

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ ХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ РАН**

На правах рукописи

СМОЛИНА АНАСТАСИЯ ВАСИЛЬЕВНА

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

03.01.02 – биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

д.б.н. Григорьев Владимир Викторович,
к.ф.-м.н. Котельникова Раиса Алексеевна

Черноголовка – 2015

Содержание

	Содержание.....	2
	Список сокращений.....	4
	Введение.....	6
Глава 1.	Литературный обзор.....	11
1.1.	Производные фуллеренов и их биологическая активность.....	11
1.2.	Токсичность производных фуллеренов и их выведение из организма.....	14
1.3.	Болезнь Альцгеймера как важная медико-социальная проблема современности.....	16
1.4.	Терапевтические мишени болезни Альцгеймера.....	21
1.4.1.	β-амилоидные белки.....	21
1.4.2.	Ионотропные глутаматные AMPA и NMDA рецепторы.....	22
1.4.3.	Окислительный стресс	30
1.4.4.	Моноаминоксидаза В.....	33
1.5.	Нейропротекторное действие фуллеренов и их производных.....	36
Глава 2.	Экспериментальная часть.....	41
2.1.	Материалы.....	41
2.2.	Приборы и аппаратура.....	44
2.3.	Методы исследования.....	45
2.3.1.	Приготовление суспензии фосфатидилхолиновых липосом..	45
2.3.2.	Исследование взаимодействия ППФ с фосфолипидной мембраной методом флуоресцентных зондов.....	45
2.3.3.	Определение интенсивности пероксидного окисления липидов	46
2.3.4.	Определение антирадикальной активности ВРПФ методом хемилюминесценции.....	48
2.3.5.	Исследование влияния ВРПФ на каталитическую активность моноаминоксидазы (формы А и В).....	49
2.3.6.	Определение концентрации белка по методу Лоури.....	51
2.3.7.	Электрофизиологический метод patch-clamp.....	52
2.3.8.	Изучение радиолигандного связывания с ионотропными глутаматными NMDA рецепторами.....	53
2.3.9.	Изучение влияния ВРПФ на поведение лабораторных животных в тесте «Открытое поле».....	55
2.3.10.	Изучение влияния ВРПФ на память животных в тесте «Узнавание новой локализации известного объекта».....	56
2.3.11.	Статистическая обработка результатов.....	58
Глава 3.	Результаты и обсуждение.....	59
3.1.	Исследование влияния водорастворимых полизамещенных производных фуллерена C ₆₀ (ППФ) на терапевтические	

	мишени болезни Альцгеймера и поведение животных.....	59
3.1.1.	Исследование взаимодействия ППФ с фосфолипидной мембраной методом флуоресцентных зондов.....	61
3.1.2.	Влияние ППФ на активность MAO-B и свободнорадикальное окисление липидов.....	68
3.1.3.	Влияние ППФ на функциональное состояние ионотропных глутаматных AMPA и NMDA рецепторов.....	74
3.1.4.	Действие ППФ на поведение животных.....	79
3.2.	Исследование влияния гибридных структур на основе аминокислотных производных фуллерена C ₆₀ (ГСФ) на терапевтические мишени болезни Альцгеймера и поведение животных.....	84
3.2.1.	Влияние ГСФ на активность MAO-B и свободнорадикальное окисление липидов.....	84
3.2.2.	Влияние ГСФ на функциональное состояние ионотропных глутаматных AMPA и NMDA рецепторов.....	89
3.2.3.	Действие ГСФ на поведение животных.....	92
3.2.4.	Направленное создание гибридной наноструктуры на основе аминокислотного производного фуллерена C ₆₀ и фармакологически активного соединения для коррекции когнитивных процессов.....	95
	Заключение.....	104
	Выводы.....	105
	Литература.....	107

Список сокращений

- АТФ – аденозинтрифосфат;
- АФК – активные формы кислорода;
- АХЭ – ацетилхолинэстераза;
- БА – болезнь Альцгеймера;
- БАВ – биологически активное вещество;
- БП – болезнь Паркинсона;
- ВИЧ – вирус иммунодефицита человека;
- ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения;
- ВРПФ – водорастворимые производные фуллерена C₆₀;
- ГСФ – гибридные структуры на основе фуллерена C₆₀;
- ДМА – деметилированный арзоксифен;
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
- ИНЭОС РАН – Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова РАН;
- ИПХФ РАН – Институт проблем химической физики РАН;
- ИФАВ РАН – Институт физиологически активных веществ РАН;
- ЛД₅₀ – средняя летальная доза;
- МАО-А и МАО-В – моноаминоксидаза А и В;
- МДА – малоновый диальдегид;
- НЗ – нейродегенеративное заболевание;
- ПОЛ – пероксидное окисление липидов;
- ППФ – полизамещенные производные фуллеренов;
- СОД – супероксиддисмутаза;
- ТБГП – третбутилгидропероксид;
- ТБК – 2-тиобарбитуровая кислота;
- ТХУ – трихлоруксусная кислота;

ФНО-альфа – фактор некроза опухоли-альфа;

ХЛ – хемилюминесценция;

ЦНС – центральная нервная система;

APP – предшественник β -амилоидного протеина;

AMPA – альфа-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота;

LTD – долговременное торможение;

LTP – долговременная потенция;

MPP⁺ – 1-метил-4-фенилпирдиний;

NMDA – N-метил-D-аспартат;

6-OHDA – 6-гидроксидопамин;

PPO – дифенилоксазол;

POPOP – дифенилоксазоилбензол.

Введение

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 [1]. В России число больных с деменцией альцгеймеровского типа составляет более 1.85 млн. человек [2]. 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 для лечения БА 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 работы: комплексное исследование физико-химических механизмов действия водорастворимых производных фуллерена C_{60} на терапевтические мишени болезни Альцгеймера для создания эффективных модуляторов когнитивных функций.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследование способности полизамещенных производных фуллерена C_{60} проникать в гидрофильные и гидрофобные сайты фосфолипидных мембран.
2. Определение типа ингибирования моноаминоксидазы В водорастворимыми производными фуллерена C_{60} .

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.

Теоритическая и практическая значимость 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 C₆₀ и присоединенных к ним физиологически активных соединений.

Показано, что водорастворимые полизамещенные производные фуллерена C₆₀ 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 C₆₀ и гибридные структуры на основе аминокислотного производного фуллерена C₆₀ 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 C₆₀ и гибридные структуры на основе аминокислотного производного фуллерена C₆₀ не проявляют нейротоксичности, так как не активируют ионотропные глутаматные NMDA рецепторы ЦНС млекопитающих.

Водорастворимые полизамещенные производные фуллерена C₆₀ и гибридные структуры на основе аминокислотного производного фуллерена C₆₀ 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 C₆₀ и фармакологически активных соединений.

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.

Глава 1. Литературный обзор

1.1. Производные фуллеренов и их биологическая активность

Благодаря многочисленным исследованиям свойств фуллерена и его производных за последние десятилетия был обнаружен широкий спектр биологической активности этих соединений. Результаты публикаций позволяют предполагать, что класс производных фуллерена является перспективным с точки зрения их применения в биологии и медицине.

Известно, что производные фуллеренов могут обладать мембранотропными свойствами [3-8], которые являются важным фактором при создании на их основе лекарственных препаратов, так как мембранотропность определяет способность соединений проникать через клеточные мембраны и достигать внутриклеточных мишеней, что определяет терапевтическую активность соединения, а также параметры его фармакокинетики. Интересным фактом является разработка группы ученых [9], впервые синтезировавших производное фуллерена с четырьмя положительными зарядами, которое способно доставлять генетический материал при лечении генетических болезней. Оно связывается с двухцепочечной плазмидой ДНК и переносит ее в клетки с эффективностью, сопоставимой с коммерческими реагентами. В 2002 году И. М. Андреев и соавторы [10] показали, что производные фуллерена C_{60} транспортируются через биологические мембраны как липофильные ионы, тем самым вызывая деполяризацию мембраны. Р. А. Котельниковой с коллегами [3] показано *in vitro*, что аминокислотные производные фуллерена проникают через липидный бислой во внутренний объем липосом, не нарушая целостность мембраны. Результаты работы [4] свидетельствуют о легком проникновении производных фуллерена через биологические мембраны клеток различного

типа. Авторами работы [11] было создано мультифункциональное водорастворимое производное фуллерена C_{60} , в структуре которого находится ковалентно присоединенное антитело ZME-018. Это антитело специально ориентировано на gp240 антиген, который присутствует примерно в 80% клеток меланомы человека и известен как целенаправленный агент для доставки терапевтических соединений в раковые клетки такого типа. Таким образом, производные фуллерена могут выступать носителями биологически активных группировок и веществ и доставлять их к терапевтическим мишеням для лечения различных патологий.

Большим достижением в химии фуллеренов является то, что в последние годы были разработаны подходы, позволяющие синтезировать производные фуллерена с приемлемыми для медицинского применения показателями растворимости в воде: 10-200 мг/мл и более [12-14].

Широко известна противовирусная активность производных фуллеренов [15-18]. Среди первых работ, посвященных этому вопросу, было исследование [15], в котором показано, что производные фуллеренов способны помещаться внутри гидрофобной полости ВИЧ-протеазы и тем самым затруднять доступ субстратов к каталитическому сайту фермента. Р. А. Котельниковой и соавторами [19] показана способность аминокислотных производных фуллеренов к ингибированию герпесвирусной инфекции.

Существуют работы, в которых была установлена антибактериальная и противогрибковая активность производных фуллерена. Д. Пантаротто и соавторами [20] показана специфическая активность катионных производных фуллеренов, содержащих пептиды, против грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus*. В работах [21-23] продемонстрирована антимикробная активность производных фуллерена против *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium avium*, *Candida albicans*. Установлено, что

фуллеропирролидины, несущие биологически активные арилпиперазины, обладают умеренной антибактериальной и противогрибковой активностью *in vitro* [24]. В работе А. Б. Корнева и соавторов [25] показана противовирусная активность аминокислотных производных и антибактериальная активность катионных аминопроизводных фуллерена. В результате последних исследований [26] обнаружена способность фуллеренов связываться с механочувствительным каналом высокой проводимости прокариот и тем самым блокировать проведение тока, что является перспективным для лечения бактериальных инфекций. Авторы работы [27] обнаружили, что порфирин-фуллереновые диады способны фотодинамически инактивировать рост культуры *Staphylococcus aureus*.

Фуллерены, обладающие уникальной электронной структурой, обнаруживают ярко выраженные донорно-акцепторные свойства. При возбуждении квантом света они способны выступать в качестве доноров электронов [28], в то время как в своем основном состоянии они проявляют электроакцепторные свойства [29]. Исходя из способности донировать электроны, фуллерены и их производные могут найти свое применение в фотодинамической терапии злокачественных опухолей [30-33]. Результаты последних работ показали, что комплексы фуллерена с красителем эффективно поглощают в видимой области спектра и при фотовозбуждении генерируют активные радикалы, что приводит к разрушению клеток раковой опухоли. Примерами таких комплексов являются комплексы водорастворимых производных фуллерена C₆₀ с Фотосенсом [34] и с противоопухолевым антибиотиком Рубоксилем [35]. Также известны данные о противоопухолевой активности некоторых производных фуллеренов без облучения [23, 36], что свидетельствует о потенциальной возможности применения их в химиотерапии. В работе [37] показано, что наночастицы [Gd@C82(OH)22]_n ингибируют пролиферацию опухолевых клеток при

низкой токсичности. Наоборот, способность фуллеренов и их производных выступать акцепторами электронов придает им антирадикальные и антиоксидантные свойства [7, 19, 29, 38-44]. В работе [45] утверждается, что карбоксифуллерены индуцируют накопление внутриклеточной супероксиддисмутазы (СОД), что возможно играет важную роль в их разнообразной антиоксидантной активности.

Многие исследователи уделяют особое внимание нейропротекторной активности фуллерена и ряда его производных. Нейропротекторные свойства этих соединений проявляются в способности перехватывать активные радикалы кислорода, что важно для предотвращения свободнорадикальных процессов окисления биомакромолекул и развития нейродегенерации [41, 46-48], а также в способностях к ингибированию каталитической активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) [49], ингибированию моноаминоксидазы В (МАО-В) [50], ингибированию процесса агрегации β -амилоидных белков и предупреждению гибели нейронов [51-54], ингибированию процесса эксайтотоксичности и предотвращению нарушения долговременной памяти [48, 55, 56], защите дофаминергических нейронов от дегенерации [57, 58] и улучшению когнитивных процессов [52], что чрезвычайно важно для терапии нейродегенеративных расстройств, таких как БА и болезнь Паркинсона (БП).

1.2. Токсичность производных фуллеренов и их выведение из организма

Когда идет речь о медицинском применении биологически активных соединений, вопросы об их токсичности и выведении из организма стоят довольно остро. Результаты исследований токсичности производных фуллеренов неоднозначны. Существуют данные о том, что отдельные

представители этого класса являются низко токсичными, что приемлемо для применения в медицине [50, 59, 60]. В ряде работ показано, что некоторые производные фуллерена токсичны [61, 62]. Есть мнение, что наблюдаемая «токсичность» может объясняться наличием примесей в образцах [63, 64]. Исследования токсичности производных фуллерена C_{60} были начаты в 90-е годы. В 1995 году С. Ямаго и соавторы сообщили о том, что после одной перитонеальной инъекции водорастворимого метанофуллерена в дозе 500 мг/кг мыши прожили одну неделю [65]. В работе, посвященной исследованию потенциального терапевтического применения гидроксигированного фуллерена $C_{60}(OH)_{30}$, проводилась оценка острой толерантности *in vivo* у восьминедельных самок крыс линии Спрег-Дуули при внутривенном введении данного соединения в дозе 10 мг/кг. Было показано, что через 48 часов после введения гистопатологических изменений не наблюдалось [66]. Кроме того, исследования показали, что производные C_{60} , являющиеся миметиками СОД, предотвращают развитие возрастных когнитивных нарушений и существенно увеличивают продолжительность жизни мышей [67]; также было показано, что фуллерен C_{60} , растворенный в оливковом масле, защищает печень грызунов от повреждения свободными радикалами в дозозависимой манере, а также увеличивает продолжительность жизни крыс, причем хроническая токсичность данного препарата не была выявлена [68].

Примером выведения производного фуллерена из организма экспериментальных животных является исследование [69], в котором показано, что примерно 56% от введенной дозы $^{125}I-C_{60}(OH)_x$ выделилось через 72 часа: 92% с уриной и 8% с фекалиями, также продемонстрировано накопление в органах: через 6 часов после введения наибольшая концентрация зафиксирована в печени, почках, селезенке и костях, через 24 часа - в костях.

1.3. Болезнь Альцгеймера как важная медико-социальная проблема современности

Когнитивные процессы – это познавательные функции, такие как память, мышление, восприятие, внимание, воображение и речь. Хроническое, прогрессирующее нарушение когнитивных процессов, возникающее в результате приобретенного органического поражения мозга, называется *деменцией*. Причинами деменции могут быть различные заболевания, в том числе сосудистые заболевания головного мозга и нейродегенеративные патологии, а также травмы, приводящие к повреждению мозга [70]. Наиболее распространенной формой деменции в современном обществе (60–70% случаев) является болезнь Альцгеймера (БА). БА или сенильная деменция альцгеймеровского типа – неизлечимое НЗ, приводящее к полному расстройству психической деятельности. БА была впервые описана немецким психиатром Алоисом Альцгеймером в 1906 году. Причины и условия возникновения БА еще до конца не изучены. Известно, что при данном заболевании происходит гибель нейронов и нарушение синаптических связей в коре головного мозга и определённых субкортикальных областях, в результате чего поражённые участки атрофируются, в том числе – височные и теменные доли, участки фронтальной коры и поясной извилины [71]. Неуклонное прогрессирование болезни нарушает психику больного, происходит изменение личности: когнитивные функции снижаются, в том числе память, также имеют место различные поведенческие расстройства (галлюцинации, повышенное возбуждение и другие), происходит потеря навыков самообслуживания больного. В среднем, болезнь может длиться 7–10 лет и завершается гибелью.

При нейродегенеративных заболеваниях (БА, БП, болезнь Хантингтона) метаболизм глюкозы замедляется, но митохондрии, несмотря на их дисфункцию, все еще способны генерировать некоторое количество АТФ для поддержания ионного гомеостаза в ограниченной степени. Этот процесс приводит к накапливающемуся медленному повреждению мозга, развитие которого занимает гораздо больше времени. Таким образом, многие нейродегенеративные болезни возникают в более позднем возрасте, и их наступление соответствует длительному воздействию эксайтотоксичности, окислительному стрессу и нейровоспалению. Важно отметить, что в результате взаимодействия этих процессов нарушается нейрогенез (рождение и созревание функционально новых нейронов гиппокампа). У пациентов с НЗ происходит атрофия головного мозга [72].

Признаки БА обычно проявляются в возрасте 60 лет, в раннем возрасте болезнь развивается редко. Наследственные формы заболевания, начинающиеся в возрасте 40–55 лет, характеризуются аутосомно-доминантным типом наследования и составляют лишь до 10 % всех случаев патологии [73]. Статистические исследования прогнозируют, что в ближайшие десять лет число лиц пенсионного возраста превысит количество детей и подростков. Увеличение численности больных создаст большие общественные и экономические проблемы, так как медицинские затраты на содержание пациентов с деменцией (без учета стоимости лекарственной терапии) очень велики. По данным ВОЗ, к 2030 году число людей, страдающих БА, достигнет 65.7 млн. Таким образом, сегодня БА является одной из важнейших медико-социальных проблем.

Авторами работы [74] выделены семь факторов риска: отсутствие физической активности, низкий уровень образования, курение, сахарный диабет, гипертония среднего возраста, ожирение в зрелом возрасте и депрессия. Вместе перечисленные факторы риска способствовали примерно половине случаев возникновения БА во всем мире. Если бы

распространенность всех семи факторов риска была на 10% ниже текущих уровней, то, по оценкам авторов, количество случаев БА снизилось бы на 1.1 млн. К сожалению, все выше перечисленные факторы риска характерны для населения России.

Выделяют три основных гипотезы этиологии болезни Альцгеймера: самая ранняя – «холинергическая гипотеза», также «амилоидная гипотеза» и «тау-гипотеза».

Первой из основных гипотез развития БА была выдвинута «холинергическая гипотеза», согласно которой главной причиной заболевания является понижение синтеза нейротрансмиттера ацетилхолина. Начало заболевания может быть вызвано зависимой от возраста нейрональной дисфункцией рецепторов инсулина, возникает дефицит ацетилхолина и доступных энергетических ресурсов, мембраны нейронов становятся нестабильными из-за глутамат-опосредованного окислительного стресса [71, 75]. В соответствии с этой гипотезой развитие БА возможно связано с динамическими изменениями процессов жизнедеятельности клеток мозга, которые не зависят от отложения пептида β -амилоида и генетических факторов. При БА погибают от 30 до 95 % холинергических нейронов, особенно в коре и гиппокампе. Практика показала неточность гипотезы: медицинские препараты, способные снизить дефицит ацетилхолина, имеют недостаточную эффективность. В клинике применяются селективные ингибиторы АХЭ: ривастигмин (экселон) и донепезил (арисепт, алзепил). Они улучшают показатели когнитивной функции, общей физической активности, уменьшают поведенческие нарушения и галлюцинации, но вместе с тем оказывают токсические и депрессивные эффекты [76, 77]. Применение ингибиторов АХЭ не предотвращает наступление и прогрессирование БА.

«Амилоидная гипотеза» была предложена в 1991 году [78, 79]. Согласно ей первопричиной заболевания является отложение β -амилоида. Глутамат-опосредованные отклонения в метаболизме глицерофосфолипидов могут вызвать воспаление и отложение β -амилоида, которое может привести к нарушению функции глутаматергических рецепторов, в результате чего развивается нейродегенеративный процесс. Если эта гипотеза верна, то глутамат-опосредованное нейровоспаление, окислительный стресс, нарушения в метаболизме глицерофосфолипидов и отложение β -амилоида начинаются задолго до симптоматического начала БА [80, 81].

Известно, что трансмембранный белок-предшественник β -амилоида (APP) закодирован в двадцать первой хромосоме, отчего у лиц, страдающих синдромом Дауна, в возрасте 40 лет и старше обнаруживают изменения в мозге, характерные для БА [82, 83]. Этот факт подтверждает амилоидную гипотезу. Также существует работа [84], в которой установлено, что основной генетический фактор риска БА – апополипротеин E4 - приводит к избыточному накоплению амилоида в тканях мозга раньше, чем проявляются симптомы заболевания. Но попытка создать экспериментальную вакцину, которая разрушает амилоидные бляшки в мозге людей, не удалась: деменция вакцинированных больных продолжала прогрессировать [85].

Согласно «тау-гипотезе», главной причиной заболевания является отклонение в структуре τ -белка [79]. В норме τ -белок стабилизирует микротрубочки цитоскелета нейрона. В работе [86] установлено, что при БА τ -белок подвергается гиперфосфорилированию, в результате чего нити белка соединяются друг с другом, образуя нейрофибриллярные клубки внутри клеток, и нарушают транспортную систему микротрубочек нейрона.

Значительная роль β -амилоида и τ -белка в патогенезе БА подтверждается их содержанием в большом количестве в спинномозговой жидкости больных [87]. Таким образом, наличие нерастворимых отложений

β -амилоида и нейрофибриллярных клубков внутри и снаружи нейронов ведет к их гибели.

Группой ученых в США [88] установлено, что при БА происходит целый каскад событий: β -амилоид стимулирует α -7-никотиновые рецепторы, которые индуцируют выход из астроцитов дополнительного количества глутамата в синапсы, что является причиной большого количества возбуждающих сигналов. В результате избыточного возбуждения активируются extrasинаптические NMDA рецепторы, подавляющие собственно синаптическую активность, что приводит к нарушению когнитивных функций человека.

Важно отметить, что когнитивные нарушения при БА вызваны гибелью нейронов в холинергических и глутаматергических нейронных системах, а также нерегулярным функционированием выживших нейронов [89].

Несмотря на существование различных гипотез развития этой болезни и попытки разработки лекарственных препаратов с различными механизмами действия, препараты, используемые в клинике, не приводят к излечению заболевания, а лишь на некоторое время замедляют прогрессирование БА. Если принять во внимание сведения о широком распространении болезни Альцгеймера среди растущего количества пожилых людей и больших экономических затратах при прогрессировании заболевания, становится очевидной чрезвычайная необходимость поиска новых классов терапевтически перспективных соединений, которые могли бы служить основой для создания эффективных лекарственных препаратов для лечения БА. Одним из важнейших этапов решения этой проблемы является изучение молекулярных механизмов нейропротекторного действия биологически активных соединений на терапевтические мишени заболевания.

1.4. Терапевтические мишени болезни Альцгеймера

1.4.1. β -амилоидные белки

В настоящее время известно, что важную роль в развитии спорадической и наследственной форм БА играет пептид β -амилоид ($A\beta$, пептид, содержащий от 40 до 42 аминокислот) [90]. В ткани головного мозга пациентов с БА происходит заметное увеличение уровня β -амилоида. β -амилоид стимулирует фосфорилирование τ -белка посредством гликоген-синтазы-киназы, ведущее к образованию нейрофибриллярных клубков - эффекту, который является причиной синаптического повреждения [91]. В работах [92, 93] обнаружено, что β -амилоид, производный от APP (предшественника β -амилоидного протеина), действует как прооксидант. Существуют доказательства того, что амилоид играет важную роль в регуляции движения NMDA рецепторов [94, 95]. Обработка корковых нейронных культур β -амилоидами обеспечивает эндоцитоз NMDA рецепторов. Добавление ингибитора γ -секретазы не только снижает содержание β -амилоида, но также восстанавливает экспрессию NMDA рецепторов на поверхности нейронов. Также β -амилоиды связываются с митохондриальными мембранами, взаимодействуют с гемами и, таким образом, ингибируют процесс переноса электронов в дыхательной цепи [96-99].

В ряде работ показано, что нерастворимые β -амилоидные бляшки возникают во внеклеточном пространстве в результате секреции β -амилоида, происходящей в эндоплазматическом ретикулуме [100]. Соответственно, внутриклеточные β -амилоидные фибриллы главным образом концентрируются в нерастворимых гликолипидах мембран [101]. Агрегация

β -амилоидов происходит из β -амилоидных пептидов, произведенных локально из дезинтегрированной мембраны нейронов [102].

Формирование амилоидных бляшек повреждает гемато-энцефалический барьер, приводящий к захвату β -амилоида в головном мозге, эксайтотоксичности, воспалению, окислительному стрессу и стимуляции апоптоза [91]. Таким образом, очевидно, что β -амилоидные фибриллы исследователи рассматривают как терапевтическую мишень при лечении БА.

1.4.2. Ионотропные глутаматные AMPA и NMDA рецепторы

Как известно, глутаматные рецепторы ЦНС участвуют в передаче информации большинства нейронов ЦНС, а также в регуляции гомеостаза Ca^{2+} , в обеспечении пластичности нейронов и процессах консолидации памяти (в условиях нормы). Глутаматергическая нейротрансмиссия имеет решающее значение для нормального обучения и памяти [103, 104]. Глутаматные рецепторы ЦНС делят на два типа: ионотропные и метаботропные рецепторы. Ионотропные - структурно связаны с ионными каналами и, открывая их, вызывают электрическую активность нервных клеток. Рецепторы активируются непосредственным воздействием лигандов (агонистов), что приводит к их конформационному изменению и открытию ионного канала. Метаботропные рецепторы регулируют метаболические процессы в нейронах посредством специальных сигнальных молекул, они не связаны с ионными каналами [105, 106]. При активации ионотропные рецепторы формируют потенциал действия, тогда как метаботропные - регулируют его величину и длительность [107].

