также биологически активного соединения VII на амплитуду токов AMPA рецепторов нейронов Пуркинью мозжечка крыс ($p < 0.05$). Примечание: по оси абсцисс – логарифм концентрации соединений в молях.

Таким образом, показано, что одним из эффективных путей по улучшению фармакологического профиля биологически активного соединения является конструирование гибридной структуры на основе производного фуллерена и этого соединения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованы физико-химические механизмы влияния двух групп водорастворимых производных фуллерена C₆₀ (полизамещенных производных фуллерена C₆₀ и гибридных структур на основе аминокислотного производного фуллерена C₆₀ и биологически активных аддендов) на терапевтические мишени болезни Альцгеймера. На основании полученных результатов были выбраны соединения-лидеры (ППФ I, II и ГСФ VI), которые обладают антиоксидантной активностью, выступают ингибиторами каталитической активности моноаминоксидазы В, а также предотвращают образование β-амилоидных фибрилл *in vitro*. Показано, что эти соединения являются позитивными модуляторами ионотропных глутаматных AMPA рецепторов ЦНС млекопитающих, что свидетельствует об их потенциальной когнитивно-стимулирующей активности. Когнитивно-стимулирующую активность ВРПФ подтвердили тесты на животных. Установлено, что выбранные соединения не проявляют нейротоксичности, так как не оказывают влияния на ионотропные глутаматные NMDA рецепторы ЦНС млекопитающих. Таким образом, результаты данной работы позволяют рекомендовать отобранные ВРПФ–лидеры для углубленных исследований и создания на их основе потенциальных препаратов для лечения нейродегенеративных патологий (болезни Альцгеймера и других заболеваний, сопровождающихся нарушениями когнитивных функций). Предложен алгоритм оптимизации фармакологических свойств терапевтически перспективных веществ за счет создания гибридных структур на основе этих веществ и водорастворимых производных фуллерена C₆₀.

ВЫВОДЫ

- 1) С помощью метода флуоресцентных зондов показано, что ППФ проникают в фосфолипидные мембраны и локализуются как в области полярных головок, так и в области жирнокислотных остатков фосфолипидов модельных мембран.
- 2) Установлено, что ППФ I, ГСФ V и VI конкурентно, а ППФ II неконкурентно ингибируют ферментативную активность MAO-B. Определены константы ингибирования: $K_i(I)=0.34 \cdot 10^{-6}$ М, $K_i(II)=1.12 \cdot 10^{-6}$ М, $K_i(V)=0.47 \cdot 10^{-6}$ М, $K_i(VI)=1.41 \cdot 10^{-6}$ М.
- 3) Показано, что ППФ и ГСФ обладают антиоксидантной и антирадикальной активностью. При этом антирадикальная активность в основном определяется акцепторными свойствами сфероида фуллерена.
- 4) Установлено, что ППФ I и II, а также ГСФ VI являются позитивными модуляторами ионотропных глутаматных AMPA рецепторов ЦНС млекопитающих, что свидетельствует о потенциальной когнитивно-стимулирующей активности этих производных. Показано, что эти

соединения не проявляют нейротоксичных свойств, так как не активируют ионотропные глутаматные NMDA рецепторы ЦНС млекопитающих.