Опираясь на молекулярный и фармакологический критерии, ионотропные глутаматные рецепторы делят на три основных типа: AMPA, каинатные и NMDA рецепторы. Рецепторы можно идентифицировать с

помощью соответствующих селективных агонистов: N-метил-D-аспартата (NMDA), каината (КА) и α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазол-пропионовой кислоты (AMPA) [108].

Строение и функции AMPA рецепторов

AMPA рецепторы состоят из субъединиц GluR1, GluR2, GluR3 и GluR4 (рисунок 1.1), которые кодируются четырьмя генами [109]. Субъединицы AMPA рецепторов, комбинируясь, образуют тетрамеры. Существуют гомомерные и гетеромерные AMPA рецепторы [110].

В каждой субъединице AMPA рецептора выделяют три области: внеклеточный N-концевой домен, четыре гидрофобных области (это три трансмембранных домена TM1, TM3, TM4 и одна внутримембранная петля TM2) и внутриклеточный C-концевой домен (рисунок 1.1). N-концевой домен предположительно выполняет функции сборки рецептора и аллостерической модуляции ионного канала. Лиганд-связывающий домен состоит из S1, S2 - структур N-концевого участка. Этот центр придает фармакологическую специфику рецепторам. Внутримембранная петля TM2 отвечает за характеристики проницаемости поры канала. Внутриклеточный C-концевой домен AMPA рецепторов эукариот является местом связывания со многими внутриклеточными протеинами, которые принимают участие в регуляции движения рецептора и проводимости ионных каналов, также этот домен взаимодействует с сигнальными протеинами [111]. На C-конце между TM3 и TM4 обнаружена группа альтернативного сплайсинга, в результате которого все субъединицы AMPA рецепторов существуют в формах flip и flop [112].

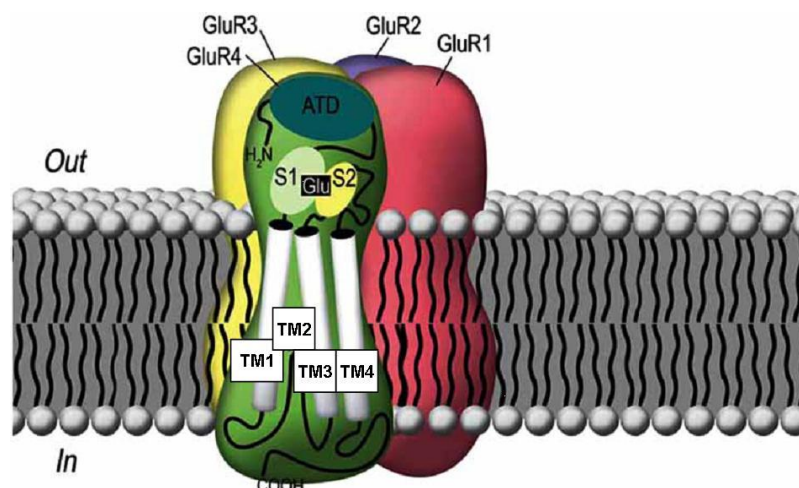


Рисунок 1.1. Структура AMPA рецептора, где GluR1-GluR4 – субъединицы рецептора; TM1, TM3, TM4 – трансмембранные домены; TM2 - внутримембранная петля ионного канала; ATD – аминотермальный домен (X-домен); S1, S2 – структуры лиганд-связывающего домена [113].

Из литературных данных известно, что AMPA рецепторы осуществляют возбуждающую нейротрансмиссию, а также играют важную роль в хранении информации в мозге [105, 114-116]. При связывании возбуждающего медиатора с AMPA рецепторами ионы Na^+ и K^+ проходят через поры каналов, что приводит к деполяризации клеточной мембраны. Особое значение имеет GluR2 субъединица гетеромерных рецепторов, которая предотвращает вход ионов Ca^{2+} в нейрон. Отличительной чертой AMPA рецепторов являются очень быстрые и сильные процессы деактивации и десенситизации, в результате чего происходит регуляция величины и длительности синаптического тока. При деактивации происходит закрытие ионного канала вследствие удаления агониста. При десенситизации рецептор переходит в нерабочее состояние, несмотря на наличие агониста, и не может вторично открыть ионный канал [112].

В работах [117, 118] обнаружена важная функция AMPA рецепторов: участие в изменении синаптической пластичности – процессах долговременной потенциации (LTP) и долговременного торможения (LTD),

которые являются основными клеточными механизмами обучения и памяти [119].

Соединения, усиливающие стимулируемый глутаматом входящий ток ионов через AMPA рецепторы посредством снижения десенситизации, называются позитивными модуляторами AMPA рецепторов [120]. Экспериментально установлено, что интенсивный ионный ток, вызванный действием на AMPA рецепторы положительных модуляторов с последующей деполяризацией постсинаптической мембраны, запускает механизм экспрессии генов, отвечающих за синтез нейротропинов — факторов роста нервной ткани [121]. Таким образом, положительные модуляторы AMPA рецепторов могут рассматриваться в качестве потенциальных лекарственных препаратов для лечения психоневрологических и нейродегенеративных заболеваний: возрастных нарушений когнитивных функций и памяти, рассеянного склероза, шизофрении, БА, БП и других [121-123].

Строение и функции NMDA рецепторов

NMDA рецепторы (рисунок 1.2) представлены в виде гетеромерных структур, сформированных комбинациями из субъединиц. Существует 7 разных субъединиц в результате альтернативного сплайсинга гена: NR1, NR2 (NR2A–NR2D), и в некоторых случаях - NR3 (NR3A и NR3B) [124]. NMDA рецепторы - тетрамеры и чаще всего они включают в себя две субъединицы NR1 и две NR2 одного и того же или разных подтипов [125-127]. В клетках, экспрессирующих NR3, эта субъединица соединяется с NR1 и NR2, и образуются тройные NR1/NR2/NR3 гетеромерные комплексы [128-130]. В зависимости от субъединичного состава NMDA рецепторы могут обладать различными характеристиками проводимости и селективности ионных каналов, кинетики активации и десенситизации [131].

Субъединица NMDA рецептора включает следующие участки: большой внеклеточный N-конец, три трансмембранных домена (TM1, TM3 и

TM4), внутримембранный домен (TM2), внеклеточную петлю между TM3 и TM4 и цитоплазматический С-конец, который изменяется в размерах в зависимости от субъединицы и имеет несколько сайтов для взаимодействия с многочисленными внутриклеточными белками [125, 132]. Известно, что N-концевой домен играет важную роль в сборке субъединиц [131]. TM2 домены четырёх субъединиц участвуют в образовании ионного канала. У субъединицы NR2 имеется сайт связывания глутамата, который располагается на двух (S1 и S2) доменах N-конца перед доменом TM1 и на TM3-TM4 петле. У субъединицы NR1 там же размещен сайт связывания глицина [133] и D-серина [134, 135]. Во внутренней области катионного канала NMDA рецептора находится - сайт связывания фенциклидина (PCP). Сайт связывания Mg^{2+} расположен в ионном канале NMDA рецептора, он обладает потенциал-зависимым блокирующим эффектом. Снаружи NMDA рецептора могут находиться сайты связывания Zn^{2+} . Сайты связывания глицина отвечают за регулирование соединения глутамата с NMDA рецептором. Также выделяют сайты полиаминов (спермина, спермидина и др.), точное расположение которых не определено (рисунок 1.2).

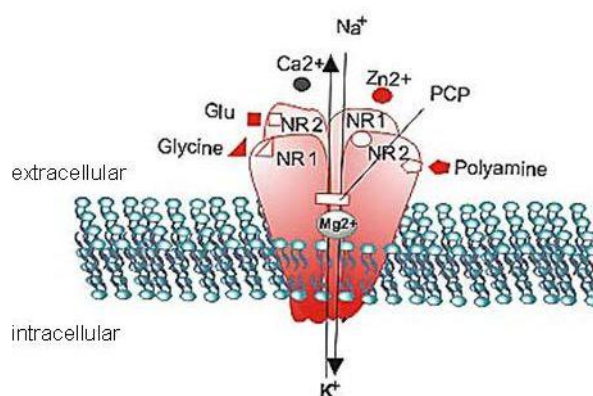


Рисунок 1.2. Схема строения NMDA рецептора: NR1, NR2 – субъединицы рецептора; сайты связывания глутамата (Glu), глицина (Glycine), фенциклидина (PCP), Mg^{2+} , Zn^{2+} , сайты полиаминов (Polyamine) [136].

Внутри ионных каналов NMDA рецепторов при нормальном уровне мембранного потенциала находятся ионы Mg^{2+} , которые блокируют прохождение ионов Na^+ , K^+ и Ca^{2+} . При деполяризации мембраны возбуждающим потенциалом, Mg^{2+} выходит и освобождает ионный канал для прохождения этих ионов. Вследствие действия медиатора на рецепторы открываются ионные каналы и внутрь нейрона заходят Na^+ , K^+ и Ca^{2+} . Это пролонгирует процесс возбуждения мембраны и одновременно включает внутриклеточные Ca^{2+} -зависимые реакции [137].

NMDA рецепторы наряду с AMPA рецепторами участвуют в процессах LTP и LTD [117, 118]. Известна двойственная природа действия NMDA рецепторов на нейроны. С одной стороны, они могут способствовать защите нейронов от патологических воздействий, а с другой - способствовать их гибели [138, 139]. В работе [138] было показано, что стимуляция синаптических NMDA рецепторов, действующих через Ca^{2+} сигнализацию, приводит к защите нейрона, а стимуляция extrasинаптических NMDA рецепторов способствует гибели клеток. Сверхстимуляция NMDA рецепторов может иметь пагубные последствия из-за активации Ca^{2+} -зависимых протеаз, липаз и ДНКаз [140, 141]. Авторы статьи [139] показали, что при БА и других нейродегенеративных расстройствах нейрональная дисфункция обусловлена дисбалансом между функциями синаптических и extrasинаптических NMDA рецепторов: в то время как синаптические NMDA рецепторы являются обедненными, сигнализация, опосредованная extrasинаптическими NMDA рецепторами поддерживается, облегчая патогенный синтез β -амилоида и далее патогенез.

Недавние исследования *ex vivo* [88] свидетельствуют о том, что к повреждению синапсов при БА приводит стимуляция β_{1-42} -амилоидами α -7-никотиновых рецепторов ацетилхолина, в результате чего астроцитами индуцируется выпуск чрезмерного количества глутамата, что приводит к

активации экстрасинаптических NMDA рецепторов, подавляющих синаптическую активность.

Препараты-антагонисты NMDA рецепторов, разработанные в 80-х и 90-х годах для лечения нейродегенеративных патологий, не прошли клинические испытания из-за неприемлемых побочных эффектов (галлюцинаций, нарушения памяти и двигательной активности). Известно, что применение блокаторов NMDA рецепторов ведет к усилению потери нейронов в ЦНС взрослых людей, перенесших черепно-мозговую травму или имеющих нейродегенеративные расстройства [142, 143]. Недостатком антагонистов NMDA рецепторов первого поколения было отсутствие субъединичной специфичности: выбрав своей мишенью домен связывания агониста (конкурентные антагонисты) или пору ионного канала (блокаторы каналов), эти соединения не различали разные субъединицы NMDA рецепторов. В настоящее время появляются новые классы селективных модуляторов, специфичных к определенным субъединицам NMDA рецепторов. В настоящее время широко известным также является акатинол мемантин – селективный блокатор глутаматных NMDA рецепторов, который блокирует кальциевые каналы, нормализует мембранный потенциал и улучшает процесс передачи нервного импульса [77, 144-146]. Мемантин продемонстрировал способность защищать синапсы от повреждений, вызванных агрегацией β -амилоидов [147] и генерацией супероксидных радикалов [148]. Он улучшает когнитивные способности, уменьшает возбуждение и агрессивность, повышает повседневную активность, а побочными эффектами являются головная боль, сонливость, головокружение и одышка.

В последнее время появились новые селективные модуляторы NMDA рецепторов: GluN2A-селективный антагонист TCN201 [149] и GluN2C/D-селективные антагонисты: QNZ46 [150, 151] и DQP1105 [152].

Очевидным становится участие AMPA и NMDA рецепторов в нейродегенеративных процессах. Еще в работах [153, 154] авторы обратили внимание на то, что развитие НЗ может быть связано с нарушением деятельности возбуждающих аминокислотных рецепторов. Действительно, нарушения в их работе могут привести к увеличению проницаемости для Ca^{2+} или сниженной инактивации рецепторов. Существует теория о том, что нарушение кальциевого гомеостаза лежит в основе старения и деменции [155]. Дж. В. Олни впервые выдвинул гипотезу эксайтотоксичности, экспериментально доказав, что возбуждающим нейротрансмиттерам (глутамату и, возможно, аспартату) свойственна цитотоксичность [156]. Процесс эксайтотоксичности, по его мнению, развивается следующим образом: чрезмерное высвобождение аминокислот вызывает гиперактивацию AMPA и NMDA рецепторов. Через каналы AMPA рецепторов в нейрон входит большое количество ионов Cl^- , Na^+ и молекул H_2O , происходит «осмотическое набухание» клетки. NMDA рецепторы гиперактивируются в результате снятия Mg^{2+} -блока, происходит вход и накопление внутриклеточного Ca^{2+} , вследствие чего активируется ряд ферментов (эндонуклеаз, фосфолипаз, протеаз) и в итоге происходит апоптоз или некроз нейрона. Эксайтотоксичность проявляется при ишемии головного мозга (после инсульта или травмы мозга), при нейродегенеративных заболеваниях, таких как БА, БП и болезнь Хантингтона, боковом амиотрофическом склерозе, при диабетической энцефалопатии и других когнитивных расстройствах [157-159].

Существует также понятие «медленной эксайтотоксичности». В 1988 году А. Новелли и его коллеги впервые показали, что нарушение энергетического метаболизма может привести к тому, что ингибиторы Na^+ , K^+ -АТФазы вызывают образование нейротоксичного глутамата в концентрациях, которые обычно не являются нейротоксичными [160]. Происходит уменьшение количества АТФ, которое имеет решающее

значение для поддержания потенциала покоя клеточной мембраны. Когда клеточная мембрана деполяризуется от -90 мВ до диапазона от -60 до -30 мВ, потенциал-зависимый магниевый блок NMDA рецептора снимается, что ведет к стойкой активации рецептора, которая приводит к накоплению внутриклеточного Ca^{2+} , активации эндонуклеаз, фосфолипаз и протеаз и, в конечном счете, гибели нейрона.

Благодаря особой важной роли ионотропных глутаматных AMPA и NMDA рецепторов в регуляции и осуществлении когнитивных функций, в последние годы они рассматриваются как терапевтические рецепторные мишени при лечении нейродегенеративных расстройств, связанных с деменциями.

1.4.3. Окислительный стресс

Многие исследователи придерживаются мнения, что в развитии процессов нейродегенерации важную роль играет постепенно усиливающийся окислительный стресс, а также взаимодействие β -амилоидных белков с NMDA рецепторами, которые ведут к гибели нейронов. В работах [161, 162] приведены данные о том, что на трансгенной мышинной модели БА обнаружено увеличенное количество маркеров окислительного стресса. До сих пор не установлено, что является основной причиной усиления окислительного стресса при старении мозга: накопление прооксидантных факторов, снижение активности ферментов антиоксидантной защиты или комбинация этих факторов [163].

Известно, что свободные радикалы (главным образом – супероксид и радикал гидроксила) являются продуктами клеточного метаболизма в норме. Супероксид продуцируется в процессе клеточного дыхания, а потом катализируется СОД до кислорода и перекиси водорода [164]. При

глутаматной эксайтотоксичности эта буферная система разрушается, происходит утечка супероксидов в цитоплазму через анионные каналы, включающие потенциал-зависимые анионные каналы митохондрий [165]. Дисбаланс между продукцией активных форм кислорода и способностью клетки защищать себя от них приводит к окислительному стрессу. Окислительный стресс является причиной повреждения клетки, так как активные формы кислорода окисляют критически важные клеточные компоненты – мембранные липиды и белки, ДНК. Конечным результатом этого процесса является апоптоз или некроз [166]. Каскад патологических событий, вызванный образованием β -амилоидных фибрилл, в его начальной фазе может быть результатом митохондриального окислительного стресса, который в его заключительной фазе приводит к экспрессии и активации проапоптотического фермента гликоген-синтазы-киназы-3 β [167]. В ряде работ показано, что экспозиция нейрональных культур или клеточных линий нейронов с β -амилоидом повышает внутриклеточные уровни активных форм кислорода (АФК) [168-170]. В работе [171] установлено, что однократное введение β -амилоида и ФНО-альфа (фактор некроза опухоли-альфа) приводит к увеличению уровня продуктов ПОЛ (диеновых конъюгатов) в гиппокампе и коре головного мозга крыс в течении 3 ч и 7 дней. Кроме того, результаты некоторых работ свидетельствуют о том, что окислительный стресс может предшествовать образованию β -амилоидных фибрилл и усиливать этот процесс [91, 92]. Первое косвенное доказательство роли свободных радикалов в глутаматной эксайтотоксичности приведено в работе [172]. Установлено, что нейроны мозжечка, культивированные в среде, богатой маннитолом или СОД, были устойчивы к каинат-вызванной эксайтотоксичности. Позднее было показано, что культивированные нейроны коры головного мозга, сверх экспрессирующие СОД, оказались устойчивыми к нейротоксичности, вызванной глутаматом и ишемией [173].

Напрямую определение продукции свободных радикалов, сопровождающей эксайтотоксичность, было произведено на гранулярных клетках мозжечка [174] и корковых культурах [175, 176]. Работа [176] демонстрирует, что генерация свободных радикалов в митохондриях происходит после притока кальция через NMDA рецепторы. Свободные радикалы в цитоплазме, особенно супероксиды, могут взаимодействовать с другими радикалами, такими как NO, с формированием активных оксидантов [177].

Есть данные, что прием витаминов, обладающих антиоксидантными свойствами, снижает риск развития БА [178]. В работе [179] показано, что α -токоферол (витамин E), аскорбиновая кислота и убихинон, которые являются ловушками свободных радикалов, проявляют нейропротекторные свойства.

Различными группами исследователей был показан нейропротекторный эффект против глутаматной эксайтотоксичности в культурах с различными антиоксидантными веществами: спиновыми ловушками свободных радикалов и 21-аминостероидами (лазароидами) [180-182]. Использование антиоксидантов, которые могут ослабить последствия окислительного стресса в мозге при БА, обсуждается также в ряде статей [183-185]. Авторы работ [186-188] показали, что увеличение содержания свободных радикалов кислорода, вызванное накоплением β -амилоидных фибрилл, может быть предотвращено антиоксидантами, ориентированными непосредственно на митохондрии. К группе митохондриально-направленных антиоксидантов относят латрепирдин (димебон) и пептид SS31. Эти препараты *in vivo* модифицируют β -амилоидную патологию гиппокампа и *in vitro* защищают от β -амилоидной токсичности, стимулируя выживание клеток [189-191].

Н. А. Капай и соавторы в своей работе [192] использовали модель синаптических изменений, связанных с обучением и памятью [118]. Высокочастотной стимуляцией срезов гиппокампа вызывался электрический

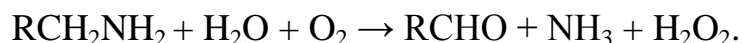
ответ, который является процессом LTP синаптической передачи в гиппокампальных путях. В работе показано, что 15-минутная обработка 200 наномолярным водным раствором β_{1-42} -амилоида снижает индукцию LTP в срезах гиппокампа крыс в 2 раза. Одна внутрибрюшинная инъекция митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 (250 нМ на кг веса животных) за 24 часа перед подготовкой срезов или предварительная обработка срезов гиппокампа *in vitro* устраняет ингибирующий LTP эффект β_{1-42} -амилоидов.

Н. А. Стефанова и соавторы [193] показали, что длительное лечение митохондриально-направленным антиоксидантом SkQ1 (250 нМ/кг) уменьшает возрастные изменения в поведении и дефицит пространственной памяти у крыс линии OXYS и Wistar в водном лабиринте Морриса. Обнаружено, что антиоксидант SkQ1 замедляет патологическое накопление APP, β -амилоидов и процесс гиперфосфорилирования τ -белка на крысах OXYS, а также снижает эффекты возрастных изменений здоровья крыс Wistar.

Таким образом, из литературных данных следует, что митохондриально-направленные антиоксиданты могут быть эффективны при терапии нейродегенеративных патологий, приводящих к деменции.

1.4.4. Моноаминоксидаза В

Моноаминергическая сигнализация считается одним из ключевых механизмов модуляции настроения и эмоций, а также контроля двигательных, перцептивных и когнитивных функций [194]. Моноаминоксидазы (МАО) – интегральные белки наружной митохондриальной мембраны, катализирующие общую реакцию окислительного дезаминирования [195]:



МАО играет главную роль в инактивации биогенных аминов как в центральной нервной системе, так и в периферических нейронах и тканях. В ЦНС человека МАО типа А (МАО-А) главным образом отвечает за дезаминирование серотонина (5-гидрокситриптамина) и норадреналина, в кишечнике метаболизирует окисление тирамина. МАО типа В (МАО-В) катализирует в основном дезаминирование b-фенилэтиламина и дофамина [195]. Самая высокая концентрация МАО-А обнаружена в катехоламинергических нейронах голубого пятна, а МАО-В – в серотонергических и гистаминергических нейронах шва и заднего гипоталамуса [196-198]. МАО-А является терапевтической мишенью при лечении клинической депрессии и тревожности [199, 200].

Как известно, одной из основных мишеней первичной оценки соединений при создании препаратов для лечения НЗ считается МАО-В [198, 201]. МАО-В является димером [202]. На рисунке 1.3 показана структура одного из мономеров МАО-В.

Активность МАО-В в мозге, в отличие от МАО-А, увеличивается с возрастом [203]. Повышенный уровень МАО-В индуцирует апоптоз в нейрональных клетках [204] и клетках почек [205]. Высокий уровень МАО-В также находят в астроцитах мозга пациентов с БА. При БА может увеличиваться активность фермента МАО-В в глиальных клетках, что может способствовать формированию высокого содержания NH_3 , альдегидов, перекиси водорода, то есть веществ с потенциальной нейротоксичностью [206]. При взаимодействии железа и перекиси водорода формируются реактивные радикалы гидроксила. Исходя из этого, целесообразно использование селективных МАО-В ингибиторов. Ингибирование МАО-В приводит к снижению ферментативной инактивации дофамина и пролонгирует работоспособность этого нейротрансмиттера в

дофаминергических нейронах [207]. Так ингибиторы MAO-B повышают уровни моноаминов в мозге и способствуют уменьшению образования АФК.

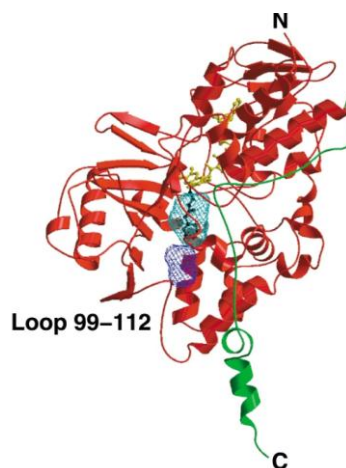


Рисунок 1.3. Структура мономера MAO-B [202]: N-терминальная (N) и C-терминальная аминокислоты (C); полости, образующие субстратный путь от поверхности белка к флавиону в мономере MAO-B: полость активного центра (голубым цветом) и входная полость (фиолетовым цветом), которая находится под петлей (Loop 99-112), обеспечивающей взаимодействие с мембраной. Также выделены флавин (желтым цветом) – действующая часть окислительно-восстановительного кофермента флавинадениндинуклеотида и ингибитор MAO – паргилин (черным цветом). C-конец включается во внешнюю митохондриальную мембрану.

Селегилин (L-депренил) – широко применяемый препарат, впервые синтезированный в 1962 году, который является эффективным селективным необратимым ингибитором MAO-B. Этот препарат усиливает работу катехоламиновой системы, улучшает когнитивные функции пациентов с деменцией альцгеймеровского типа и уменьшает поведенческие изменения [208-211], а также есть данные [212] о том, что этот препарат усиливает действие агонистов дофаминовых рецепторов при терапии пациентов с болезнью Паркинсона, в том числе на ранней стадии заболевания. Существуют данные о том, что селегилин уменьшает оксидативный стресс у мышей [213], а субхроническое введение его крысам приводит к десятикратному усилению активности СОД исключительно в стриатуме [214]. Однако этот препарат оказывает выраженные побочные эффекты. Это

тошнота, желудочно-кишечные расстройства, повышенная утомляемость, головокружение, головная боль, тревожность, двигательное и психическое возбуждение, бессонница и галлюцинации.

Известно, что для лечения нейродегенеративных расстройств, таких как БА и БП, ученые получали бифункциональные препараты, которые являются одновременно ингибиторами АХЭ и МАО [215, 216].

1.5. Нейропротекторное действие фуллеренов и их производных

В настоящее время существует множество публикаций, в которых приведены результаты исследований, свидетельствующие о нейропротекторной активности производных фуллеренов, что позволяет рассматривать эти соединения в качестве потенциальных перспективных препаратов для борьбы с возрастными заболеваниями, связанными со значительным снижением когнитивных функций.

Как уже говорилось выше, окислительный стресс играет важную роль в развитии НЗ. Исходя из этого, в качестве потенциальных лекарственных препаратов для лечения нейродегенеративных расстройств внимание исследователей привлекают соединения, которые обладают антиоксидантной активностью. Как было отмечено выше, фуллерены и их производные могут выступать как эффективные антиоксиданты [7, 19, 29, 41, 43-45]. В ряде работ [46-48, 217, 218] показано, что нейропротекторная активность производных фуллеренов обусловлена их способностью выступать ловушками АФК. Существуют данные о значительной корреляции между нейропротекторной эффективностью различных карбоксифуллеренов и их антиоксидантной активностью [47]. В этой работе исследованы шесть различных карбоксифуллеренов – миметиков супероксиддисмутазы. В качестве модели для оценки структурно-функциональной взаимосвязи между

реакционной способностью с супероксидами и защитой нейронов авторы рассматривали нейротоксичность, опосредованную NMDA рецепторами, в которой участвует внутриклеточный супероксид. Также была установлена корреляция между способностью производных фуллеренов к нейропротекции и их дипольным моментом. В работе [218] утверждается, что карбоксифуллерен является перспективным терапевтическим средством для лечения болезни Паркинсона за счет его антиоксидантных свойств, что подтверждено в исследованиях *in vivo*.

Нейропротекторная активность производных фуллерена также включает антиамилоидное действие. Согласно «амилоидной гипотезе» возникновения и развития болезни Альцгеймера, полимеризация и отложение β -амилоида является одной из главных причин, нарушающих работу, а впоследствии и целостность нейронов. В работе [46] предполагается, что нейропротекторные свойства фуллеренолов связаны с тем, что они действуют как антиоксиданты и в то же время ингибируют нейротоксичность, связанную с притоком Ca^{2+} , вызванным β_{42} -амилоидом, что было продемонстрировано на культуре нейронов. В работе [52] показано, что гидратированный фуллерен C_{60} ингибирует фибриллизацию β_{25-35} -амилоида, а также установлено, что его интрацеребровентрикулярное введение в дозе 7.2 нмоль/желудочек мозга значительно улучшает решение когнитивной задачи крысами контрольной группы, а при введении в дозе 3.6 нмоль/желудочек мозга предотвращает ухудшение решения когнитивной задачи крысами, которым предварительно ввели β_{25-35} -амилоид (22.5 нмоль/желудочек мозга). Подтверждением способности гибридных структур фуллерена C_{60} к антиамилоидной активности служат результаты работы А. Г. Бобылева и соавторов [54], в которой установлено, что моно- и динитрат фуллеренилпролина предотвращают образование β -амилоидных фибрилл, а также разрушают уже сформированные фибриллы. В работе [217]

исследованы PEG-C₆₀-3 (производное фуллерена C₆₀, включающее полиэтиленгликоль) и его пентоксифиллин-содержащий гибрид РТХ-C₆₀-2. Эти производные существенно снижают вызванную β_{25-35} -амилоидом цитотоксичность, уменьшают содержание активных форм кислорода и поддерживают митохондриальный мембранный потенциал нейробластов мышц. Также антиамилоидные свойства некоторых производных фуллерена были обнаружены авторами работ [51, 219]. В то же время существуют данные, что поликарбоксовые производные фуллерена ингибируют образование амилоидных фибрилл Х-белка и разрушают уже сформированные [53]. Недавние исследования нейропротекторного действия фуллерена C₆₀ отражены в статье [220]. Авторам удалось заингибировать нейродегенерацию и формирование отложений β_{25-35} -амилоида в пирамидальных нейронах гиппокампа *in vivo* с помощью предварительного введения водного молекулярно-коллоидного раствора C₆₀. Новые исследования [221] показали, что наночастицы фуллерена C₆₀ эффективно предотвращают формирование β -складчатого слоя пептидов β_{16-22} -амилоида (агрегацию).

К нейропротекторному действию соединений также относят способность производных фуллеренов предотвращать возникновение дефицита ацетилхолина. Г. Пасторин и его коллеги обнаружили, что четыре различных региоизомера катионных солей бис-N, N-диметилфуллеропирролидина являются неконкурентными ингибиторами ферментативной активности АХЭ [49].

Как известно, одним из основных механизмов гибели клеток при нейродегенеративных расстройствах считается эксайтотоксичность. В связи с этим особое внимание уделяется производным фуллеренов, которые оказывают антиэксайтотоксичное действие, а именно, ингибируют активность ионотропных глутаматных рецепторов. В работе [55] показано,

что региоизомеры карбоксифуллеренов с C_3 и D_3 симметрией ингибируют процесс эксайтотоксичности нейронов коры мозга, индуцированный воздействием NMDA и AMPA. Авторами работы [56] показано, что действие полигидроксилированного фуллеренола C_{60} приводит к снижению нейротоксичности за счет ингибирования работы глутаматных рецепторов, которые при патологии могут индуцировать повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . А. С. Бассо и соавторы [48] установили, что водорастворимое производное фуллерена (ABS-75) – антагонист NMDA рецепторов, имеющий антиоксидантные и антиэксайтотоксические свойства, блокирует аксональные повреждения и уменьшает прогрессирование болезни на экспериментальной модели хронического прогрессирующего аллергического энцефаломиелита, что перспективно для лечения прогрессирующего рассеянного склероза и других нейродегенеративных расстройств. Авторы работы [222] показали, что производное фуллерена защищает корковые нейроны крыс от глутаматной токсичности, а также предположили, что это связано с модуляцией экспрессии генов аденозиновых и метаботропных глутаматных рецепторов.

Следует также отметить, что существуют работы, посвященные исследованиям способности карбоксифуллеренов защищать дофаминергические нейроны, что важно для обеспечения когнитивных процессов. В работе [57] установлено, что C_3 -изомер карбоксифуллерена защищает культивированные дофаминергические нейроны среднего мозга от дегенерации, вызванной воздействием 1-метил-4-фенилпиридиния (MPP^+) или 6-гидроксидопамина (6-OHDA). В работе [58] в течение 1 месяца крысам с моделью болезни Паркинсона вводили C_3 -изомер карбоксифуллерен, после чего при интрастриатном введении 6-OHDA было обнаружено, что дофаминергические терминали и поведение крыс были значительно улучшены за счет обработки карбоксифуллереном.

Авторами работы [55] на мышинной модели семейного амиотрофического латерального склероза показано, что карбоксифуллерены задерживают наступление двигательной дегенерации. В работе [223] была протестирована C₃-фуллеро-трис-метанодикарбоновая кислота в модели апоптотической нейрональной гибели *in vitro*, которая вызывается меняющейся концентрацией K⁺ от 25 до 5 мМ в гранулярных клетках мозжечка. Исследуемым соединением по концентрационно-зависимому пути были предотвращены ухудшение митохондриальной функции, дисфункция хроматина, а также фрагментация ДНК в апоптотических олигонуклеосомах, происходящих в созданных условиях.

Таким образом, очевидно, что задача создания лекарственных препаратов для лечения нейродегенеративных патологий, связанных с нарушением когнитивных функций, является одной из наиболее актуальных проблем современности. Попытки решить эту проблему пока не увенчались успехом. Используемые в современной клинической практике препараты не останавливают прогрессирование заболевания, а лишь устраняют некоторые его симптомы. Производные фуллеренов благодаря низкой токсичности и широкому спектру биологической активности, в частности, антиоксидантной и нейропротекторной, представляются весьма перспективными кандидатами для создания эффективных препаратов нового поколения для терапии нейродегенеративных расстройств.

Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

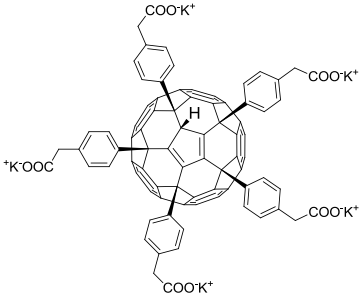
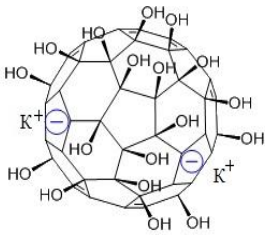
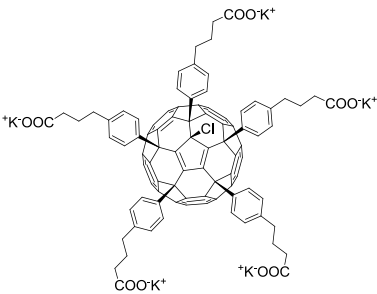
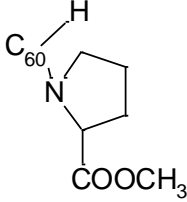
2.1. Материалы

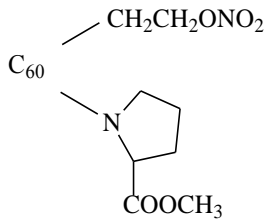
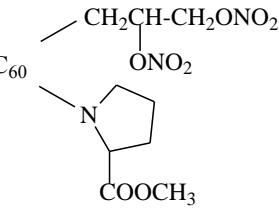
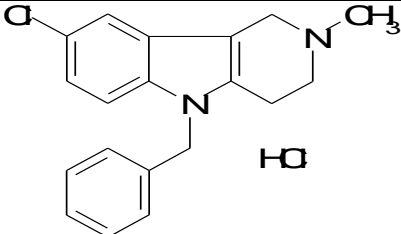
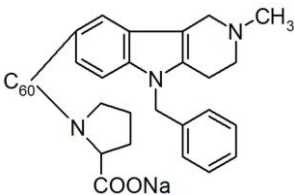
Объектами исследования были выбраны две группы водорастворимых производных фуллерена C_{60} : полизамещенные производные фуллерена C_{60} (ППФ) и гибридные структуры на основе аминокислотного производного фуллерена C_{60} с биологически активными группировками (ГСФ).

ППФ I-III были синтезированы группой П. А. Трошина ИПХФ РАН (таблица 2.1) по методам [13, 224]. Это поликарбоксильные производные фуллерена I и III, у которых к сфероиду фуллерена C_{60} присоединены пять ионогенных карбоксильных групп, а также фуллеренолят калия II, у которого более двадцати недиссоциирующих гидроксильных полярных групп (таблица 2.1). Растворимость в воде для ППФ I и III – 50-100 мг/мл [13], для ППФ II – >10 мг/мл [225].

ГСФ были синтезированы старшим научным сотрудником В. С. Романовой (ИНЭОС РАН). Это наноструктуры, которые включают в себя сфероид фуллерена C_{60} и присоединенные к нему функциональные группировки, а также аминокислоту пролин для обеспечения растворимости в воде (таблица 2.1: ГСФ V, VI) [226]. В. С. Романовой также была синтезирована гибридная структура (таблица 2.1: ГСФ VIII) путем присоединения к сфероиду фуллерена C_{60} натриевой соли пролина и бензильного аналога димебона (соединения VII) [226, 227]. Растворимость в воде для ГСФ – около 2 мг/мл.

Таблица 2.1. Исследуемые соединения: водорастворимые полизамещенные производные фуллерена C₆₀ (I-III), гибридные структуры фуллерена C₆₀ (IV-VI, VIII) и биологически активное вещество (VII).

№		Структура соединения	Название; Mr
1	I		<p>4,4',4'',4''',4''''-(8- гидро[5,6]фуллерен-C₆₀-I_h- 1,7,11,24,27(8H)- пентаил)пентакисфенилуксусной кислоты пентакалийевая соль;</p> <p>1588</p>
2	II		<p>Фуллеренолят калия;</p> <p>1400</p>
3	III		<p>4,4',4'',4''',4''''-(8- хлоро[5,6]фуллерен-C₆₀-I_h- 1,7,11,24,27(8H)- пентаил)пентакисфенилмасляной кислоты пентакалийевая соль;</p> <p>1766</p>
4	IV		<p>Метилвый эфир N-[моногидрофуллеренил] пролина;</p> <p>850</p>

5	V		<p>Метилловый эфир N-[(нитроксиэтил) фуллеренил] пролина; 938</p>
6	VI		<p>Метилловый эфир N-[(1,2-динитроксипропил) фуллеренил] пролина; 1014</p>
7	VII		<p>2-метил-5-бензил-8-хлор-2,3,4,5- тетрагидро-1H-пиридо[4,3- b]индол гидрохлорид; 347</p>
8	VIII		<p>метилловый эфир N-{дис- 2,3,4,4a,5,9b-гексагидро-5- (фенилметил)-1H-пиридо[4,3b]- 8-индолил} фуллеренил-L- пролина; 1119</p>

В работе использовали следующие реактивы: 2,7-дибромпрофлавин (Романова В.С., ИНЭОС РАН), пирен (Sigma), фосфатидилхолин (Fluka), этанол, глюкозооксидаза (Sigma), каталаза (Sigma), тиобарбитуровая кислота (Sigma), KH_2PO_4 (Sigma), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Sigma), трихлоруксусная кислота (Sigma), люминол (Sigma), трет-бутил-гидропероксид (United Initiators), трис- HCl (Aldrich), серотонин (Sigma), бензиламин (Aldrich), K_2CO_3 (Sigma), $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ (Sigma), Na_2CO_3 (Sigma), NaOH (Sigma), реактив Фолина (Sigma), альбумин бычий сывороточный кристаллический (Sigma), H_2SO_4 (Sigma), реактив Несслера (Sigma), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Sigma), KCl (Sigma), NaCl (Sigma),

CaCl₂ (Sigma), глюкоза (Sigma), сахароза (Sigma), буфер HEPES (Sigma), глутамат (Sigma), трилон Б (Sigma), MgSO₄·7H₂O (Sigma), проназа (Sigma), коллагеназа (Sigma), EGTA (Sigma), MgCl₂ (Sigma), АТФ (Sigma), каиновая кислота (Sigma), [³H]дизоцилпин (Sigma), [³H]ифенпродил (Sigma), полиэтиленамин (Sigma), толуол (Sigma), PPO (Sigma), POPOP (Sigma), Na₄EDTA (Sigma).

2.2. Приборы и аппаратура

Экспериментальные исследования проводились с помощью следующего оборудования: спектрофлуориметр Cary-Eclipse (Varian, Австралия), вакуумный роторный испаритель LABOROTA 4000 efficient/НВ/G6 (Heidolph), дезинтегратор УЗДН-1 У4.2, спектрофотометр Specord M-40 (Carl Zeiss, Германия), рефрижераторная центрифуга 5417R (Eppendorf, Германия), центрифуги К-23 и К-24 (Janetzki, ГДР), ванна ультразвуковая УЗВ-3/200-ТН (РЭЛТЕК), микроскоп (Carl Zeiss, Йена), усилитель ЕРС-9 (НЕКА, Германия), фотосенсорная установка TruScan (Coulbourn, США), хемилуминометр Luminometr-1250 (LKB Wallak, Швеция), весы Ohaus Pioneer PA214 (OHAUS, США), термостат ТС-1/80-СПУ (Смоленское СКТБ СПУ, Россия), жидкостной сцинтилляционный счетчик Tri-Carb 2800 TR (PerkinElmer, Packard, США).

2.3. Методы исследования

2.3.1. Приготовление суспензии фосфатидилхолиновых липосом

Липосомы получали согласно [228]. Готовили раствор фосфатидилхолина в этаноле (40 мг/мл). 5 мл раствора помещали в круглодонную колбу, спиртовую фазу удаляли с помощью вакуумного роторного испарителя (давление 150 мбар, 270 вращений/мин). Белую фосфолипидную пленку, равномерно распределенную тонким слоем на стенках внутренней поверхности колбы, переносили в водный буферный раствор (трис-НСI, рН=7.2, 0.02 М) путем встряхивания в течение 10–20 мин при комнатной температуре в ультразвуковой ванне. Полученную суспензию подвергали ультразвуковой обработке на дезинтеграторе УЗДН-1 У4.2 в течение 10 мин в токе аргона при температуре 4° С [229]. Перед работой суспензию разбавляли в 100 раз буфером трис-НСI (рН=7.2, 0.02 М) и хранили под аргоном при 4° С не более суток. Для введения в фосфатидилхолиновые липосомы молекул красителей фосфолипидную пленку переносили в буферный раствор трис-НСI (рН=7.2, 0.02 М), содержащий 2.7-дибромпрофлавин [10^{-6} М] или пирен [10^{-5} М].

2.3.2. Исследование взаимодействия ППФ с фосфолипидной мембраной методом флуоресцентных зондов

Методы, базирующиеся на явлении флуоресценции, эффективно применяются в современной биофизике [230-232]. Локализацию ППФ в мембране оценивали с помощью метода флуоресцентных зондов [233]. В

качестве люминесцентных зондов в работе использовались 2,7-дибромпрофлавин (гидрофильный, имеющий один положительный заряд) и пирен (гидрофобный, не имеющий зарядов) (рисунок 2.1).



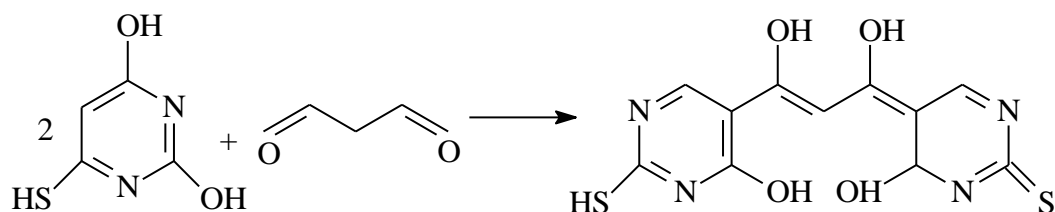
Рисунок 2.1. Структурные формулы люминесцентных зондов.

Спектры флуоресценции 2,7-дибромпрофлавина и пирена в водных растворах и в составе липосом регистрировали на спектрофлуориметре Cary-Eclipse (Varian, Австралия). В кварцевую сантиметровую кювету помещали 2 мл суспензии фосфатидилхолиновых липосом (или буфер трис-НСl, рН=7.2, 0.02 М), содержащих хромофор. Образцы титровали аликвотами ППФ (по 10 мкл). Регистрировали уменьшение амплитуды флуоресценции зондов при $\lambda=510$ нм – для 2,7-дибромпрофлавина, 394 нм – для пирена. Из наклона начального участка кривой согласно уравнению Штерна–Фольмера определяли константу равновесия K_c , характеризующую прочность комплекса ППФ-зонд в водном растворе и в составе фосфатидилхолиновых липосом.

2.3.3. Определение интенсивности пероксидного окисления липидов

Интенсивность пероксидного окисления липидов (ПОЛ) в гомогенате головного мозга мышей оценивали по концентрации в образцах малонового диальдегида (МДА) – конечного продукта окисления полиненасыщенных жирных кислот [234]. Метод основан на реакции между 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) и промежуточными продуктами ПОЛ, в результате которой

образуется окрашенный триметиновый комплекс с максимумом поглощения при длине волны 532 нм:



Главная роль в образовании этого окрашенного комплекса принадлежит МДА [235].

Гомогенат готовился в гомогенизаторе Поттера при температуре 4° С из ткани головного мозга мышей в соотношении: 1 г ткани мозга на 8 мл К, Na-фосфатного буфера (рН=7.4, 0.1 М).

Для оценки влияния соединений на интенсивность ПОЛ в гомогенате головного мозга мышей к 2.25 мл гомогената добавляли 0.25 мл исследуемого соединения в концентрации 10^{-4} М для получения конечной концентрации соединения в пробе 10^{-5} М и инкубировали 30 мин при 37°С. К полученному образцу добавляли 1 мл 17% трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и центрифугировали 10 мин при 3000 g. К пробам (2 мл супернатанта) добавляли 1 мл 0.8% ТБК, инкубировали на водяной бане 30 мин при 100°С, затем охлаждали до комнатной температуры и регистрировали оптическую плотность при $\lambda=532$ нм.

Концентрацию МДА рассчитывали по формуле:

$$K = \frac{(A_o - A_k)}{\varepsilon}, \quad (2.1)$$

где K – концентрация МДА; A_o – оптическая плотность опытного образца; A_k – оптическая плотность контрольного раствора; ε – молярный коэффициент экстинкции, равный $1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.3.4. Определение антирадикальной активности ВРПФ методом хемилюминесценции

Антирадикальную активность ВРПФ определяли в гомогенате головного мозга мышей методом хемилюминесценции (ХЛ) по изменению люминесценции люминола (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндиона), опосредованной взаимодействием хромофора со свободными радикалами, образование которых инициируется третбутилгидропероксидом (ТБГП) [236]. Люминол в присутствии активных форм кислорода окисляется и генерирует электронно-возбужденные карбонильные хромофоры с высоким квантовым выходом [237]. Содержание свободных радикалов в гомогенате головного мозга мышей оценивали по изменению светосуммы: площади под кинетической кривой изменения интенсивности свечения люминола при взаимодействии его с активными формами кислорода. Эта площадь пропорциональна концентрации свободных радикалов, взаимодействовавших с люминолом за все время свечения. При добавлении в данную модельную систему веществ, обладающих антирадикальной активностью, количество свободных радикалов уменьшается, соответственно снижается интенсивность люминесценции люминола, что приводит к уменьшению светосуммы [238]. Опытная проба содержала $5 \cdot 10^{-5}$ М люминола и гомогенат головного мозга мышей с концентрацией белка 1 мг/мл, 10^{-5} М ВРПФ, 0.073 М ТБГП. Объем пробы доводили до 2 мл буфером трис-НСl (рН=7.4, 0.1М). Контрольная проба не содержала ВРПФ. Кинетику изменения ХЛ регистрировали на хемилюминометре в течение 15 мин. Первые 10 с регистрировали нулевую линию, затем поворачивали кюветное отделение прибора на 90° и с 10-й по 20-ую с прописывали эталон, содержащий изотоп C_{14} с активностью 0.26 мкКи и имеющий постоянную интенсивность сигнала в 10 мВ. Стандарт имеет постоянную интенсивность излучения, равную 10 мВ. Его сигнал использовался для калибровки шкалы. С 20-й по 30-ую

секунды прописывали пробу без ТБГП, и ровно на 30-ой с добавляли раствор ТБГП в кювету путем резкого впрыскивания из шприца с иглой через специальное светозащищенное отверстие над кюветой хемилюминометра. Измерения проводили при постоянном термостатировании (38° С) и барботировании пробы воздухом. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [239].

Площадь определяли как значение интеграла под кинетической кривой зависимости интенсивности люминесценции люминола от времени (S):

$$S = \int_{30}^{900} A_i dt, \quad (2.2)$$

где S – площадь под кривой ХЛ, A_i – текущее значение интенсивности ХЛ в момент времени t. На 30-ой с инициировался процесс ПОЛ с помощью добавления ТБГП. Измерение проводили в течение 15 мин.

2.3.5. Исследование влияния ВРПФ на каталитическую активность моноаминоксидазы (формы А и В)

Ферментативную активность MAO-A и MAO-B в гомогенате головного мозга мышей определяли по методике [240]. Метод основан на спектрофотометрическом определении количества аммиака, выделяющегося в результате ферментативной реакции дезаминирования биогенных аминов серотонина и бензиламина мембраносвязанными ферментами MAO-A и MAO-B, соответственно.

Для изучения влияния исследуемых соединений на каталитическую активность MAO-A и MAO-B в пробу с 0.6 мл гомогената (1 г мозга:5 мл 0.1 М К-Na-фосфатного буфера), добавляли 0.2 мл субстрата (серотонина или

бензиламина, конечная концентрация – $5 \cdot 10^{-3}$ М) и 0.2 мл исследуемого соединения (конечная концентрация – 10^{-5} М). В качестве контроля использовали образцы, не содержащие ВРПФ. Пробы инкубировали при 37° С в течение 1 ч, реакцию фермент-субстратного взаимодействия останавливали добавлением 0.1 мл 50% ТХУ, затем пробы центрифугировали при 4000 g в течение 15 мин. К супернатанту для подщелачивания среды добавляли по 2 мл насыщенного раствора K_2CO_3 . После этого пробу плотно закрывали притертой пробкой со стеклянной палочкой внутри, на конце которой находилась капля 1N H_2SO_4 и выдерживали 12 ч при комнатной температуре. Затем капельки, содержащие сульфат аммония (выделившийся в результате реакции нейтрализации), стряхивали со стеклянных палочек в пробирки с дистиллированной водой (4.5 мл), добавляли по 0.5 мл реактива Несслера и через 30 мин регистрировали оптическую плотность растворов на спектрофотометре при $\lambda=430$ нм. По калибровочному графику определяли концентрацию выделившегося аммиака. За активность фермента принимали количество аммиака, выделившегося в результате реакции дезаминирования субстрата ферментом в минуту. Для определения удельной активности это значение делится на количество белка в образце. Количество белка определяется по методу Лоури [239].