- 5) С помощью поведенческих тестов установлено, что отобранные из обеих групп ВРПФ-лидеры улучшают память мышей, повышают исследовательскую активность и не оказывают побочных психостимулирующих эффектов, что свидетельствует о перспективности создания на их основе лекарственных препаратов для лечения болезни Альцгеймера.
- 6) Предложен алгоритм оптимизации фармакологических свойств терапевтически перспективных веществ за счет создания гибридных структур на основе этих веществ и водорастворимых производных фуллерена C₆₀.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Kotelnikova R. A., Smolina A. V., Grigoryev V. V., Faingold I. I., Mischenko D. V., Rybkin A. Yu., Poletayeva D. A., Vankin G. I., Zamoyskiy V. L., Voronov I. I., Troshin P. A., Kotelnikov A. I., Bachurin S. O. Influence of water-soluble derivatives of [60]fullerene on therapeutically important targets related to neurodegenerative diseases // Med. Chem. Comm. 2014. 5. P. 1664-1668.
2. Котельникова Р. А., Григорьев В. В., Смолина А. В., Файнгольд И. И., Мищенко Д. В., Ванькин Г. И., Замойский В. Л., Полетаева Д. А., Маркова Н. А., Романова В. С., Котельников А. И., Алиев Г., Бачурин С. О. Создание гибридной наноструктуры на основе фуллерена C₆₀ и биологически активного вещества как один из путей моделирования физиологических свойств соединений // Изв. Акад. наук. Сер. Химическая. 2014. 10. С. 2375-2382.
3. Полетаева Д.А., Котельникова Р.А., Мищенко Д.В., Рыбкин А.Ю., Смолина А.В., Файнгольд И.И., Трошин П.А., Корнев А.Б., Хакина Е.А., Котельников А.И. Оценка мембранотропности водорастворимых полизамещенных производных фуллеренов люминесцентными методами // Российские нанотехнологии. 2012, Т. 7, № 3-4. С. 64-68.
4. Котельникова Р. А., Файнгольд И. И., Полетаева Д. А., Мищенко Д. В., Романова В. С., Штолько В. Н., Богданов Г. Н., Рыбкин А. Ю., Фрог Е. С., Смолина А. В., Куш А. А., Федорова Н. Е., Котельников А. И. Антиоксидантные свойства водорастворимых аминокислотных производных фуллеренов и их роль в ингибировании герпесвирусной инфекции // Известия Академии наук. Сер. Химическая. 2011. 6. С. 1146-1150.
5. Котельникова Р. А., Полетаева Д. А., Смолина А. В., Файнгольд И. И., Мищенко Д. В., Григорьев В. В., Болкунов А. В., Ванькин Г. И., Замойский В. Л., Романова В. С., Бачурин С. О. Нейропротекторная активность фуллереновых аминокислотных производных с когнитивно-стимулирующим веществом в качестве адденда. Органические и гибридные наноматериалы:

получение, исследование, применение: монография / под ред. В.Ф. Разумова и М.В. Ключева. Иваново: Иван.гос. ун-т, 2011. С. 238-251.

6. Котельникова Р. А., Смолина А. В., Григорьев В. В., Файнгольд И. И., Ванькин Г. И., Трошин П. А., Воронов И. И., Богданов Г. Н., Штолько В. Н., Котельников А. И., Бачурин С. О. «Влияние водорастворимых производных фуллерена C_{60} на терапевтические мишени нейродегенеративных заболеваний». Сборник трудов VI Троицкой конференции «Медицинская физика и инновации в медицине». Троицк, Москва. 2014. С. 141-142.
7. Смолина А. В., Полетаева Д. А., Файнгольд И. И., Рыбкин А. Ю. «Молекулярные механизмы нейропротекторного действия водорастворимых полизамещенных производных фуллерена C_{60} ». Сборник тезисов докладов фестиваля «Молодая наука в классическом университете». Иваново. 2013. С. 34.
8. Смолина А. В., Полетаева Д. А., Файнгольд И. И., Рыбкин А. Ю., Болкунов А. В., Ванькин Г. И., Замойский В. Л., Трошин П. А., Григорьев В. В., Котельникова Р. А., Котельников А. И. «Молекулярные механизмы нейропротекторного действия водорастворимых полизамещенных производных фуллерена C_{60} ». Сборник тезисов докладов II Всероссийской молодежной конференции «Успехи химической физики». Черногоровка. 2013. С. 184.
9. Смолина А. В., Полетаева Д. А., Файнгольд И. И., Рыбкин А. Ю., Болкунов А. В., Ванькин Г. И., Замойский В. Л., Трошин П. А., Григорьев В. В., Котельникова Р. А., Котельников А. И. «Нейропротекторная активность водорастворимых полизамещенных производных фуллерена C_{60} ». Сборник тезисов Первой Российской конференции по медицинской химии с международным участием «MedChem Russia-2013». Москва. 2013. С. 291.
10. Котельников А. И., Котельникова Р. А., Коновалова Н. П., Богданов Г. Н., Романова В. С., Файнгольд И. И., Мищенко Д. В., Полетаева Д. А., Смолина А. В., Рыбкин А. Ю., Горячев Н. С., Кареев И. Е., Бубнов В. П., Ягубский Э. Б., Корнев А. Б., Хакина Е. А., Трошин П. А. «Гибридные наноструктуры на основе фуллеренов для применения в терапии и диагностике социально значимых заболеваний». Сборник V Троицкая конференция «Медицинская физика и инновации в медицине (ТКМФ-5)». Троицк, Москва. 2012. 2. С. 16-18.
11. Смолина А. В., Григорьев В. В., Замойский В. Л., Котельникова Р. А., Полетаева Д. А., Маркова Н. А., Романова В. С. «Создание гибридной наноструктуры на основе фуллерена C_{60} и биологически активного вещества как один из путей моделирования физиологических свойств соединений». Сборник тезисов «Молодая наука в классическом университете: тезисы докладов научных конференций фестиваля студентов, аспирантов и молодых ученых. Актуальные проблемы современного естествознания». Иван. гос. ун-т, Иваново. 2012. 1. С. 109.
12. Смолина А. В., Замойский В. Л., Котельникова Р. А., Полетаева Д. А., Маркова Н. А., Романова В. С. Создание гибридной наноструктуры на основе фуллерена C_{60} и биологически активного вещества как один из путей оптимизации физиологических свойств терапевтически перспективных соединений // в Сб. статей Третьей международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и

медицине» / под ред. А.П. Кудинова, Б.В. Крылова. СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2012. 1. С. 220-222.