Для определения механизма ингибирования MAO-B производными фуллерена использовали кинетический метод исследования ферментативных реакций. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата (бензиламина) в присутствии и отсутствии исследуемых ВРПФ оценивали в обратных координатах Лайнуивера-Берка. Для конкурентного ингибирования константу ингибирования (K_i) вычисляли по формуле [241]:

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S]}, \quad K_i = \frac{K_m [I]}{K_m' - K_m}, \quad (2.3)$$

где V – скорость ферментативной реакции, V_{max} – максимальная скорость ферментативной реакции, $[S]$ – концентрация субстрата, $[I]$ – концентрация ингибитора, K_m – константа Михаэлиса, которая равна концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимальной скорости, K_m' – константа Михаэлиса кажущаяся, которая равна концентрации субстрата, при которой скорость реакции в присутствии ингибитора составляет половину максимальной скорости.

Для неконкурентного ингибирования K_i вычисляли по формуле:

$$V = \frac{\frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} [S]}{[S] + K_m}, \quad K_i = \frac{[I]}{\frac{V_{max}}{V_{max'}} - 1}, \quad (2.4)$$

где V – скорость ферментативной реакции, V_{max} – максимальная скорость ферментативной реакции, V_{max}' – максимальная скорость ферментативной реакции в присутствии ингибитора, $[S]$ – концентрация субстрата, $[I]$ – концентрация ингибитора, K_m – константа Михаэлиса.

2.3.6. Определение концентрации белка по методу Лоури

Определение концентрации белка проводилось по методу Лоури [239]. Для определения концентрации белка гомогенат головного мозга мышей разбавляли в 10 раз. В опытную пробирку добавляли 0.1 мл разбавленного белка, 0.8 мл H_2O и 0.1 мл 0.1Н NaOH, а в контрольную – 0.9 мл H_2O и 0.1 мл 0.1 Н NaOH. Для экспериментов готовили: реактив А (0.5% водный раствор $CuSO_4 \cdot 5H_2O$), реактив В (1% водный раствор $Na_2C_4H_4O_6$) и реактив С (2% Na_2CO_3 в 0.1Н NaOH). Затем к каждой пробе добавляли

свежеприготовленный реактив Д (10 мл реактива С+0.1 мл реактива А+0.1 мл реактива В) по 1 мл и выдерживали 10 мин при комнатной температуре, затем используется реактив Фолина – по 0.1 мл в пробы, которые затем инкубировали при 37° С в течение 35 мин. Оптическую плотность образцов измеряли на спектрофотометре при $\lambda=750$ нм. Содержание белка в пробах определяли по калибровочному графику, построенному с использованием бычьего сывороточного альбумина. Для этого готовили серию образцов с содержанием белка от 20 до 400 мкг в 1 мл и строили график зависимости оптической плотности образцов от концентрации белка в пробе.

2.3.7. Электрофизиологический метод patch-clamp

Характер влияния ВРПФ на АМРА рецепторы определяли с помощью электрофизиологического метода patch-clamp. Измерение трансмембранных токов исследуемых нейронов Пуркинье мозжечка головного мозга крыс проводили в конфигурации «whole cell» [242]. Одиночные изолированные нейроны Пуркинье выделяли из мозжечков 12–16-суточных крыс породы Вистар по модифицированному методу Канада с соавторами [243]. Срезы мозжечка толщиной 400–600 мкм помещали в термостатируемую камеру объемом 10 мл в раствор следующего состава: 150 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ CaCl₂, 2 мМ MgSO₄·7H₂O, 10 мМ HEPES, 15 мМ глюкозы (pH 7.42) и инкубировали при температуре 34° С. Через 60 мин буфер заменяли на аналогичный раствор, но содержащий проназу (2 мг/мл) и коллагеназу (1 мг/мл), и срезы мозжечка инкубировали в течение 70 мин при температуре 34° С. После отмывки исходным буфером в течение 20 мин срезы помещали в чашку Петри и разъединяли механическим способом при помощи пастеровской пипетки. Растворы во время выделения нейронов непрерывно барботировали газообразным кислородом при 34° С. Исследуемые нейроны

помещали в рабочую камеру объемом 0.6 мл в буфер А следующего состава: 150 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2.6 мМ CaCl₂, 2 мМ MgSO₄·7H₂O, 10 мМ HEPES, 15 мМ глюкозы (рН 7.36).

Трансмембранные токи вызывали активацией AMPA рецепторов путем аппликации раствора агониста этих рецепторов – каиновой кислоты, методом быстрой суперфузии растворов: в буфер, омывающий нейроны с постоянной скоростью, каждые 2 мин вносили по 30 мкл буфера с агонистом (концентрация агониста $2.5 \cdot 10^{-4}$ М). Регистрацию токов осуществляли при помощи боросиликатных микроэлектродов (сопротивление 2.5–5.5 МОм), заполненных буфером следующего состава: 140 мМ KCl, 11 мМ EGTA, 1 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 10 мМ HEPES, 5 мМ АТР (рН 7.2). Для изучения влияния производных фуллерена на AMPA рецепторы нейроны омывали буфером А, содержащим исследуемое соединение.

Для регистрации токов использовали установку ЕРС-9 (НЕКА, Германия). Запись токов осуществляли на компьютере при помощи лицензионной программы Pulse (НЕКА). Для обработки результатов использовали программу Pulsefit (НЕКА). Вычисляли среднее арифметическое для каждой концентрации исследуемого вещества и их доверительные интервалы ($M \pm m$) по результатам не менее пяти отдельных экспериментов.

2.3.8. Изучение радиолигандного связывания с ионотропными глутаматными NMDA рецепторами

Влияние исследуемых веществ на радиолигандное связывание с NMDA рецепторами изучается с помощью модифицированного метода [240]. Используются два радиоактивных лиганда: [³H]МК-801 (дизоцилпин) с удельной активностью 210 Ки/моль, связывающийся со всеми выделенными

NMDA рецепторами, и [^3H]ифенпродил с удельной активностью 79 Ки/моль, связывающийся только с NMDA рецепторами, содержащими NR2B субъединицы.

Образцы для радиолигандного анализа готовили по описанному методу [245]. Ткань гиппокампа измельчали в гомогенизаторе Поттера («тефлон-стекло») в буфере № 1 (5 мМ HEPES/4.5 мМ Трис буфера, pH 7.6), содержащем 0.32 М сахарозы, в соотношении 1 г ткани:10 мл буфера. Гомогенат разбавляли буфером для исследования № 2 (5 мМ HEPES/4.5 мМ Трис буфера, pH 7.6) в соотношении 1:50 и центрифугировали 10 мин при 1000g. Затем отбирали супернатант и вновь центрифугировали 20 мин при 25000g. Осадок гомогенизировали в буфере № 2 в соотношении 1:50 и центрифугировали 20 мин при 8000g. Супернатант и его мягкий, зыбкий надосадочный слой отбирали и центрифугировали 20 мин при 25000g. Полученный осадок суспендировали в буфере № 3 (5 мМ HEPES/4.5 мМ Трис буфера, pH 7.6), содержащем 1 мМ Na_4EDTA , и суспензию вновь центрифугировали. Такая процедура отмывки проводится четыре раза, причем при последней отмывке Na_4EDTA исключается из состава. Конечный осадок ресуспендировали в буфере № 2 в соотношении 1:5 и хранили в жидком азоте. Реакционная смесь (конечный объем 0.5 мл) содержит 200 мкл буфера № 2, 50 мкл 50 нМ раствора меченого лиганда и 250 мкл белковой суспензии. Неспецифическое связывание определяется в присутствии 50 мкл немеченого лиганда.

Реакционная смесь инкубируется при комнатной температуре в течение 2 ч. По окончании инкубации пробы фильтруются через стекловолокнистые фильтры GF/B (Whatman), предварительно смоченные в 0.3% полиэтиленамине в течение 2 ч при 4° С. Каждая пробирка промывается один раз холодным буфером № 2, затем фильтры промываются три раза тем же буфером. Фильтры сушатся на воздухе и переносятся в сцинтилляционные флаконы, в которые добавляется по 5 мл сцинтилляционной жидкости,

содержащей 4 г дифенилоксазола (PPO), 0.2 г дифенилоксазоилбензола (POPOP) и 1 л толуола. Радиоактивность определяли на сцинтилляционном счетчике TriCarb 2800 TR (PerkinElmer, Packard, США) с эффективностью счета около 65%.

Исследование влияния изучаемых соединений на связывание [^3H]МК-801 или [^3H]ифенпродила с мембранами гиппокампа крысы проводили при добавлении в инкубационную среду 50 мкл биологически активных соединений в диапазоне концентраций 10^{-9} - 10^{-6} М.

По результатам ингибирования рассчитывали IC_{50} для изученных соединений с помощью программы GraphPad Prism 4 Demo.

2.3.9. Изучение влияния ВРПФ на поведение лабораторных животных в тесте «Открытое поле»

Эксперименты в тесте «Открытое поле» проводились на мышах самцах линии C57B1/6 в возрасте 3-4 месяцев. Мыши содержались в виварии ИФАВ РАН в стандартных условиях. Световой цикл состоял из 12 ч дня и 12 ч ночи, день начинался в 8 ч и заканчивался в 20 ч. Животные получали экструдированный комбикорм ПК-120-1 для лабораторных крыс и мышей.

Модифицированный тест «Открытое поле» [246] проводили в условиях автоматизированной фотосенсорной установки мониторинга двигательной активности и ориентировочного поведения животных TruScan (Coulbourn, USA). Установка представляет собой квадратную камеру с основанием 30×30 см, выполненную из прозрачного оргстекла, с высотой стенок 35 см. Пол серого цвета условно разделен на 64 квадрата и имеет 16 отверстий диаметром 20 мм. Данная компьютеризированная система позиционирования позволяет отслеживать движение животного в трех осях, что необходимо для

определения эффективности биологически активного вещества (БАВ) сразу по нескольким параметрам, характеризующим поведение мышей. Выделяли четыре основных параметра: двигательная активность, тревожность, ориентировочное поведение, исследовательская реакция. Оценивали следующие показатели: общий путь (см), время отдыха (с), дистанции движения по периметру камеры и в центре (см), время нахождения в периметре камеры и в центре (с), количество вертикальных стоек и количество обследованных отверстий – «норок». Визуально оценивали «минимальное», «обычное» или «избыточное» количество оставленных на полу камеры урины и кала. Исследуемые вещества вводили за 1 ч до тестирования внутривентрикулярно с помощью зонда, дозы подбирали специально для каждой группы соединений. В течение 3 мин регистрировали показатели вертикальной и горизонтальной двигательной активности.

2.3.10. Изучение влияния ВРПФ на долговременную память животных в тесте «Узнавание новой локализации известного объекта»

Тест основан на том факте, что мыши спонтанно обследуют новый объект или новую локализацию объекта больше времени, чем известный объект или известную локализацию объекта [247, 248].

Эксперименты проводились на мышах самцах линии С57В1/6 в возрасте 3 месяцев, массой 23-25 г. Мыши содержались в виварии ИФАВ РАН в стандартных условиях в свободном доступе к воде и корму; поддерживался режим освещения «день-ночь» (12 часовой цикл), день начинался в 6 ч и заканчивался в 18 ч. Перед проведением опытов животных поместили в двухнедельный карантин. Экспериментальные группы формировали по 10 особей, одна из них – группа контрольных животных.

Экспериментальная установка представляет собой камеру наблюдения, изготовленную из непрозрачного органического стекла белого цвета

размером 48×38×30 см. В качестве объектов обследования использовали стеклянные флаконы коричневого цвета диаметром 2.7 см и высотой 5.5 см. За 2–3 мин до начала эксперимента камеру и объекты обследования протирали 85% спиртом. Животных всегда помещали в центр камеры.

Ознакомление с поведенческой камерой (привыкание)

В первый день каждое животное помещали на 10 мин в пустую, предварительно обработанную спиртом, экспериментальную установку для ознакомления.

Тренировка

Через 24 ч этих же мышей приносили в исследовательскую комнату, 20–30 мин акклиматизировали, затем за 40 мин до начала тренировки вводили раствор исследуемого вещества однократно зондом в желудок (дозы подбирали для каждой группы соединений в отдельности). Объем вводимого соединения корректировался в соответствии с массой тела. Каждое животное помещали в поведенческую камеру, на дно которой ставили по диагонали на фиксированном расстоянии два одинаковых объекта для обследования. Регистрировали время обследования каждого из объектов в отдельности (приближение носа мыши менее чем на 2 см к объекту), учитывая, что общее время тренировки каждого животного 10 мин.

Тестирование

Тестирование проводили через 48 ч после тренировки. Для этого после акклиматизации животных помещали на 1 мин в камеру для повторного ознакомления. Менялась локализация одного из объектов: один объект оставляли в известной для животного локализации, а другой помещали в новое для животного место (объекты располагались в линию). С помощью двух электронных секундомеров в течение 10 мин регистрировали время обследования отдельно каждого объекта животным с точностью до 0.1 с. За поведением животных наблюдали через зеркало.

В связи с тем, что в данном тесте наблюдаются значительные колебания времени обследования объектов между животными, вычислялся процент времени обследования для каждой мыши по формуле:

$$t=[t_{н.л.}/(t_{и.л.}+t_{н.л.})]\cdot 100\%, \quad (2.5)$$

где t – время обследования объекта, $t_{н.л.}$ – время обследования объекта в новой локализации, $t_{и.л.}$ – время обследования объекта в известной локализации. Общее время, затраченное на обследование двух объектов, принимается за 100%.

2.3.11. Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка результатов исследований проводилась с использованием статистического пакета программы Microsoft Excel. Достоверность различий определялась по t-критерию Стьюдента [249]. Результаты считались достоверными при уровне значимости 95% ($p \leq 0.05$). Построение графиков осуществлялось также с помощью программы Microsoft Excel. Статистическую обработку данных поведенческих тестов вели с помощью программы Statistica 6.0, уровень достоверности определяли либо по t-критерию Стьюдента, либо по непараметрическому U-критерию Манна-Уитни.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

Согласно литературным данным, приведенным в главе 1, существуют различные теории возникновения и развития БА. Исследователями выделен ряд наиболее важных процессов, сопровождающих нейродегенерацию, а также терапевтические мишени, воздействуя на которые возможно замедлить ход развития заболевания, однако до сих пор не ясно, какие события на молекулярном и клеточном уровне являются главными, а какие сопутствующими. Так, наиболее важными патологическими процессами при БА являются: глутамат-опосредованное нейровоспаление, окислительный стресс, накопление β -амилоидных фибрилл, активация митохондриального фермента окислительного дезаминирования биогенных аминов MAO-B и гибель нейронов.

Современные клинические препараты оказывают только симптоматическое действие. В основном они действуют на одну конкретную терапевтическую мишень. Как показывает практика, их применение не приводит к выздоровлению, а лишь на некоторое время замедляет прогрессирование заболевания, не защищая нейроны от гибели [76, 77, 250]. Вероятно, терапевтического эффекта можно достигнуть только путем создания препарата, действующего на несколько терапевтических мишеней БА одновременно.

В ходе поиска решения данной проблемы в последнее время значительно возрос интерес исследователей к водорастворимым полизамещенным производным фуллеренов, особенно к гибридным структурам на их основе, в которых в качестве аддендов к фуллереновому

сфероиду присоединяются фармакологически активные группировки. Согласно литературным данным, причиной такого интереса является широкий спектр биологической активности, присущий фуллереновым производным, в том числе и нейтропротекторной.

В предлагаемой работе оценивалось влияние ВРПФ на терапевтические мишени и процессы БА по следующим критериям:

1. Ингибирование каталитической активности митохондриального фермента MAO-B, так как этот фермент осуществляет метаболизирование дофамина в мозге до гомованилиновой кислоты и его ингибирование позволяет пролонгировать эффекты синаптического дофамина, что необходимо для активации когнитивных процессов [207].
2. Антиоксидантная активность и, в частности, способность перехватывать свободные радикалы. В ряде работ показано, что образование свободных радикалов при нейродегенерации является одним из важнейших факторов развития заболевания [174-176]. Доказано существование тесной взаимосвязи между снижением содержания митохондриальной супероксиддисмутазы (Cu, Zn-SOD) и интенсификацией процесса генерации супероксидов при БА [251]. Роль SOD в этом процессе объясняется ее основной функцией – инактивацией супероксидных анион-радикалов.
3. Предотвращение агрегации β -амилоидных белков, так как накопление β -амилоидных фибрилл препятствует передаче сигналов синапсом, что ведет к ухудшению памяти [91].
4. Позитивная модуляция ионотропных глутаматных AMPA рецепторов нейронов ЦНС млекопитающих, так как она запускает механизм экспрессии генов, отвечающих за синтез нейротропинов (факторов роста, регулирующих выживание и функционирование нейронов), а также свидетельствует о потенциальной когнитивно-стимулирующей активности соединения [121, 123].

5. Снижение активности ионотропных глутаматных NMDA рецепторов нейронов ЦНС млекопитающих, так как их гиперактивация ведет к нейротоксичности [141].

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».

3.1.1. Исследование взаимодействия ППФ с фосфолипидной мембраной методом флуоресцентных зондов

При исследовании спектра биологического действия химических соединений первоначально изучается вопрос о способности этих соединений проникать через биологические мембраны и взаимодействовать с ними. По характеру тушения флуоресценции зондов, локализованных преимущественно в гидрофильной или гидрофобной областях фосфолипидной мембраны, в присутствии ППФ можно будет судить о локализации исследуемых производных фуллерена в модельных мембранах фосфотидилхолиновых липосом. В ряде источников показано, что производные фуллеренов обладают уникальными мембранотропными свойствами [4-6, 233]. Существуют работы, в которых показано, что фуллерены и их производные являются эффективными тушителями возбужденных состояний различных хромофоров [233, 252-254].

Рассматриваемые ППФ имеют в своей структуре сфероид фуллерена C₆₀, а также несколько аддендов: ППФ I и III – пять отрицательно заряженных за счет ионизации карбоксильных групп, а ППФ II – более

двадцати недиссоциирующих гидроксильных групп, а также два отрицательных заряда на сфероиде фуллерена (таблица 2.1). Присутствие зарядов оказывает существенное влияние на способность ППФ встраиваться в структуру клеточных мембран и взаимодействовать с ферментами, оказывать влияние на их каталитическую активность, а также ингибировать процессы ПОЛ биологических мембран. В настоящей работе для оценки характера взаимодействия ППФ с фосфолипидной мембраной исследовалось тушение флуоресценции зондов 2,7-дибромпрофлавина и пирена в модельных мембранах фосфатидилхолиновых липосом.

Краситель 2,7-дибромпрофлавин – положительно заряженный зонд, который локализуется на границе раздела водной и липидной фаз и взаимодействует с фосфолипидной мембраной в области полярных головок фосфолипидов. Он обладает высокой интенсивностью флуоресценции как в водных растворах, так и в составе фосфотидилхолиновых липосом. Пирен – неполярный зонд, локализующийся в области жирнокислотных остатков фосфолипидов мембран. Он также обладает легко регистрируемой флуоресценцией в неполярных средах. Ряд исследователей использовали его для изучения более медленных диффузионных процессов в составе липосом [3, 255]. Спектральные характеристики зондов представлены в работе [255].

Согласно литературным данным [255-257], тушение флуоресценции возбужденных зондов в водных растворах и в модельных мембранах молекулами тушителей может совершаться за счет разных механизмов (в результате динамического взаимодействия хромофора и тушителя, при образовании оптического комплекса зонд-тушитель и других).

В работе было обнаружено, что при введении производных фуллерена C_{60} (ППФ I-III), имеющих отрицательные заряды (противоположные заряду люминесцентного зонда) в водный раствор буфера трис-HCl (pH=7.2, 0.02 M) или суспензию фосфотидилхолиновых липосом, содержащих молекулы 2,7-

дибромпрофлавина, происходит эффективное уменьшение интенсивности флуоресценции (рисунки 3.1, 3.2).

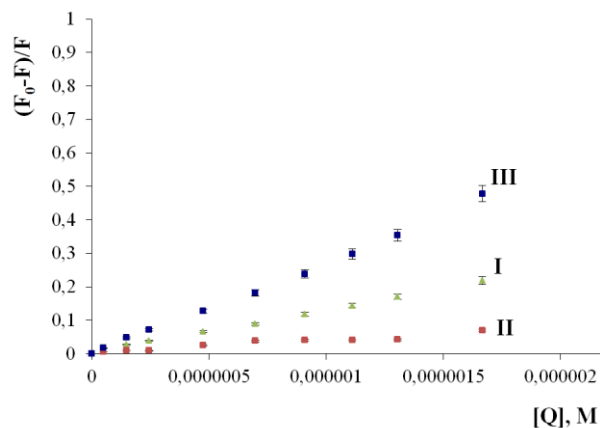
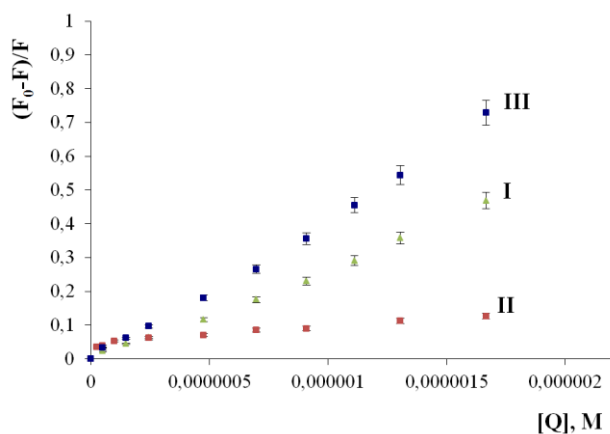


Рисунок 3.1. Тушение флуоресценции 2,7-дибромпрофлавина в буфере трис-НСІ (рН=7.2, 0.02 М) в присутствии ППФ I-III. $K_c(I)=2.85 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$; $K_c(II)=0.60 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ и $K_c(III)=4.50 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$.

Рисунок 3.2. 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 $K_c(III)=2.85 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$.

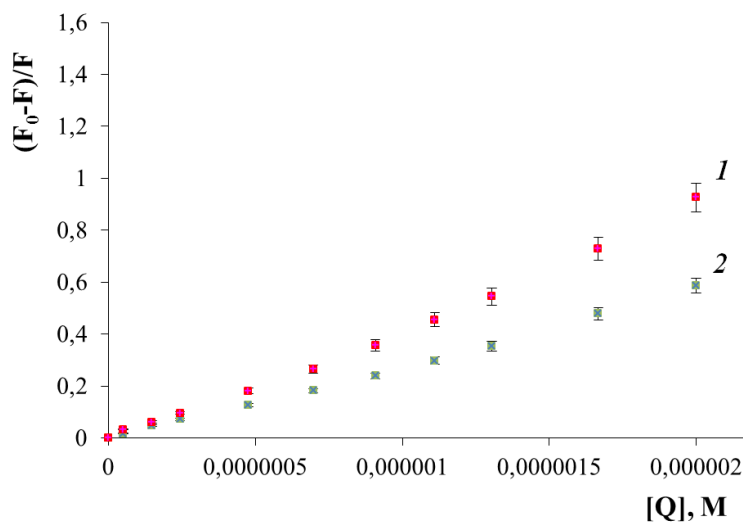


Рисунок 3.3. Тушение флуоресценции 2,7-дибромпрофлавина в присутствии ППФ III: *1* – в буфере трис-НСІ (рН=7.2, 0.02 М); *2* – в суспензии фосфотидилхолиновых липосом.

В случае динамического взаимодействия возбужденных молекул зонда с молекулами тушителя в растворе сокращается время жизни возбужденного состояния люминофора, что приводит к уменьшению квантового выхода флуоресценции и, соответственно, интенсивности флуоресценции. Этот процесс описывается уравнением Штерна-Фольмера:

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_0} + k_q [Q], \quad (3.1)$$

где τ – время жизни люминесценции в присутствии тушителя, τ_0 – время жизни люминесценции в отсутствие тушителя, k_q – бимолекулярная константа тушения и $[Q]$ – концентрация тушителя [255-257]. Видно, что скорость тушения люминесценции $1/\tau$ будет линейно возрастать при повышении концентрации тушителя. Константа тушения k_q определяется из наклона этой зависимости. Уравнение Штерна-Фольмера может применяться в виде различных модификаций [258].

Константа тушения k_q пропорциональна диффузионной константе k_d (константе скорости соударений), которую можно найти, используя уравнение Смолуховского:

$$k_d = \frac{4\pi N_A}{1000} (D_D + D_A)(R_D + R_A), \quad (3.2)$$

где N_A – число Авогадро, D_D и D_A – коэффициенты диффузии донора (люминофора) и акцептора (тушителя), R_D и R_A – ван-дер-ваальсовы радиусы донора и акцептора [255, 256]. Коэффициент диффузии сферической частицы D зависит от ее радиуса R , вязкости среды η и температуры T , что описывается уравнением Стокса-Эйнштейна [255, 256]:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R}, \quad (3.3)$$

где k – константа Больцмана.

Как известно, при динамических столкновениях в растворе молекул тушителей и возбужденных хромофоров регистрация процессов тушения флуоресценции (с $\tau_0 \sim 1$ нс) возможна при молярных концентрациях тушителей. Так как тушение флуоресценции 2,7-дибромпрофлавина (время жизни которого ~ 1 нс) происходит при концентрациях производных фуллерена $C_{60} \sim 10^{-6}$ М (рисунки 3.1, 3.2), то можно предположить, что дезактивация возбужденного состояния красителя происходит в результате образования долгоживущего комплекса зонд-ППФ.

В качестве параметра, характеризующего прочность комплекса зонд-ППФ в различных средах, используется константа равновесия K_c , определяемая из наклона касательной к экспериментальной зависимости в начале координат согласно уравнению Штерна-Фольмера. Схема реакции в этом случае:



где $[L]$ – концентрация люминесцирующего зонда, $[Q]$ – концентрация тушителя, $[LQ]$ – концентрация комплекса зонд-тушитель, k_1 – бимолекулярная константа образования комплекса LQ , k_{-1} – мономолекулярная константа распада комплекса LQ . Отсюда константа равновесия образования комплекса K_c определяется как:

$$K_c = k_1 / k_{-1} = [LQ] / [L][Q] \quad (3.5)$$

Если долю молекул люминесцирующего зонда, участвующих в образовании комплекса LQ , обозначить через $\alpha = \frac{F_0 - F}{F_0}$, где F_0 – интенсивность люминесценции зонда в отсутствие тушителя, F – интенсивность люминесценции зонда при концентрации тушителя $[Q]$, получаем уравнение:

$$\frac{\alpha}{1 - \alpha} = \frac{F_0 - F}{F} = K_c([Q] - \alpha[L]) \approx K_c[Q] \quad (3.6)$$

при $[Q] \gg \alpha[L]$.

Для ППФ I-III были определены константы равновесия образования комплекса 2,7-дибромпрофлавин-ППФ K_c (рисунки 3.1, 3.2) в водном растворе трис-HCl: $2.85 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, $0.60 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ 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. Полученный результат свидетельствует о включении ППФ в фосфатидилхолиновую мембрану, а именно в сайты локализации зонда 2,7-дибромпрофлавина. Как видно из рисунков 3.1 и 3.2, наиболее прочные комплексы (как в водном растворе, так и в липосомах) образуются между зондом и ППФ III.

Для исследования взаимодействия ППФ с неполярными сайтами мембран изучалось влияние ППФ на флуоресценцию гидрофобного зонда пирена. Время жизни возбужденного синглетного состояния пирена составляет $\sim 100 \text{ нс}$ [255], что примерно в сто раз больше, чем время жизни 2,7-дибромпрофлавина. Благодаря этому представляется возможным исследовать более медленные диффузионные процессы в структуре модельных фосфолипидных мембран.

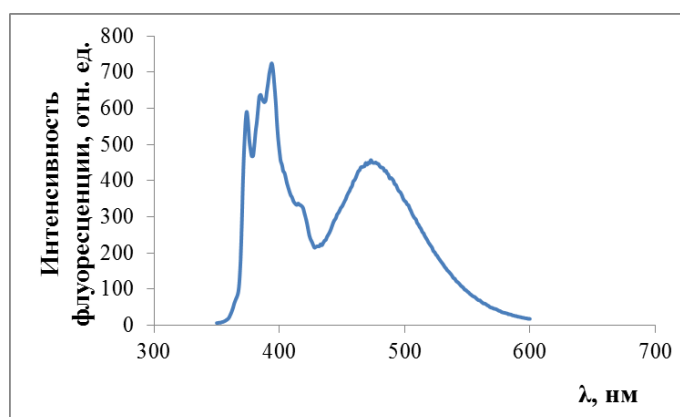


Рисунок 3.4. Спектр флуоресценции пирена в суспензии фосфатидилхолиновых липосом.

Известно, что молекулы пирена в возбужденном состоянии могут образовывать эксимеры (димеры возбужденных молекул зонда с

невозбужденными молекулами зонда). Спектр флуоресценции эксимера сдвинут в длинноволновую область по сравнению с мономером [255].

На спектре флуоресценции пирена (рисунок 3.4) отчетливо видны два пика: одному (при $\lambda=394$ нм) соответствует мономерная форма этого зонда, а второму (при $\lambda=475$ нм) – эксимерная. При добавлении ППФ наблюдается эффективное тушение флуоресценции пирена с сохранением соотношения интенсивности флуоресценции между пиками его мономерной и эксимерной формы. Показано, что при титровании образцов фосфотидилхолиновых липосом, в структуру которых был встроен зонд пирен, тушение флуоресценции хромофора наблюдается уже при низких концентрациях ППФ (10^{-6} – 10^{-5} М), откуда следует, что тушение осуществляется не за счет динамических взаимодействий, а путем образования долгоживущих статических комплексов пирен-ППФ (рисунок 3.5). При этом пирен находится как в мономерной, так и в эксимерной форме. Для анализа экспериментальных данных можно использовать, как и в случае с водорастворимым зондом 2,7-дибромпрофлавином, формулу 3.6, чтобы определить константы равновесия K_c комплексов пирен-ППФ (для мономерной и эксимерной составляющей спектров флуоресценции пирена). В настоящей работе определяли K_c для мономеров пирена, так как они локализованы в более вязких (или менее полярных) сайтах мембраны, в которых возможность столкновения возбужденных молекул зонда с невозбужденными в значительной мере затруднена. Значения констант равновесия образования комплекса зонд-ППФ K_c для ППФ I-III (рисунок 3.5): $0.37 \cdot 10^5 \text{ М}^{-1}$, $0.53 \cdot 10^5 \text{ М}^{-1}$ и $0.59 \cdot 10^5 \text{ М}^{-1}$, соответственно. Довольно высокие значения констант равновесия указывают на эффективное взаимодействие ППФ с молекулами пирена. Так как молекула пирена не имеет заряда и является ароматически насыщенной структурой, по всей вероятности, взаимодействие пирена с ППФ в значительной степени осуществляется за счет прямого комплексования ароматической структуры пирена со

сфероидом фуллерена или его аддендами именно в гидрофобных сайтах мембраны.

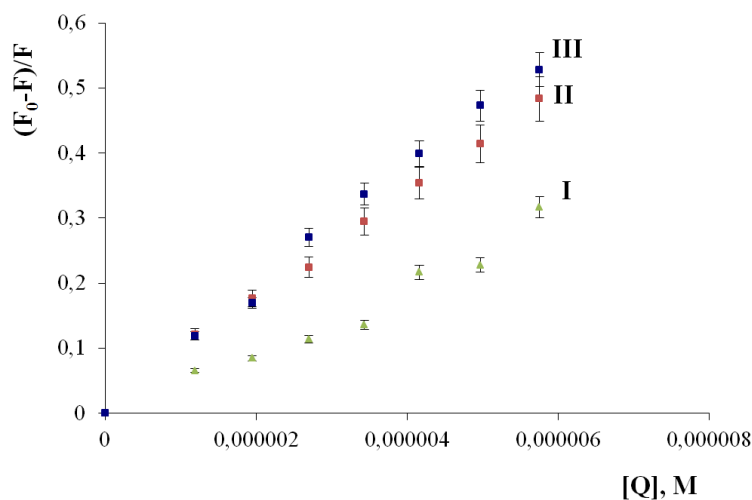


Рисунок 3.5. Тушение флуоресценции пирена (при $\lambda=394$ нм) в суспензии фосфатидилхолиновых липосом в присутствии ППФ I-III. $K_c(I)=0.37 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, $K_c(II)=0.53 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ и $K_c(III)=0.59 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$.

Таким образом, по характеру тушения флуоресценции водорастворимого зонда 2,7-дибромпрофлавина и гидрофобного зонда пирена производными фуллерена C_{60} I-III установлено, что ППФ проникают в фосфолипидные мембраны и локализуются как в области полярных головок, так и в области жирнокислотных остатков фосфолипидов модельных мембран [6].

3.1.2. Влияние ППФ на активность MAO-B и свободнорадикальное окисление липидов

Согласно литературным данным, одной из терапевтических мишеней БА является MAO-B, при этом ингибирование MAO-B в сочетании с антирадикальной активностью является важным критерием отбора потенциальных препаратов для лечения БА. Известно, что MAO-B является одним из ключевых ферментов, обеспечивающих метаболизирование

дофамина в мозге. Ингибирование данного фермента позволяет пролонгировать эффекты синаптического дофамина, что и определяет использование ингибиторов МАО-В при терапии БА и других НЗ [207]. Недавние исследования группы авторов [259] показали, что реактивные астроциты, характерные для нервной ткани пациентов с БА, при помощи активной работы МАО-В продуцируют избыточное количество тормозного нейромедиатора ГАМК, который снижает синаптическую передачу, что ведет к ухудшению памяти. Используя ингибитор фермента МАО-В, авторы добились снижения выработки ГАМК и улучшения памяти мышей с моделью БА.

В рамках решения задач диссертационной работы исследовалось действие ППФ I-III на каталитическую активность МАО-В и процесс свободнорадикального окисления липидов. В результате проведенных тестов, установлено, что ППФ I и II являются эффективными ингибиторами МАО-В и обладают антиоксидантной активностью (таблица 3.1). ППФ III не действует на каталитическую активность МАО-В, но также обладает антиоксидантными свойствами (таблица 3.1). Для оценки эффективности соединений как антиоксидантов в работе использовали ионол.

Как видно из таблицы 3.1, исследуемые ППФ различаются по действию на МАО-А: ППФ I ингибирует МАО-А, ППФ II активирует МАО-А, а соединение сравнения ППФ III практически не влияет на активность фермента. Полученный результат свидетельствует о потенциальной способности ППФ I оказывать антидепрессивный эффект и способности ППФ II снимать повышенное возбуждение нервной системы, что может быть важно при лечении БА с симптомами депрессии или, наоборот, повышенного возбуждения.

Таблица 3.1. Влияние ППФ на процесс ПОЛ и каталитическую активность MAO ($p < 0.05$ относительно контроля) в гомогенате головного мозга мышей.

Соединение	Концентрация MDA, мкМ/мг белка	Активность фермента, мМ NH ₃ /мг белка		ЛД ₅₀ [*] , мг/кг
		MAO-B	MAO-A	
Контроль	2.2±0.1	3.2±0.2	1.7±0.2	
I [10 ⁻⁵ М]	1.0±0.1	1.8±0.2	0.9±0.2	>600
II [10 ⁻⁵ М]	1.4±0.1	1.9±0.2	2.9±0.3	1800
III [10 ⁻⁵ М]	1.2±0.1	3.5±0.3	2.0±0.2	300
Ионол	0.6±0.0			

* – острая токсичность соединений [225].

Для установления механизма взаимодействия ППФ I и II с MAO-B в предлагаемой работе изучалась кинетика их влияния на реакцию дезаминирования бензиламина, катализируемую этим ферментом, 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 3.6 и 3.7, 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.

Как было показано выше, ППФ I-III обладают выраженной антиоксидантной активностью. Однако снижение концентрации MDA в присутствии этих соединений свидетельствует о том, что они ингибируют процесс пероксидного окисления липидов, но не позволяет определить механизм этого процесса. Из литературных данных известно, что одним из существенных факторов развития БА является процесс образования свободных радикалов [260]. Авторы работы [161] представили

доказательства *in vitro* и на трансгенных мышинных моделях БА в пользу гипотезы о том, что нейротоксичность β -амилоидного белка, из которого образованы фибриллы, опосредована свободными радикалами. Важным фактом, подтверждающим тесную взаимосвязь между процессом ПОЛ и развитием нейродегенеративных патологий, является зависимость между снижением содержания митохондриальной супероксиддисмутазы (Cu, Zn-СОД) и обострением БА, установленная в работе [251]. Таким образом, способность терапевтически перспективных веществ к захвату активных радикалов является необходимым свойством для потенциальных препаратов для лечения БА.

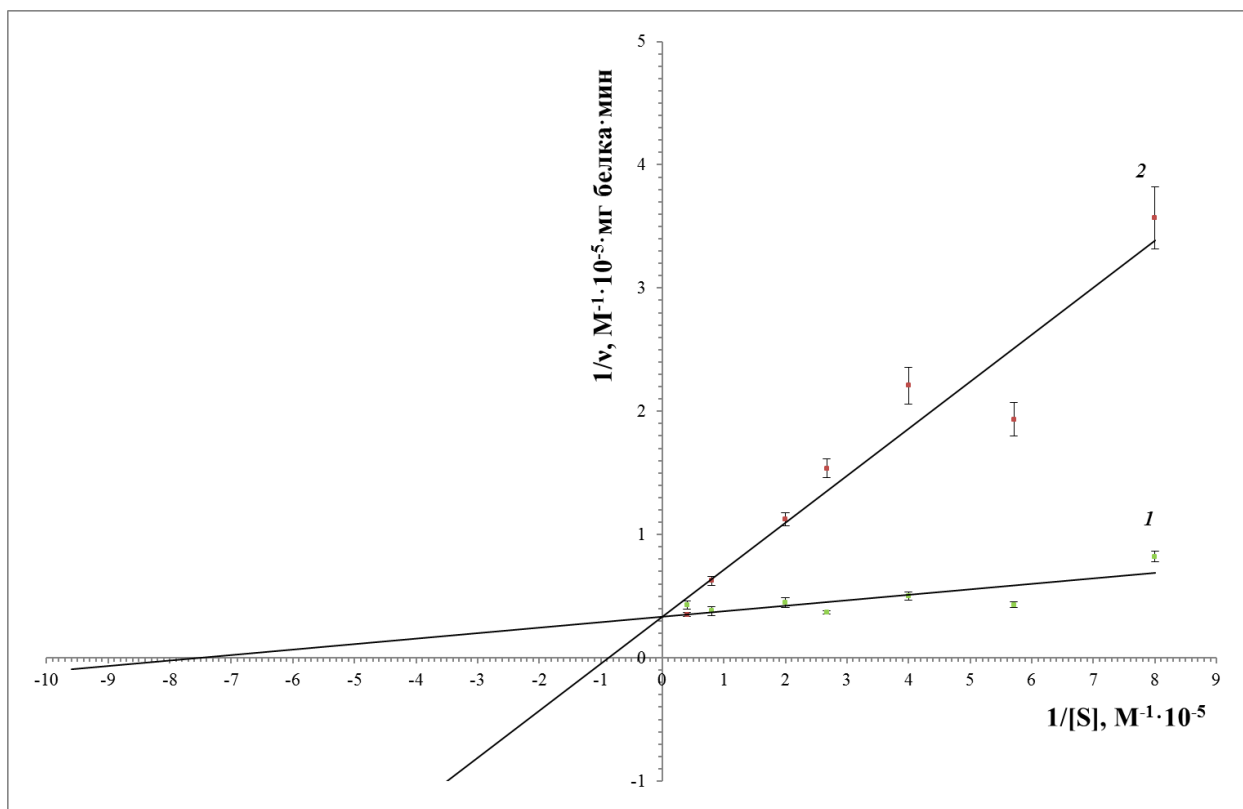


Рисунок 3.6. Конкурентное ингибирование реакции дезаминирования бензиламина, катализируемой моноаминоксидазой В, при действии ППФ I. 1 – контроль (в отсутствии ингибитора); 2 – в присутствии ППФ I в концентрации $2.5 \cdot 10^{-6}$ М. $K_i = 0.34 \cdot 10^{-6}$ М. [S] – концентрация бензиламина (субстрата MAO-B); v – скорость ферментативной реакции.

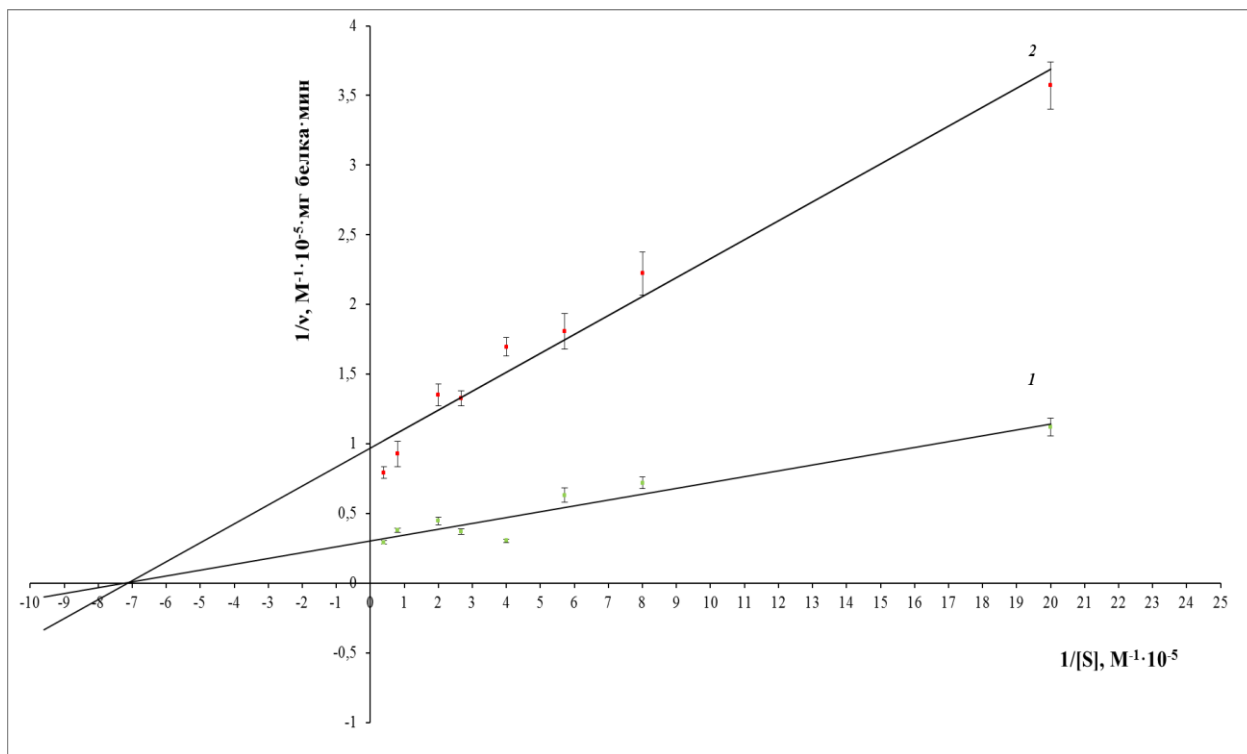


Рисунок 3.7. Неконкурентное ингибирование реакции дезаминирования бензиламина, катализируемой моноаминоксидазой В, при действии ППФ II. 1 – контроль (в отсутствии ингибитора); 2 – в присутствии ППФ II в концентрации $2.5 \cdot 10^{-6}$ М. $K_i = 1.12 \cdot 10^{-6}$ М. [S] – концентрация бензиламина (субстрата MAO-B); v – скорость ферментативной реакции.

В настоящей работе антирадикальная активность ППФ в образцах гомогената головного мозга мышей изучалась с помощью метода ХЛ. Как видно из рисунка 3.8, все исследуемые ППФ обладают способностью перехватывать свободные радикалы. Для оценки эффективности соединений использовался известный антиоксидант ионол.

Как видно из рисунка 3.8, наиболее активным оказалось ППФ II: оно в концентрации 10^{-5} М уменьшает светосумму, а следовательно, содержание свободных радикалов в образцах на 28% (в отличие от ионола, который уменьшает светосумму на 18 %). Очевидно, антирадикальная активность ППФ определяется в основном акцепторными свойствами сфероид фуллерена.

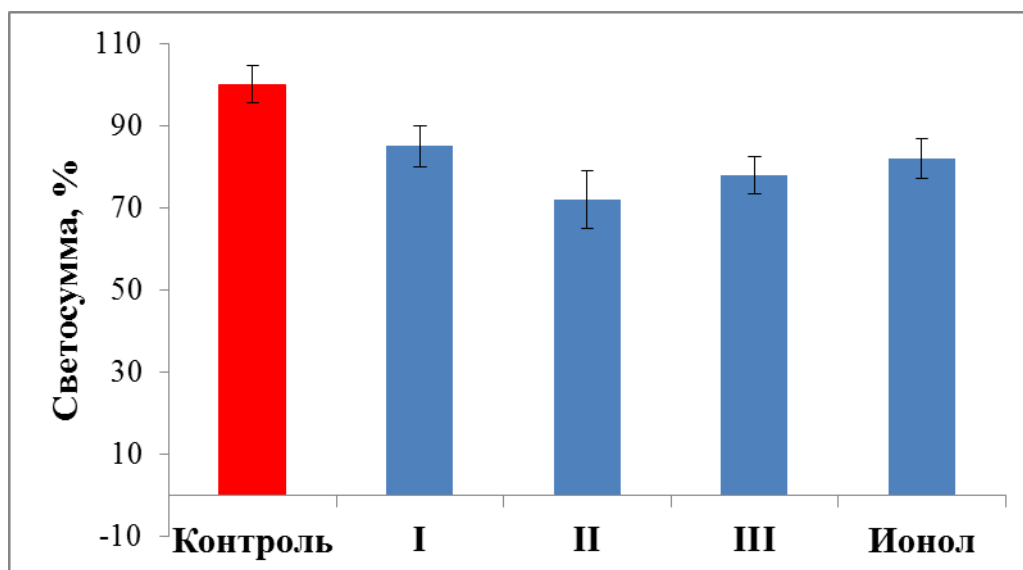


Рисунок 3.8. Изменение светосуммы люминесценции люминола при действии ППФ I-III и ионола в концентрации 10^{-5} М в гомогенате головного мозга мышей; $p < 0.05$ относительно контроля. В качестве инициатора использовали ТБГП.

Еще одним важным критерием развития БА является агрегация β -амилоидных белков и, как было показано в работе [219], аналоги ППФ I и II проявляют высокую антиамилоидную активность: в экспериментах *in vitro* они предотвращают образование фибрилл β -амилоида и разрушают зрелые фибриллы.

В работе [225] показано, что ППФ I и III мало токсичны в отношении объекта исследований – мыши, а ППФ II практически нетоксично (таблица 3.1).

Совокупность трех критериев: ингибирование MAO-B, антирадикальная активность и предотвращение агрегации β -амилоидных белков позволяют предположить, что ППФ I и II могут быть рекомендованы для продолжения углубленного изучения их молекулярных механизмов действия на терапевтические мишени БА.

3.1.3. Влияние ППФ на функциональное состояние ионотропных глутаматных AMPA и NMDA рецепторов

Как говорилось выше, AMPA и NMDA рецепторы относятся к ионотропным глутаматным рецепторам ЦНС млекопитающих. Глутаматные рецепторы являются посредниками в большинстве случаев возбуждающей нейротрансмиссии в ЦНС млекопитающих и поэтому играют важнейшую роль в процессах передачи информации в норме, принимают активное участие в когнитивных процессах, а также в патогенезе целого ряда нейродегенеративных и психоневрологических заболеваний. Аномальная глутаматергическая активность и изменение Ca^{2+} -гомеостаза, связанные с нарушениями функций постсинаптических рецепторов, приводят к повреждению нейронов и их гибели, а также к когнитивным нарушениям, вызывающим деменции [261].

Благодаря тому, что позитивные модуляторы AMPA рецепторов усиливают синаптическую передачу (увеличивают амплитуду и длительность возбуждающих постсинаптических потенциалов) и способствуют формированию и улучшению памяти (формированию и усилению процесса долговременной потенциации, который является физиологическим эквивалентом памяти), они представляют интерес для исследователей в области медицинской химии и фармакологии с точки зрения создания препаратов для терапии НЗ [262, 263].

Из выше сказанного становится очевидной важность изучения влияния исследуемых водорастворимых производных фуллерена C_{60} на функциональное состояние AMPA рецепторов для оценки способности ППФ к положительному влиянию на память. В предлагаемой работе электрофизиологическим методом patch-clamp было исследовано влияние ППФ на амплитуду каинат-вызванных токов AMPA рецепторов (рисунок 3.9).

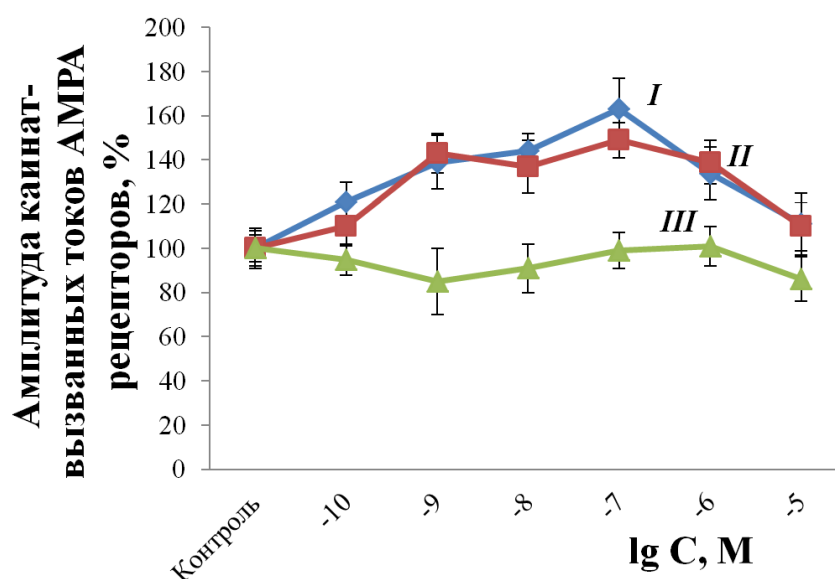


Рисунок 3.9. Действие ППФ I-III на амплитуду каинат-вызванных токов AMPA рецепторов нейронов Пуркинье мозжечка крыс ($p < 0.05$). Примечание: по оси абсцисс – логарифм концентрации соединений в молях.