13. Смолина А. В., Григорьев В. В., Болкунов А. В., Ванькин Г. И., Замойский В. Л., Котельникова Р. А., Полетаева Д. А., Мищенко Д. В., Файнгольд И. И., Маркова Н. А., Романова В. С. «Оптимизация физиологических свойств терапевтически перспективных веществ путем присоединения к ним наноструктуры фуллерена C_{60} ». Сборник материалов Восьмого международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии». Судак, Крым, Украина. 2012. С. 380-381.
14. Полетаева Д. А., Смолина А. В., Корнев А. Б., Хакина Е. А., Трошин А. П., Котельникова Р. А., Котельников А. И. «Метод триплетных зондов в изучении мембранотропных свойств полизамещенных водорастворимых производных фуллеренов». Сборник тезисов докладов Всероссийской конференции «Фотоника органических и гибридных наноструктур». Черноголовка. 2011. С.119.
15. Полетаева Д. А., Корнев А. Б., Файнгольд И. И., Хакина Е. А., Смолина А. В., Рыбкин А. Ю., Котельникова Р. А., Богданов Г. Н., Трошин А. П., Котельников А. И. «Мембранотропные свойства полизамещенных водорастворимых производных фуллеренов». Сборник тезисов докладов Всероссийской молодежной конференции «Успехи химической физики». Черноголовка, 2011. С. 47.
16. Смолина А. В., Корнев А. Б., Полетаева Д. А., Хакина Е. А., Файнгольд И. И., Рыбкин А. Ю., Мищенко Д. В., Котельникова Р. А., Богданов Г. Н., Трошин П. А., Котельников А. И. «Влияние водорастворимых полизамещенных производных фуллерена C_{60} на каталитическую активность мембраносвязанных ферментов моноаминоксидазы А и моноаминоксидазы В». Сборник тезисов докладов Всероссийской молодежной конференции «Успехи химической физики». Черноголовка. 2011. С. 211.
17. Мищенко Д. В., Рыбкин А. Ю., Корнев А. Б., Файнгольд И. И., Хакина Е. А., Полетаева Д. А., Смолина А. В., Котельникова Р. А., Трошин П. А., Богданов Г. Н., Романова В. С. «Ингибирование пероксидного окисления липидов водорастворимыми производными фуллерена C_{60} ». Сборник тезисов докладов Всероссийской молодежной конференции «Успехи химической физики». Черноголовка. 2011. С. 207.
18. Рыбкин А. Ю., Мищенко Д. В., Хакина Е. А., Корнев А. Б., Смолина А. В., Трошин П. А., Богданов Г. Н., Котельников А. И., Котельникова Р. А. «Оценка антиоксидантных свойств водорастворимых производных фуллерена C_{60} методом хемилюминесценции». Сборник тезисов докладов Всероссийской молодежной конференции «Успехи химической физики». Черноголовка. 2011. С. 209.
19. Смолина А. В., Корнев А. Б., Полетаева Д. А., Хакина Е. А., Файнгольд И. И., Котельникова Р. А., Богданов Г. Н., Трошин П. А., Котельников А. И. «Водорастворимые полизамещенные производные фуллерена C_{60} и мембраносвязанные ферменты». Тезисы в научном издании «Химическая

физика вчера, сегодня, завтра» под общей редакцией академика А. А. Берлина. Юбилейная научная конференция. Москва. 2011. С. 75.

20. Котельников А. И., Котельникова Р. А., Богданов Г. Н., Мищенко Д. В., Горячев Н. С., Баринов А. В., Рыбкин А. Ю., Смолина А. В., Полетаева Д. А., Романова В. С. «Производные фуллеренов как биологически активные соединения и средства диагностики». Сборник конференции «Нанотехнологии в онкологии 2010». Москва. 2010. С. 48-49.
21. Смолина А. В., Мищенко Д. В., Жохова Д. А., Котельникова Р. А., Романова В. С., Богданов Г. Н., Котельников А. И. «Мембранотропные свойства гибридных структур на основе фуллерена C_{60} ». Сборник тезисов «Органические и гибридные наноматериалы». Иваново. 2009. С. 183-184.