Как видно из рисунка 3.9, ППФ I вызывает позитивную модуляцию ответов AMPA рецепторов в нейронах Пуркинье: каинат-вызванные токи усиливаются на 21%, начиная с концентрации 10^{-10} М. Самого высокого значения потенциация достигает при концентрации ППФ I 10^{-7} М: в среднем – 63%. Дальнейшее увеличение концентрации ППФ приводит к уменьшению потенцирующего эффекта, в концентрации 10^{-5} М потенциация токов составляет 11% по отношению к контролю. Таким образом, потенциация каинат-вызванных токов в присутствии ППФ I имеет куполообразную форму (рисунок 3.9).

ППФ II также потенцирует ответы AMPA рецепторов (рисунок 3.9). Начиная с концентрации 10^{-10} М, соединение вызывает позитивную модуляцию ответов AMPA рецепторов в нейронах Пуркинье на 10%, при концентрациях 10^{-9} М и 10^{-8} М – в среднем на 40%. Максимального значения (49%) потенциация достигает при концентрации ППФ II 10^{-7} М. При дальнейшем увеличении концентрации соединения потенциация

уменьшается и при концентрации 10^{-5} М достигает в среднем 10% по отношению к контролю.

В случае действия соединения сравнения ППФ III потенциации токов не происходит при всех исследуемых концентрациях вещества. При концентрации соединения 10^{-9} М амплитуда каинат-вызванных токов AMPA рецепторов уменьшается в среднем на 25% по отношению к контролю (рисунок 3.9).

Таким образом, ППФ I и II в диапазоне концентраций 10^{-10} - 10^{-5} М вызывают позитивную модуляцию ответов AMPA рецепторов, что свидетельствует о потенциальном когнитивно-стимулирующем действии этих соединений, позволяющем рассматривать их как перспективные для дальнейших исследований соединения. Соединение сравнения ППФ III потенциации токов не вызывает.

Следует отметить, что, согласно данным работы [264], современный лекарственный препарат мемантин значительно слабее потенцирует активность AMPA рецепторов лишь в небольшой группе нейронов Пуркинье мозжечка крыс, в то время как ППФ I и II стабильно увеличивают амплитуду каинат-вызванных токов AMPA рецепторов во всех исследуемых нейронах с максимумом потенциации от 50 до 70%.

Исходя из литературных данных, ионотропные глутаматные NMDA рецепторы вовлечены в большой степени в процессы развития мозга при эмбриогенезе, обучения млекопитающего [103, 104], формирования памяти и формы синаптической пластичности [118]. Приток Ca^{2+} через NMDA рецептор отвечает за опосредованные изменения синаптической пластичности – процессы LTP и LTD [117].

Известно, что гиперактивация ионотропных глутаматных NMDA рецепторов нейронов ЦНС млекопитающих приводит к глутамат-опосредованной эксайтотоксичности, а впоследствии и гибели нейронов. Совместно с лабораторией нейрорецепции ИФАВ РАН методом

радиолигандного связывания с NMDA рецепторами была исследована эффективность ППФ в отношении этого типа рецепторов.

Целью данного этапа работы являлось определение наличия взаимодействия изучаемых фуллереновых производных с участками связывания МК-801 и ифенпродила на NMDA рецепторах. Для этого были использованы два радиоактивных лиганда: [^3H]МК-801 и [^3H]ифенпродил [265-267].

Следует подчеркнуть, что МК-801 является блокатором ионного канала с очень медленной скоростью диссоциации, он связывается с внутриканальным фенциклидиновым сайтом NMDA рецепторов всех типов, а ифенпродил – негативный аллостерический модулятор – связывается с полиаминовым сайтом только тех NMDA рецепторов, которые содержат NR2B субъединицу [265-267]. NR2B субъединицам приписывают особую роль, поскольку через них реализуется ряд патологических процессов: активация NR2B субъединиц усиливает апоптоз и нейротоксичность. Поэтому при исследованиях биологически активных соединений, направленных на создание лекарственных препаратов-нейропротекторов на основе этих соединений, необходимо установить, являются ли исследуемые соединения модуляторами тех или иных типов NMDA рецепторов.

ППФ I-III были протестированы в диапазоне концентраций 10^{-9} - 10^{-6} М в условиях *in vitro*. В результате анализа полученных данных, представленных на рисунке 3.10, становится очевидным, что ППФ не конкурируют за сайты связывания на NMDA рецепторах ни с МК-801, ни с ифенпродилом.

Из литературных данных известно, что стимуляция extrasинаптических NMDA рецепторов подавляет синаптическую активность и способствует гибели клеток [88, 138], что является проявлением нейротоксичности. Следовательно, изучаемые ППФ, не влияющие на работу NMDA рецепторов, не будут оказывать нейротоксичного действия.

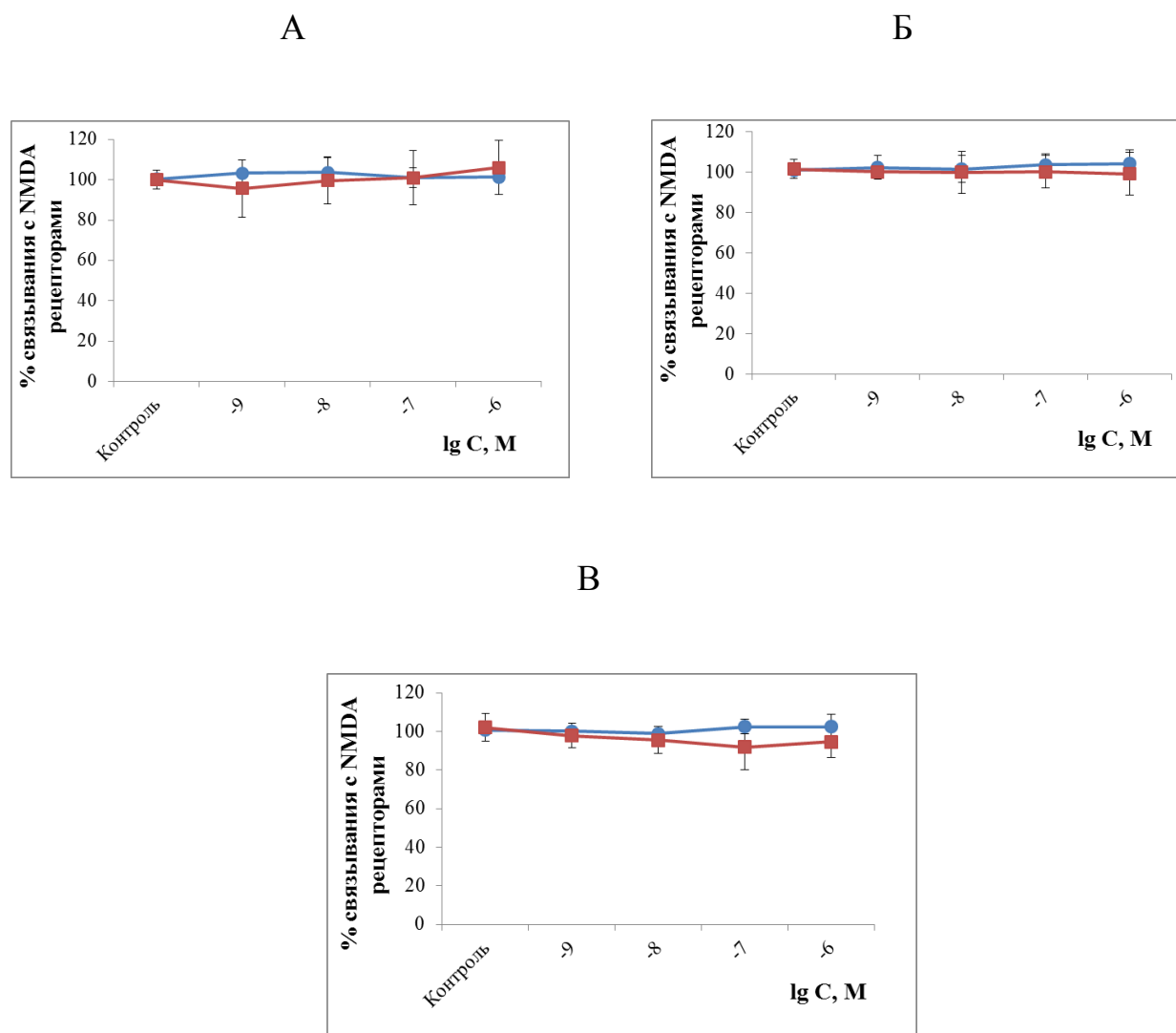


Рисунок 3.10. Влияние ППФ I-III (А-В, соответственно) на сайты связывания МК-801(●) и ифенпродила (■) NMDA рецепторов ($p < 0.05$). Уровень связывания МК-801 и ифенпродила в контрольных образцах принимали за 100%. Примечание: по оси абсцисс – логарифм концентрации соединений в молях.

На основании совокупности полученных нами характеристик исследуемых соединений, ППФ I–III были отобраны для исследований на животных.

3.1.4. Действие ППФ на поведение животных

Для подтверждения предположения о когнитивно-стимулирующем действии соединений-лидеров и выявления их влияния на поведенческие функции испытуемых животных (мышей) совместно с лабораторией биомолекулярного скрининга ИФАВ РАН были проведены исследования с использованием тестов «Открытое поле» и «Узнавание новой локализации известного объекта».

Влияние ППФ на двигательную активность, тревожность и ориентировочно-исследовательское поведение животных изучали в тесте «Открытое поле» на малой арене камеры TruScan. ППФ I-III водили мышам в дозах 0.05, 0.1 и 0.5 мг/кг. При осмотре мышей через 30 минут после введения указанных доз веществ ни внешний вид, ни поведение животных ничем не отличаются от контрольных.

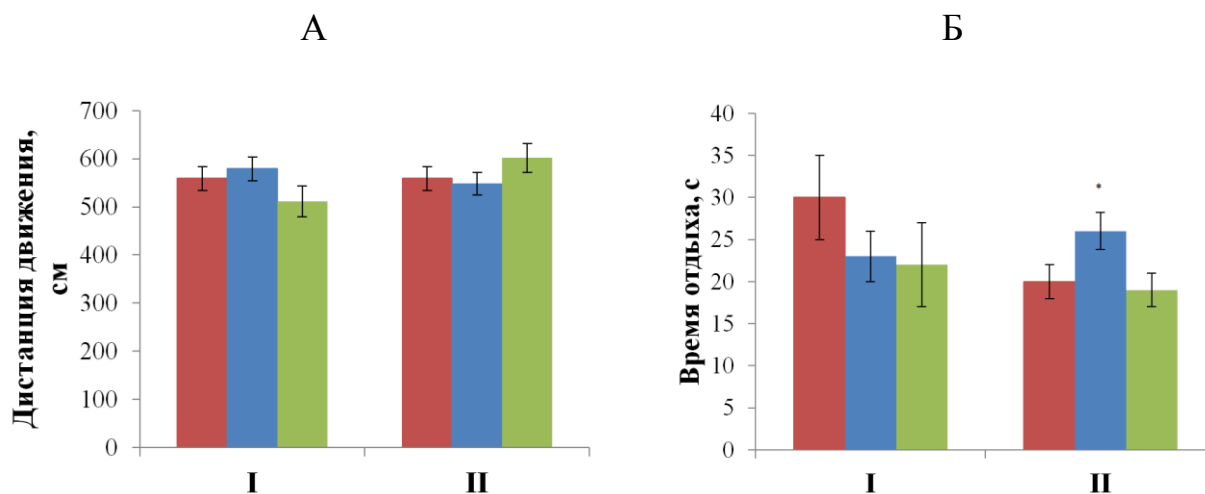


Рисунок 3.11. Влияние ППФ I и II на двигательную активность мышей: дистанция движения (А) и время отдыха (Б); * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем. Контроль (■), 0.1 мг/кг (■), 0.5 мг/кг (■).

Влияние ППФ на двигательную активность животных

Показателями двигательной активности животных являются дистанция движения (см) и время отдыха (с) [268]. Экспериментально установлено, что ППФ I и II в исследуемых дозах не оказывают выраженного влияния на двигательную активность мышей (рисунок 3.11).

Влияние ППФ на уровень тревожности животных

В тесте «Открытое поле» показателями тревожности животных являются время нахождения в пристеночной зоне и центре камеры TruScan (с) и дистанция, пройденная животными, в пристеночной зоне и центре камеры (см) [268]. Экспериментально установлено, что у группы мышей, которым вводили ППФ I в дозе 0.5 мг/кг, увеличивается время пребывания в центре на 28% (75 ± 5 с) по сравнению с контролем (59 ± 6 с), время пребывания в пристеночной зоне камеры недостоверно уменьшается на 7% (рисунок 3.12А).

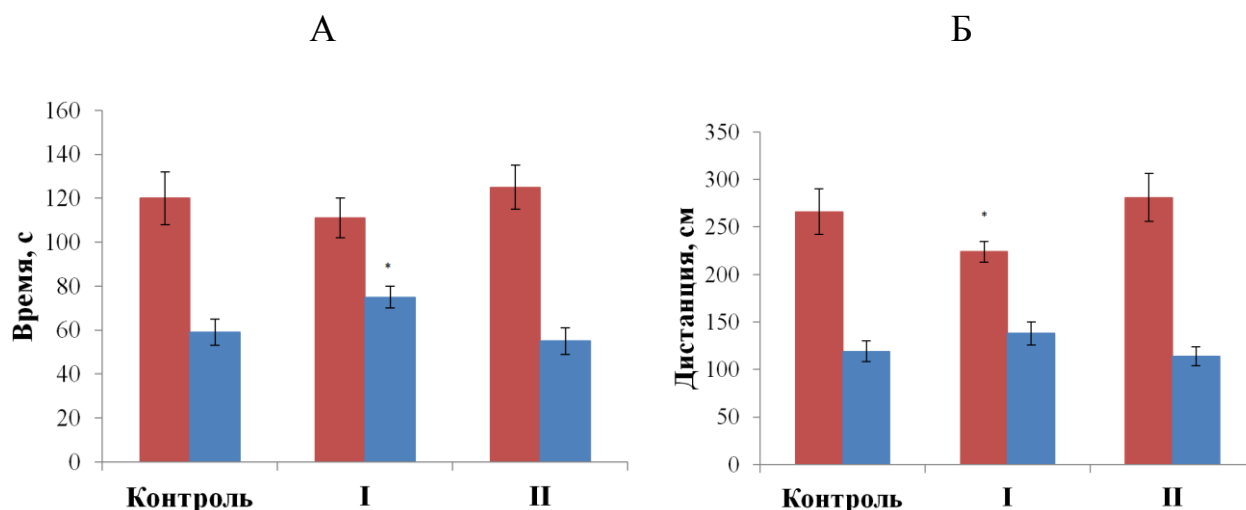


Рисунок 3.12. Влияние ППФ I и II при введении в дозе 0.5 мг/кг на тревожность животных: время нахождения мышей в пристеночной и центральной зоне камеры (А); дистанцию в пристеночной и центральной зоне камеры (Б). * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем. В периметре (■), в центре (■).

Данные показатели свидетельствуют об уменьшении уровня тревожности животных. Подтверждением этому служат также следующие данные: у опытной группы мышей наблюдается недостоверное увеличение дистанции в центре камеры относительно контроля и достоверное уменьшение дистанции в пристеночной зоне камеры (224 ± 11 см) по сравнению с контролем (266 ± 24 см) (рисунок 3.12Б). Таким образом, ППФ I в дозе 0.5 мг/кг оказывает анксиолитическое (противотревожное) действие.

При исследовании влияния ППФ II на тревожность животных достоверных отклонений показателей от группы контроля не обнаружено (рисунок 3.12).

Влияние ППФ на ориентировочно-исследовательское поведение животных

Ориентировочно-исследовательская активность мышей была также изучена в тесте «Открытое поле». Для ее определения необходимо фиксировать количество вертикальных стоек животных и количество обследованных отверстий – «норок» [268].

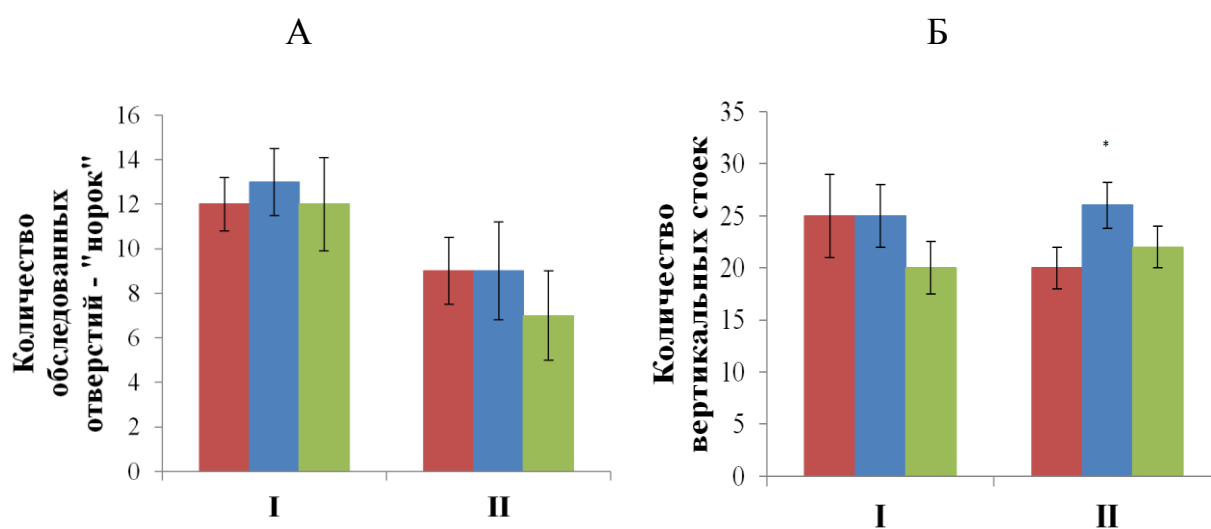


Рисунок 3.13. Влияние ППФ на ориентировочно-исследовательскую активность мышей: количество вертикальных стоек животных (А) и обследованных ими «норок» (Б); * – $p < 0.05$. Контроль (■), 0.1 мг/кг (■), 0.5 мг/кг (■).

Установлено, что ППФ I не оказывает достоверного влияния на количество вертикальных стоек мышей и при его действии в дозе 0.1 мг/кг недостоверно увеличивается количество обследованных отверстий (на 8%) – возможно, повышается исследовательская активность мышей (рисунок 3.13). При введении ППФ II в дозе 0.1 мг/кг увеличивается количество вертикальных стоек на 30% (26 ± 2) относительно контроля (20 ± 2) – повышается вертикальная исследовательская активность мышей (рисунок 3.13Б).

Влияние ППФ на память животных

Для подтверждения способности соединений к когнитивно-стимулирующей активности в тесте «Узнавание новой локализации известного объекта» мы оценивали влияние производных фуллерена на память мышей. Суть теста состоит в том, что во время «тренировки» мыши исследуют два одинаковых предмета в камере и тратят на обследование каждого из них примерно одинаковое время. Через 48 часов животное помещают в ту же камеру, где один известный ему предмет стоит на старом месте, а расположение другого изменено. Животные в контрольной группе через 48 часов не помнят, где раньше стояли предметы, воспринимают их как новые и снова обследуют их примерно одинаковое время, как и при тренировке (рисунок 3.14): в известной локализации 43 ± 11 % времени и в новой локализации – 57 ± 9 % (общее время обследования двух объектов принимается за 100%). После введения ППФ I в дозе 1 мг/кг мыши в эксперименте затрачивают меньше времени на обследование предмета в старой локализации (18 ± 9 %), так как под действием соединения, улучшающего память, животные запоминают его во время тренировки, и больше времени (82 ± 6 %) они затрачивают на обследование предмета в новой локализации, так как воспринимают его как новый объект. При введении ППФ I в дозе 0.1 мг/кг достоверных отклонений данного показателя не наблюдалось (рисунок 3.14). При исследовании действия ППФ II на память

мышей получены следующие результаты (рисунок 3.14): в отличие от группы контроля животные, которым вводили ППФ II в дозе 1 мг/кг, затрачивали на обследование объекта в известной локализации $35\pm 5\%$ времени, а в новой локализации достоверно большее время – $65\pm 3\%$, что указывает на то, что в этой дозе соединение улучшает память животных. При введении исследуемого соединения в дозе 0.1 мг/кг достоверных отклонений данного показателя не наблюдалось.

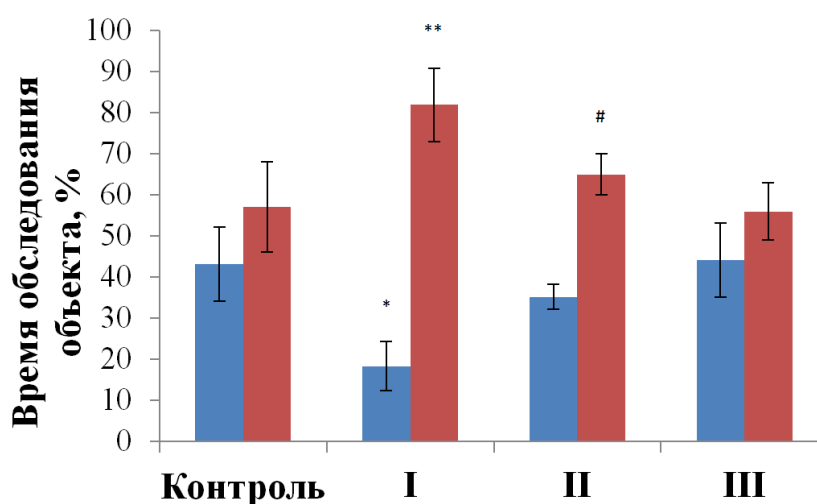


Рисунок 3.14. Влияние ППФ I-III в дозе 1 мг/кг на долговременную память мышей. Приведено время исследования объекта в известной (■) и в новой локализации (■). * – $p < 0.05$ относительно контроля, ** – $p < 0.01$ относительно контроля, # – $p < 0.05$ относительно известной локализации.

Таким образом, ППФ I и II, являясь позитивными модуляторами AMPA рецепторов, улучшают память животных при введении в малой дозе – 1 мг/кг. В отличие от ППФ I и II соединение сравнения ППФ III (которое не действует на AMPA рецепторы) не влияет на память мышей, так как время обследования объектов в известной и новой локализациях примерно одинаковое, как в контроле (рисунок 3.14).

В результате изучения влияния водорастворимых производных фуллерена C_{60} на терапевтические мишени БА и поведение животных показано, что рассматриваемые ППФ-лидеры, в отличие от применяемых в

современной клинике препаратов, одновременно воздействуют на несколько ключевых звеньев развития нейродегенеративных патологий: являются эффективными ингибиторами МАО-В, проявляют выраженную антиоксидантную и антирадикальную активность, выступают позитивными модуляторами АМРА рецепторов, не обладают нейротоксичностью, улучшают память млекопитающих, вместе с тем обладают хорошей растворимостью в воде, проникают в фосфолипидную мембрану и мало токсичны [269]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что представители класса водорастворимых полизамещенных производных фуллерена C_{60} (ППФ I и II) могут быть рекомендованы для углубленных исследований в качестве соединений для разработки на их основе препаратов для лечения БА и других нейродегенеративных патологий, сопровождающихся нарушением когнитивных функций.

3.2. Исследование влияния гибридных структур на основе аминокислотных производных фуллерена C_{60} (ГСФ) на терапевтические мишени болезни Альцгеймера и поведение животных

3.2.1. Влияние ГСФ на активность МАО-В и свободнорадикальное окисление липидов

Помимо водорастворимых полизамещенных производных фуллеренов в работе также изучались гибридные структуры фуллерена C_{60} (ГСФ), в которых к фуллереновому сфероиду присоединены два адденда – аминокислота для придания растворимости в воде и функционально активная группировка для придания соединению определенного вида биологической активности [227]. В качестве исследуемых соединений использовались нитраты аминокислотных производных фуллерена C_{60} (таблица 2.1, ГСФ V и VI), особенностью которых является их способность выступать в качестве

доноров монооксида азота [270]. Интерес к созданию и исследованию доноров NO, механизмам их биологического действия обусловлен особенностями физиологической роли монооксида азота, которая включает и нейропротекторное действие [271-274]. Протекторное влияние NO-доноров на память подтверждается результатами работы [273]: при введении NO-донора (динитрозильного комплекса железа) крысам внутрибрюшинно у животных возникает адаптационная защита от нарушений памяти, вызванных введением токсичного фрагмента β -амилоида, такая, как при адаптации к гипоксии.

В ряде работ показано, что NO-доноры частично восстанавливали когнитивные функции, сниженные ослаблением холинергической сигнализации [275-278]. Авторами статьи [277] установлено, что NO-флурбипрофен проявляет антиамилоидную активность в клеточной культуре и улучшает когнитивную активность крыс в ответ на блокаду холиновых рецепторов скополамином. Авторы работы [279] обнаружили, что NO-ДМА (NO-деметилованный арзоксифен) восстанавливает когнитивные функции при отсутствии активности эндотелиальной NO-синтазы, что подтверждает возможность обойти дисфункцию этого фермента за счет экзогенного NO.

В работах [233] показано, что гибридные производные фуллерена C_{60} транспортируются через фосфолипидную мембрану во внутренний объем липосом. Важным свойством, обнаруженным у водорастворимого фуллеренил-пролина с присоединенным эозином, является его способность проникать через гемато-энцефалический барьер у крыс [280].

Для установления механизма взаимодействия соединений с ферментом MAO-B в предлагаемой работе изучалась кинетика влияния ГСФ V и VI на каталитическую активность MAO-B в гомогенате головного мозга мышей (рисунки 3.15, 3.16).

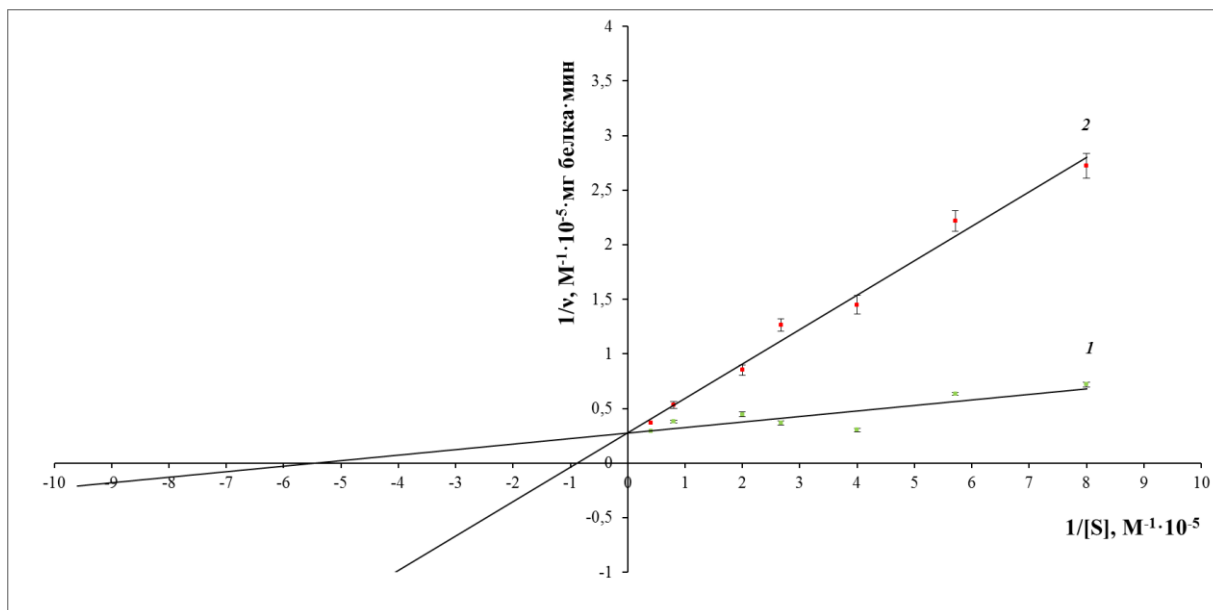


Рисунок 3.15. Конкурентное ингибирование реакции дезаминирования бензиламина, катализируемой моноаминоксидазой В, при действии ГСФ V. 1 – контроль (в отсутствии ингибитора); 2 – в присутствии ГСФ V в концентрации ГСФ $2.5 \cdot 10^{-6}$ М. $K_i = 0.47 \cdot 10^{-6}$ М. [S] – концентрация бензиламина (субстрата MAO-B); v – скорость ферментативной реакции.

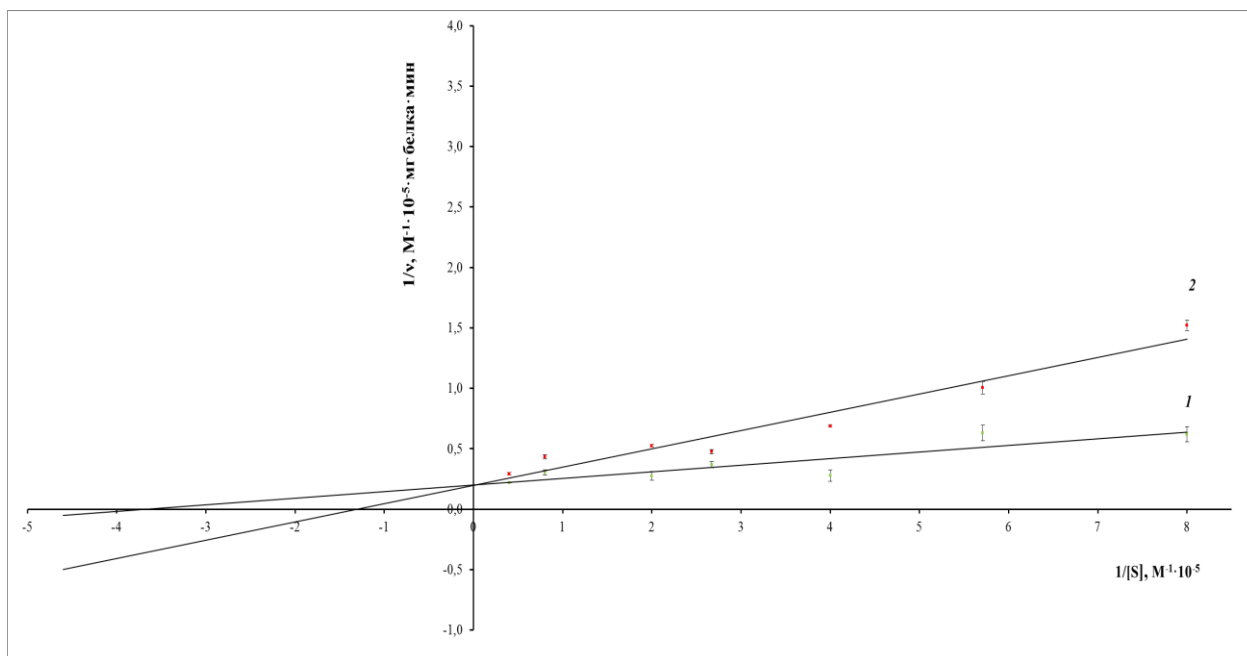


Рисунок 3.16. Конкурентное ингибирование реакции дезаминирования бензиламина, катализируемой моноаминоксидазой В, при действии ГСФ VI. 1 – контроль (в отсутствии ингибитора); 2 – в присутствии ГСФ VI в концентрации $2.5 \cdot 10^{-6}$ М. $K_i = 1.41 \cdot 10^{-6}$ М. [S] – концентрация бензиламина (субстрата MAO-B); v – скорость ферментативной реакции.

Из полученных графиков (зависимости скорости реакции от концентрации субстрата в двойных обратных координатах Лайнуивера-Берка) определяли константы ингибирования MAO-B исследуемыми ГСФ. Как видно из рисунка 3.15 и 3.16, ГСФ V и VI являются конкурентными ингибиторами MAO-B с константами ингибирования реакции дезаминирования бензиламина $K_i(V)=0.47 \cdot 10^{-6}$ М и $K_i(VI)=1.41 \cdot 10^{-6}$ М. Исходное ГСФ IV незначительно повышает активность MAO-B (таблица 3.3).

В работе [50] показано, что ГСФ V и VI активируют MAO-A, что, согласно литературным данным [281], может приводить к снижению нервного возбуждения, так как повышение активности MAO-A приводит к уменьшению содержания адреналина в организме. ГСФ IV не влияет на активность MAO-A.

Как уже говорилось выше, при разработке препаратов для лечения БА важными являются их антиоксидантная активность и мембранотропные свойства.

Таблица 3.2. Влияние исследуемых ГСФ на процесс ПОЛ ($p < 0.05$ относительно контроля) в гомогенате головного мозга мышей.

Соединение	Концентрация МДА, мкМ/мг белка	Содержание МДА, %	ЛД ₅₀ [*] , мг/кг
Контроль	2.2±0.2	100.0±5.4	
IV [10^{-5} М]	1.8±0.1	79.9±4.8	270
V [10^{-5} М]	1.3±0.1	56.7±5.3	300
VI [10^{-5} М]	1.6±0.1	73.2±4.9	450
Ионол [10^{-5} М]	0.6±0.0	28.3±5.2	

* – острая токсичность соединений [50].

Исследования изменения интенсивности процесса ПОЛ при действии ГСФ (таблица 3.2) показали, что ГСФ IV-VI в концентрации 10^{-5} М ингибируют образование МДА в гомогенате головного мозга мышей на 20, 43 и 27%, соответственно, то есть обладают антиоксидантными свойствами. Антиоксидантные свойства аминокислотных производных фуллерена показаны в работе [19].

Согласно литературным данным, способность соединений перехватывать свободные радикалы важна для ингибирования процессов нейродегенерации. В настоящей работе антирадикальная активность ГСФ в образцах гомогената головного мозга мышей оценивалось методом ХЛ по изменению люминесценции люминола. Как видно из рисунка 3.17, при действии любого из исследуемых ГСФ уменьшается светосумма, что свидетельствует об уменьшении содержания свободных радикалов в модельной системе.

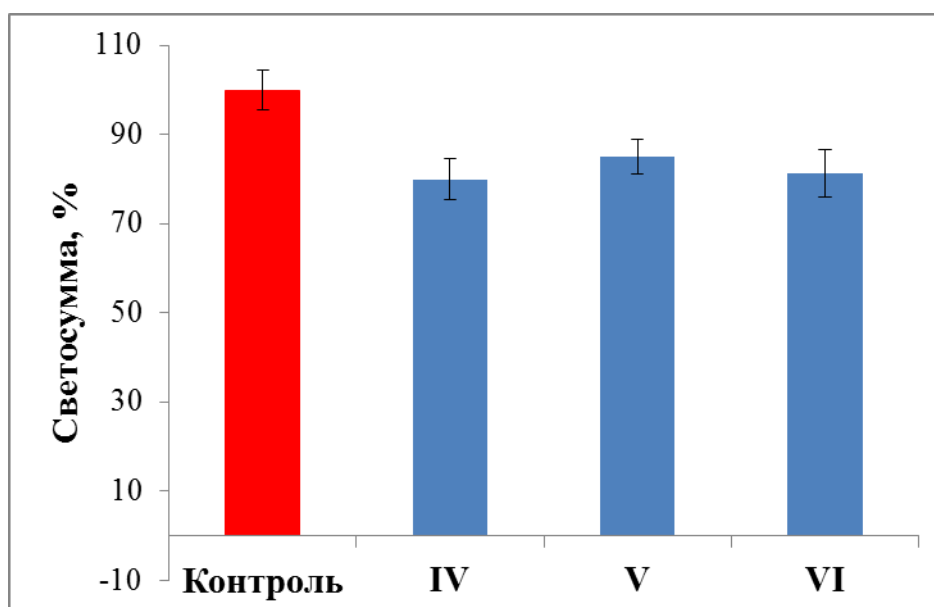


Рисунок 3.17. Изменение светосуммы люминесценции люминола при действии ГСФ IV-VI в концентрации 10^{-5} М в гомогенате головного мозга мышей. В качестве инициатора использовали ТБГП. $p < 0.05$ относительно контроля.

Полученный результат доказывает способность ГСФ перехватывать свободные радикалы. Из рисунка 3.17 видно, что это свойство не зависит от структуры аддендов, присоединенных к сфероиду фуллерена, так как эффективность каждого ГСФ примерно одинакова. Такой результат можно объяснить тем, что антирадикальная активность ГСФ определяется акцепторными свойствами фуллеренового сфероида.

Важно, что изучаемые ГСФ легко транспортируются через фосфолипидный бислой мембраны и мало токсичны в отношении объекта исследований – мыши (таблица 3.2): ЛД₅₀ при введении ГСФ IV-VI варьируется от 270 до 450 мг/кг [50].

Как уже говорилось выше, важным критерием при отборе соединений с когнитивно-стимулирующей активностью является их способность к предотвращению агрегации β -амилоидных белков. В работе [54] установлено, что ГСФ V и VI предотвращают образование амилоидных фибрилл A β (1-42) пептида мозга, а также разрушают уже сформированные фибриллы *in vitro*.

Таким образом, в результате проведенных исследований, согласно критериям предварительного отбора модуляторов когнитивных функций, были выбраны два ГСФ-лидера (V и VI), в структуру которых включены одна и две нитратные группировки, соответственно, для последующих углубленных испытаний.

3.2.2. Влияние ГСФ на функциональное состояние ионотропных глутаматных AMPA и NMDA рецепторов

Как уже говорилось выше, AMPA и NMDA рецепторы – главные рецепторные мишени при отборе потенциальных препаратов для терапии БА, позитивная модуляция ионотропных глутаматных AMPA рецепторов нейронов ЦНС млекопитающих свидетельствует о потенциальной

когнитивно-стимулирующей активности соединений, то есть о способности к положительному влиянию на долговременную память. В рамках данной работы изучалось влияние ГСФ на функциональное состояние AMPA рецепторов нейронов Пуркинье мозжечка крыс электрофизиологическим методом patch-clamp в конфигурации «whole cell».

Как следует из рисунка 3.18, ГСФ VI вызывает позитивную модуляцию ответов AMPA рецепторов в нейронах Пуркинье: в концентрации 10^{-6} М соединение увеличивает амплитуду токов рецепторов на 61%, а в концентрации 10^{-5} М – на 72% относительно контроля, в концентрации 10^{-4} М – на 45%. При отмывке ГСФ амплитуда токов восстанавливалась до уровня контрольных значений. Этот факт свидетельствует об обратимости действия ГСФ на AMPA рецепторы.

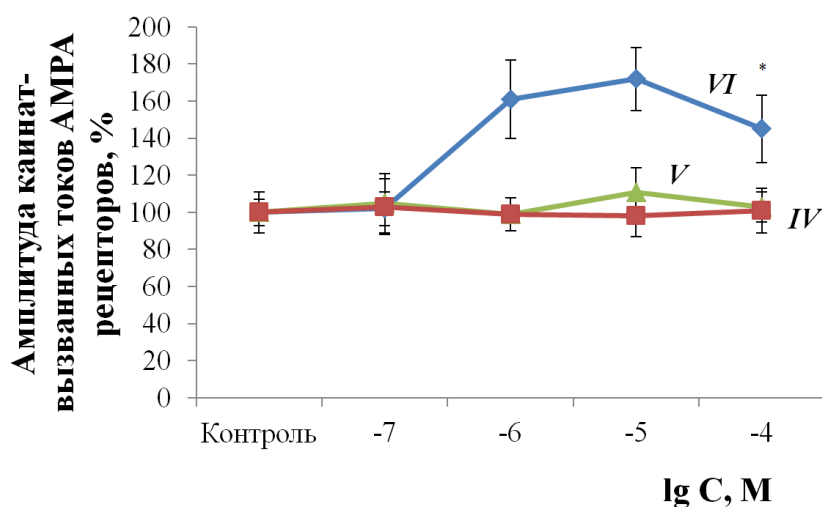


Рисунок 3.18. Влияние ГСФ IV-VI на амплитуду токов AMPA рецепторов нейронов Пуркинье мозжечка крыс ($p < 0.05$). * – $p > 0.05$ относительно контроля. Примечание: по оси абсцисс – логарифм концентрации соединений в молях.

Также было установлено, что ГСФ IV и V не влияют на функциональную активность AMPA рецепторов (рисунок 3.18). Таким образом, показано, что ГСФ VI (в структуре которого содержатся две нитратные группировки) является позитивным модулятором AMPA

рецепторов и, как следствие, может участвовать в процессах формирования памяти.

Методом радиолигандного связывания с ионотропными глутаматными NMDA рецепторами ЦНС млекопитающих в работе изучалось действие соединения-лидера ГСФ VI на функциональное состояние этих рецепторов. Установлено, что ГСФ VI в диапазоне концентраций 10^{-9} - 10^{-6} М в условиях *in vitro* не влияет на связывание радиоактивных лигандов с рецепторами (рисунок 3.19), то есть не оказывает действия на функционирование NMDA рецепторов. Как было показано выше (раздел 3.1.3), этот результат позволяет предполагать, что ГСФ VI не обладает нейротоксичным действием.

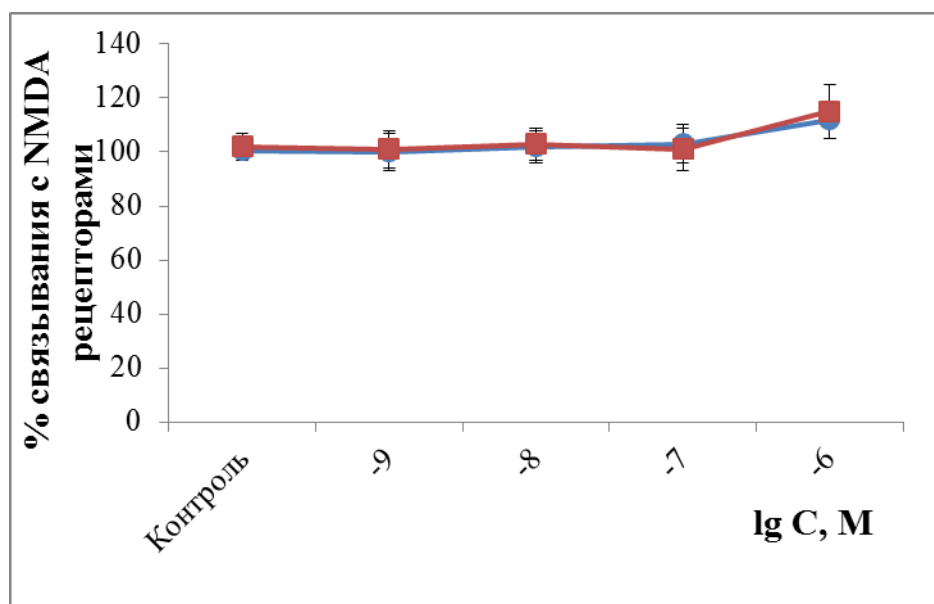


Рисунок 3.19. Влияние ГСФ VI на сайты связывания МК-801(●) и ифенпродила (■) NMDA рецепторов ($p < 0.05$). Примечание: по оси абсцисс — логарифм концентрации соединений в молях. Уровень связывания МК-801 и ифенпродила в контрольных образцах принимали за 100%.

Следует отметить, что ГСФ VI в диапазоне концентраций 10^{-10} - 10^{-4} М ингибирует глутамат-индуцированный захват $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в синапсомы коры мозга крыс [282], что свидетельствует о способности ГСФ к защитному действию на пресинаптические глутаматные рецепторы (NMDA рецепторы, каинатные и метаботропные рецепторы I типа).

Таким образом, установлено, что ГСФ VI отвечает критериям отбора ингибиторов нейродегенеративных процессов: ингибирует MAO-B, обладает антиоксидантными и антирадикальными свойствами, является позитивным модулятором AMPA рецепторов и оказывает протекторное действие на пресинаптические глутаматные рецепторы, не проявляет нейротоксичности, что свидетельствует о перспективности углубленного изучения этого соединения на животных с целью создания на их основе эффективных препаратов для терапии БА.

3.2.3. Действие ГСФ на поведение животных

Действие соединения-лидера на поведенческие характеристики мышей исследовали в тесте «Открытое поле» в камере TruScan. ГСФ VI вводились в дозах 0.5, 1 и 1.5 мг/кг. При осмотре мышей через 30 минут после введения указанных доз вещества не наблюдалось различий во внешнем виде и поведении животных в контрольной и опытных группах.

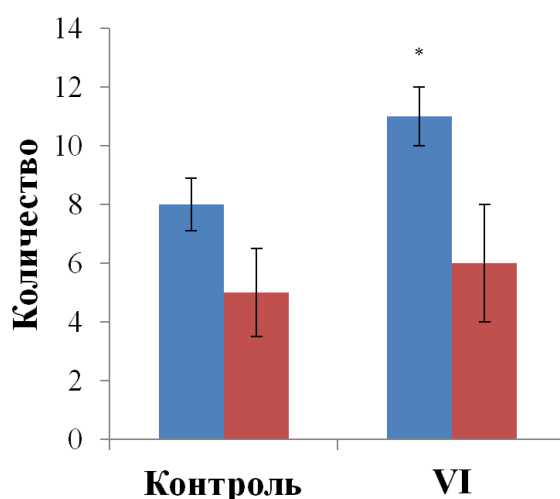


Рисунок 3.20. Влияние ГСФ VI в дозе 1.5 мг/кг на ориентировочно-исследовательскую активность мышей. * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем. Вертикальные стойки (■), обследованные «норки» (■).

При исследовании влияния ГСФ VI на двигательную активность и уровень тревожности достоверных отличий между показателями в опытной группе животных и контрольной не обнаружено. При действии соединения в дозе 1.5 мг/кг наблюдается увеличение вертикальных стоек на 38% относительно контроля, что свидетельствует о стимуляции ориентировочно-исследовательской активности мышей. Результаты представлены на рисунке 3.20.

Исследование влияния ГСФ VI на долговременную память мышей проводили в тесте «Узнавание новой локализации известного объекта». В группе контроля объекты в известной и новой локализации обследовались примерно одинаковое количество времени (рисунок 3.21): в известной локализации 46 ± 8 % времени и в новой локализации – 54 ± 8 % (общее время обследования двух объектов принимается за 100%), из чего следует, что мыши не запомнили обстановку, представленную в день обучения.

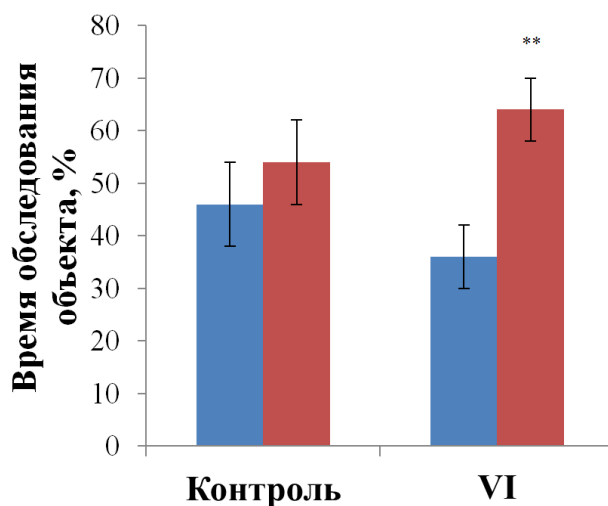


Рисунок 3.21. Влияние ГСФ VI при введении в дозе 1.5 мг/кг на долговременную память мышей. Приведено время исследования объекта в известной локализации (■) и в новой локализации (■). ** – $p < 0.01$ относительно известной локализации.

Введение ГСФ VI в дозе 0.5 и 1 мг/кг не оказало влияния на долговременную память животных. В группе мышей, которым ввели ГСФ VI

в дозе 1.5 мг/кг, отмечалось увеличение времени обследования объекта в новой локализации ($64\pm 6\%$) относительно известной ($36\pm 6\%$), что указывает на запоминание расположения объектов во время обучения, следовательно, наблюдается улучшение памяти мышей под действием исследуемого соединения (рисунок 3.21).

Таким образом, в результате изучения механизмов действия гибридных структур на основе аминокислотного производного фуллерена C_{60} и нитратных группировок в качестве аддендов на терапевтические мишени БА было выбрано соединение-лидер ГСФ VI, в структуре которого содержится две нитратные группы. Оно является ингибитором MAO-B, обладает выраженной антиоксидантной и антирадикальной активностью при малой токсичности. ГСФ VI является позитивным модулятором AMPA рецепторов, не проявляет нейротоксичности и предотвращает образование β -амилоидных фибрилл. Поведенческие тесты подтвердили улучшение когнитивных функций животных под действием этого соединения, что позволяет рассматривать его в качестве терапевтически перспективного соединения для создания на его основе лекарственного препарата для лечения БА и улучшения когнитивных процессов.

На основании результатов проведенных исследований выбраны водорастворимые производные фуллерена C_{60} -лидеры, которые действуют одновременно на несколько терапевтических мишеней БА: ингибируют MAO-B и процессы свободнорадикального окисления липидов, выступают позитивными модуляторами AMPA рецепторов, а также предотвращают формирование β -амилоидных фибрилл, в то время как действие современных клинических препаратов направлено в основном на одну терапевтическую мишень, например, ривастигмин (экселон) и донепезил – ингибиторы АХЭ, селегилин (депренил) – ингибитор MAO-B, акатинол мемантин – блокатор NMDA рецепторов. Эти данные позволяют рекомендовать ВПРФ-лидеры для предклинических исследований в качестве лекарственных препаратов для

лечения болезни Альцгеймера и улучшения когнитивных функций головного мозга.

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

Выше нами было показано, что гибридные наноструктуры на основе фуллерена C₆₀ с присоединенными NO₂-группами обладают выраженными нейропротекторными свойствами в отличие от исходного аминокислотного производного фуллерена C₆₀ (ГСФ IV). На основании таких результатов была сконструирована, а затем синтезирована В. С. Романовой (ИНЭОС РАН) по методам, описанным в работах [226, 227], гибридная структура на основе фуллерена C₆₀ (таблица 2.1, VIII), содержащая два адденда: биологически активное соединение VII (таблица 2.1) и натриевую соль пролина – для придания водорастворимости соединению. Соединение VII (таблица 2.1) – один из аналогов димебона, проявляющий нейротропные свойства и предложенный в качестве основы для создания перспективных нейропротекторных агентов [283]. Димебон оказывает нейропротекторное действие, блокируя цитотоксические сигналы, вызванные провоспалительными цитокинами, такими как ФНО-альфа [284]. Известно, что димебон как антигистаминный препарат проявил высокий терапевтический эффект на второй стадии клинических испытаний на пациентах с БА [285], но на третьей фазе испытаний клинический эффект димебона был нивелирован необычно высоким терапевтическим эффектом плацебо [286], тем не менее в 2012 году была открыта способность димебона стимулировать аутофагию и нейрогенез [287-289], что вновь возродило интерес к препарату.

При исследовании исходного биологически активного соединения VII установлено, что оно снижает интенсивность процесса ПОЛ, снижает каталитическую активность MAO-B и MAO-A в гомогенате головного мозга мышей (таблица 3.3) и оказывает положительное модулирующее действие на AMPA рецепторы нейронов ЦНС млекопитающих (рисунок 3.22). Каинат-вызванные токи рецепторов усиливаются под действием соединения VII в концентрации 10^{-9} М на 27%, при концентрации 10^{-8} М достигается максимум потенциации токов (в среднем – 50%), при концентрации соединения 10^{-7} М потенцияция токов равна 20%. Эти результаты свидетельствуют о потенциальной когнитивно-стимулирующей активности соединения. Но при дальнейших испытаниях, а именно исследовании фармакологической активности в поведенческих тестах, соединение VII проявило побочное психостимулирующее действие (возрастает психомоторное возбуждение животных – рисунки 3.23, 3.25), которое не позволяет рассматривать это соединение в качестве потенциального лекарственного препарата. Возможно, эффект повышенного возбуждения нервной системы животных объясняется ингибированием MAO-A, что, как известно, вызывает повышение концентрации адреналина в крови [290].

Для оптимизации терапевтических свойств соединения VII была сконструирована гибридная структура (таблица 2.1, VIII). Так как исследования [3, 282] показывают, 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. Для подтверждения этого были проведены исследования молекулярных механизмов биологического действия соединения VIII.

Таблица 3.3. Влияние ГСФ IV и VIII, а также биологически активного соединения VII на процесс ПОЛ и каталитическую активность MAO ($p < 0.05$ относительно контроля) в гомогенате головного мозга крыс.

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

Установлено, что ГСФ VIII обладает антиоксидантным действием, так как снижает концентрацию МДА в среднем на 38% в гомогенате головного мозга мышей (таблица 3.3). Также показано, что это соединение ингибирует каталитическую активность MAO-B на 26% в гомогенате головного мозга мышей (таблица 3.3). Показано, что ГСФ VIII активизирует работу MAO-A (таблица 3.3), поэтому следует ожидать, что оно будет снижать нервное возбуждение животных.

Исследования влияния ГСФ VIII на функциональную активность AMPA рецепторов нейронов Пуркинье мозжечка крыс (рисунок 3.22) показали, что гибридная структура проявляет сходный с действием исходного биологически активного соединения VII эффект: каинат-вызванные токи рецепторов усиливаются под действием соединения в концентрации 10^{-9} М в среднем на 24%, при концентрации 10^{-8} М достигается максимум потенциации (в среднем – 46%), при концентрации 10^{-7} М потенцияция токов была равна 24%. Как видно из рисунка, потенцияция каинат-вызванных токов также имеет куполообразную форму. Таким

образом, ГСФ VIII, как и исходное биологически активное соединение VII, является позитивным модулятором AMPA рецепторов. ГСФ IV, выступающая в качестве основы гибридной структуры, не влияет на амплитуду токов AMPA рецепторов.

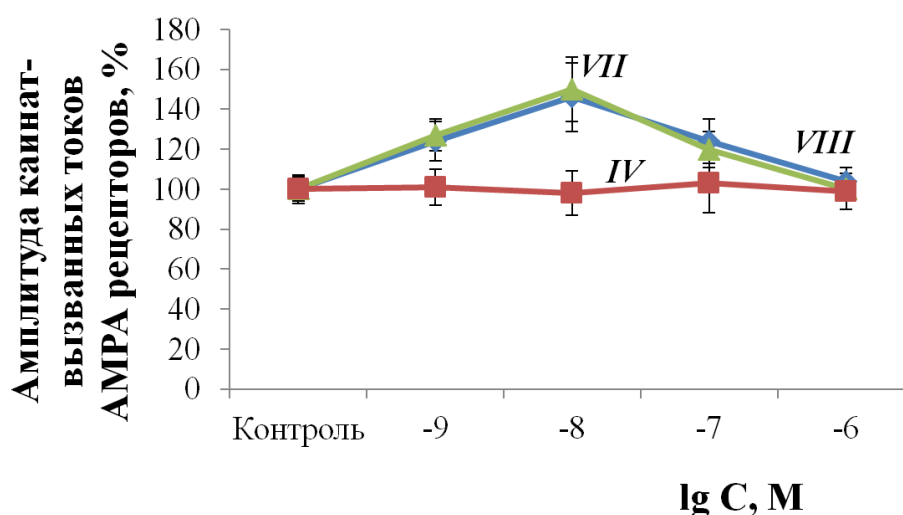


Рисунок 3.22. Действие ГСФ IV и VIII, а также биологически активного соединения VII на амплитуду кайнат-вызванных токов AMPA рецепторов нейронов Пуркинье мозжечка крыс ($p < 0.05$). Примечание: по оси абсцисс – логарифм концентрации соединений в молях.

Таким образом, из выше сказанного следует, что полученная гибридная структура сохраняет когнитивно-стимулирующую активность, проявленную исходным соединением VII, а активация MAO-A позволяет предположить, что полученное ГСФ не будет провоцировать психомоторное возбуждение животных.

В настоящей работе исследовалось влияние гибридной структуры и исходных соединений на поведение и память животных в тестах «Открытое поле» и «Узнавание новой локализации известного объекта», соответственно. Обнаружено, что введение ГСФ VIII не оказывает побочного психостимулирующего действия, в отличие от исходного соединения VII, введение которого приводит к достоверному увеличению пройденного мышами пути за 3 мин тестирования: в дозе 0.001, 0.05 и 0.1 мг/кг – на

42±12%, 44±13% и 36±6%, соответственно, относительно контроля (рисунок 3.23).

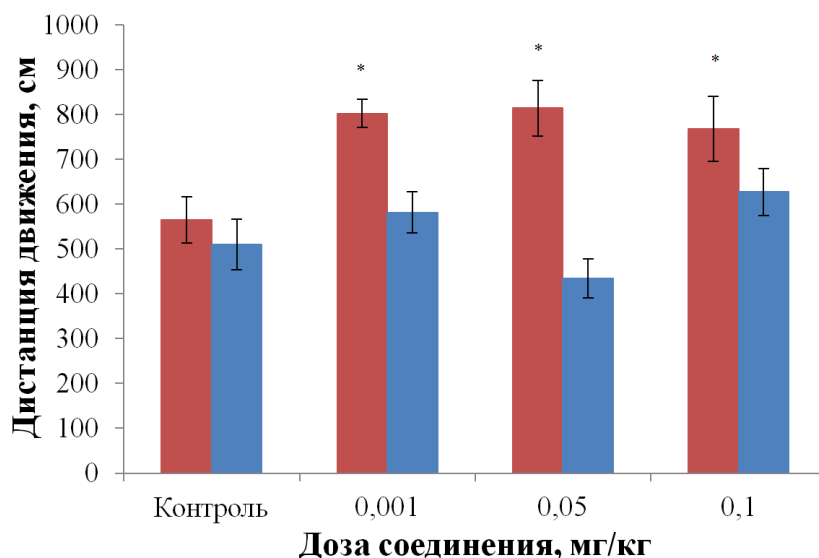


Рисунок 3.23. Действие биологически активного соединения VII(■) и ГСФ VIII (■) на двигательную активность мышей. * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

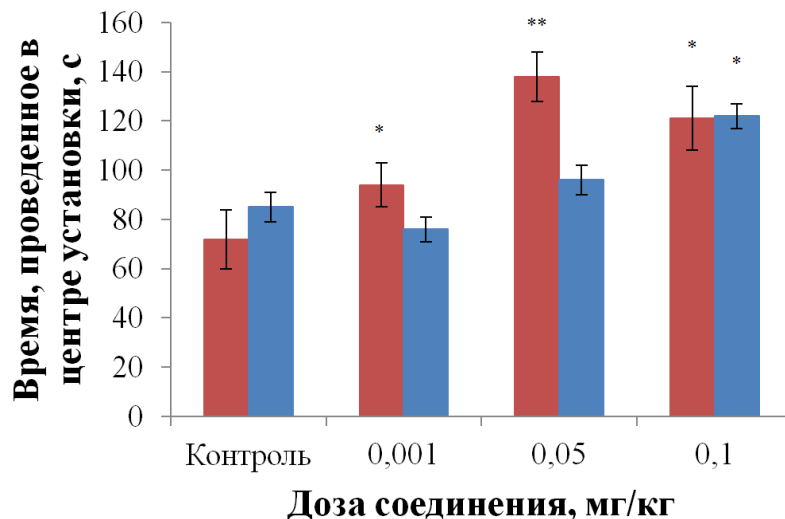


Рисунок 3.24. Действие биологически активного соединения VII(■) и ГСФ VIII(■) на уровень тревожности мышей. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ по сравнению с контролем.

Также установлено, что соединение VII в дозах 0.05 и 0.1 мг/кг достоверно увеличивает время нахождения в центре установки на 93% и 68%, соответственно (рисунок 3.24), что свидетельствует о снижении уровня

тревожности мышей. При введении исследуемого ГСФ VIII в дозе 0.1 мг/кг также наблюдалось снижение уровня тревожности мышей (рисунок 3.24).

При введении исходного соединения VII (рисунок 3.25А) количество вертикальных стоек животных дозозависимо растет.

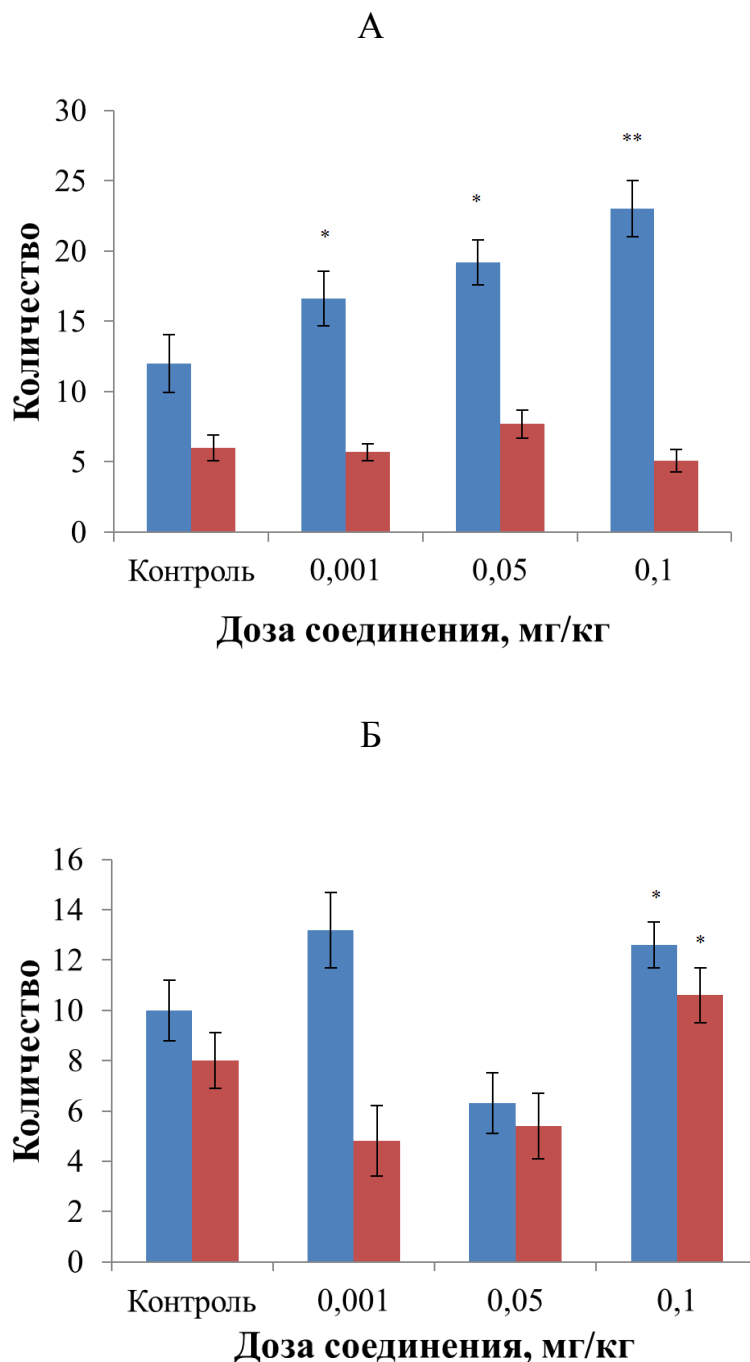
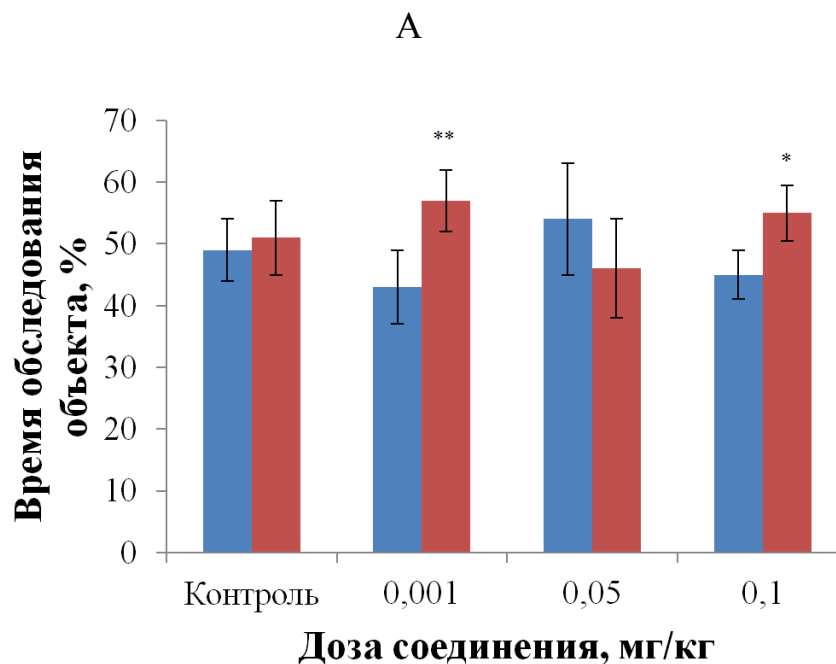


Рисунок 3.25. Действие биологически активного соединения VII (А) и ГСФ VIII (Б) на ориентировочно-исследовательское поведение мышей. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$ по сравнению с контролем. Вертикальные стойки (■), обследованные «норки» (■).

Этот эффект также является подтверждением повышенного психомоторного возбуждения животных.

Исследование влияния ГСФ VIII на ориентировочно-исследовательское поведение мышей показало, что в дозе 0.1 мг/кг соединение увеличивает ориентировочно-исследовательскую активность (рисунок 3.25Б).

Таким образом, с помощью получения гибридной структуры VIII, нам удалось избавиться от побочного психостимулирующего эффекта исходного нейротропного соединения VII. Этот результат можно объяснить тем, что ГСФ VIII активирует MAO-A (в отличие от исходного соединения VII), что приводит к снижению нервного возбуждения животных. Исследование влияния гибридной структуры и исходных соединений на память мышей показали, что соединение VII и ГСФ VIII в дозе 0.001 мг/кг улучшают долговременную память животных (рисунок 3.26А и Б), то есть когнитивно-стимулирующий эффект исходного соединения VII характерен и для гибридной структуры. Как видно из рисунка 3.26В, ГСФ IV не влияет на память мышей.



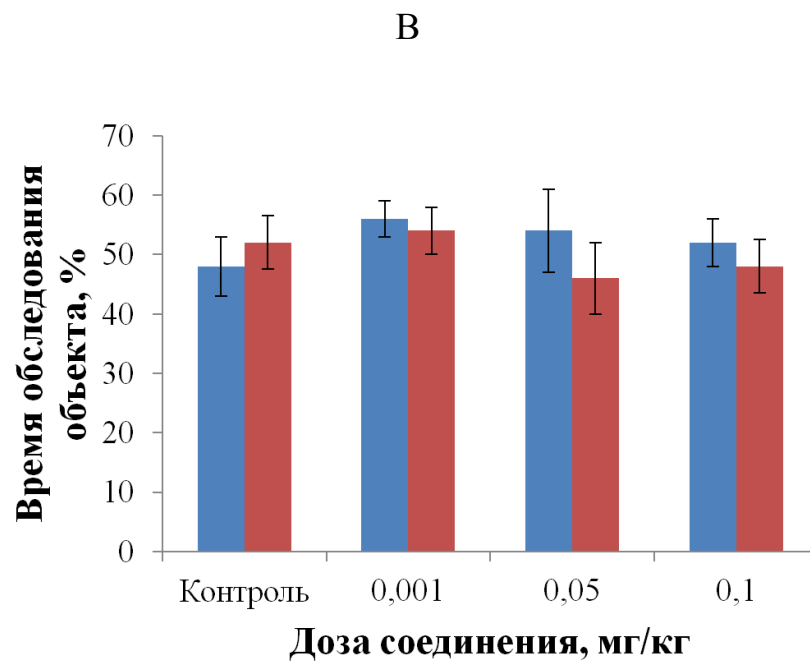
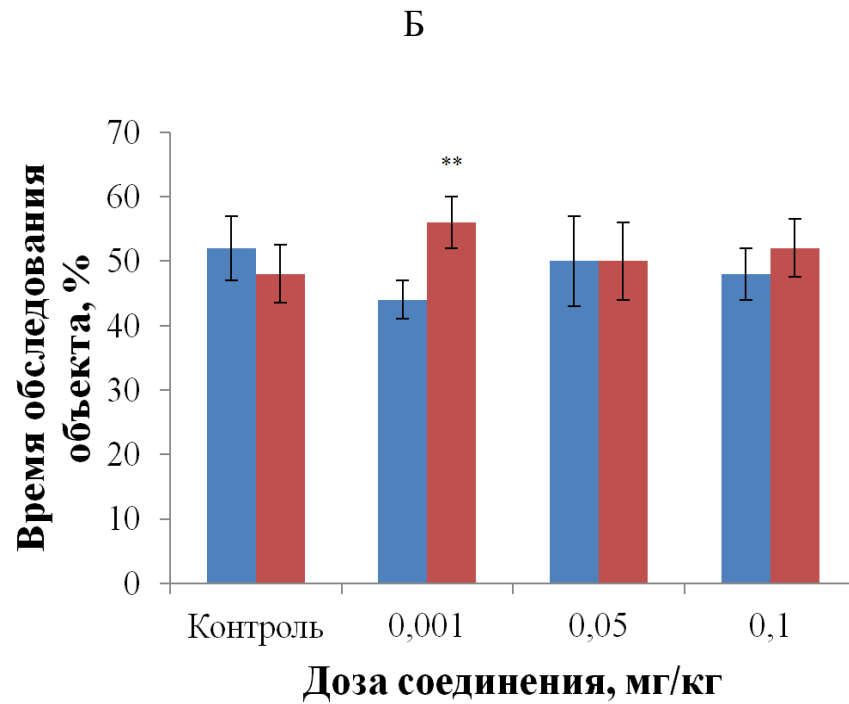


Рисунок 3.26. Действие биологически активного соединения VII (А), ГСФ VIII (Б) и IV (В) на долговременную память мышей: изменение времени исследования объекта в известной (■) и в новой локализации (■).*– $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$ относительно известной локализации.

Как следует из полученных результатов, нам удалось оптимизировать

фармакологический профиль нейротропного соединения VII (избавиться от побочного психостимулирующего эффекта и сохранить когнитивно-стимулирующую активность) за счет создания гибридной структуры на основе этого соединения и аминокислотного производного фуллерена C₆₀. Таким образом, впервые предложен алгоритм конструирования фармакологически активных гибридных структур, обладающих необходимой биологической активностью, на основе производных фуллерена и физиологически активных аддендов [291].

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 отобраны соединения-лидеры (ППФ I, II и ГСФ VI), которые обладают антиоксидантной активностью, выступают ингибиторами каталитической активности моноаминоксидазы В и 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 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 соединений 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.

Литература

- 1) Prince, M. Dementia and risk reduction: an analysis of protective and modifiable factors / M. Prince, E. Albanese, M. Guerchet, M. Prina // Alzheimer's Disease International (ADI): World Alzheimer Report 2014. – London. – 2014. – 104 p.
- 2) Ушаков, Ю. В. Душевное здоровье и пациенты старшего возраста: цифры и факты / под ред. Ю. В. Ушакова, П.А. Баранова, А.Н. Боголеповой и др. // Современная терапия в психиатрии и неврологии. – 2014. – №1. – С. 6.
- 3) Kotelnikova, R. A. Nanobionics of pharmacologically active derivatives of fullerene C₆₀ / R. A. Kotelnikova, G. N. Bogdanov, E. C. Frog et al. // Journal of Nanoparticle Research. – 2003. – V. 5. – P. 561–566.
- 4) Andreev, I. Penetration of fullerene C₆₀ derivatives through biological membranes / I. Andreev, A. Petrukhina, A. Garmanova et al. // Fullerenes Nanotubes and Carbon Nanostructures. – 2008. – V. 16, Iss. 2. – P. 89–102.
- 5) Bedrov, D. Passive transport of C₆₀ fullerenes through a lipid membrane: a molecular dynamics simulation study / D. Bedrov, G. D. Smith, H. Davande, L. Li // J. Phys. Chem. – 2008. – V. 112, Iss. 7. – P. 2078–2084.
- 6) Полетаева, Д. А. Оценка мембранотропности водорастворимых полизамещенных производных фуллеренов люминесцентными методами / Д. А. Полетаева, Р. А. Котельникова, Д. В. Мищенко, А. Ю. Рыбкин, **А. В. Смолина**, И. И. Файнгольд, П. А. Трошин, А. Б. Корнев, Е. А. Хакина, А. И. Котельников // Российские нанотехнологии. – 2012. – Т.7, № 3-4. – С. 64–68.

- 7) Liu, Q. C70-carboxyfullerenes as efficient antioxidants to protect cells against oxidative-induced stress / Q. Liu, X. Zhang, X. Zhang et al. // *ACS Appl Mater Interfaces*. – 2013. – V. 5, Iss. 21. – P. 11101–11107.
- 8) Bozdaganyan, M. E. Comparative computational study of interaction of C60-fullerene and tris-malonyl-C60-fullerene isomers with lipid bilayer: relation to their antioxidant effect / M. E. Bozdaganyan, P. S. Orekhov, A. K. Shaytan, K. V. Shaitan // *PLoS One*. – 2014. – V. 9, Iss. 7. – P. e102487.
- 9) Nakamura, E. Functionalized Fullerene as an Artificial Vector for Transfection / E. Nakamura, H. Isobe, N. Tomita et al. // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2000. – V. 39, Iss. 23. – P. 4254–4257.
- 10) Andreev, I. M. Amino-acid derivatives of fullerene C₆₀ behave as lipophilic ions penetrating through biomembranes / I. M. Andreev, V. S. Romanova, A. O. Petrukhina, S. M. Andreev // *Physics of the Solid State*. – 2002. – V. 44, Iss. 4. – P. 683–685.
- 11) Ashcroft, J. M. Fullerene (C₆₀) immunoconjugates: interaction of water-soluble C₆₀ derivatives with the murine anti-gp240 melanoma antibody / J. M. Ashcroft, D. A. Tsybouski, K. B. Hartman et al. // *Chem Commun (Camb)*. – 2006. – Iss. 28. – P. 3004–3006.
- 12) Chen, Y. Synthesis and characterization of fullerol derived from C60(n-) precursors / Y. Chen, R.-F. Cai, S. Chen, Z.-E. Huang // *Journal of Physics and Chemistry of Solids*. – 2001. – V. 62, Iss. 5. – P. 999–1001.
- 13) Troshina, O. A. Chlorofullerene C₆₀Cl₆: a precursor for straightforward preparation of highly water-soluble polycarboxylic fullerene derivatives active against HIV / O. A. Troshina, P. A. Troshin, A. S. Peregudov et al. // *Org. Biomol. Chem.* – 2007. – V. 5, Iss. 17. – P. 2783–2791.
- 14) Matsubayashi, K. One-step Synthesis of Water-soluble Fullerenols Bearing Nitrogen-containing Substituents / K. Matsubayashi, K. Kokubo, H.

- Tategaki et al. // *Fullerenes Nanotubes And Carbon Nanostructures*. – 2009. – V. 17, Iss. 4. – P. 440–456.
- 15) Friedman, S. H. Inhibition of the HIV-1 protease by fullerene derivatives: Model building studies and experimental verification / S. H. Friedman, D. L. DeCamp, R. P. Sijbesma et al. // *J. Am. Chem. Soc.* – 1993. – V. 115, Iss. 15. – P. 6506–6509.
- 16) Schuster, D. I. Anti-human immunodeficiency virus activity and cytotoxicity of derivatized buckminsterfullerenes / D. I. Schuster, S. R. Wilson, R. F. Schinazi // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 1996. – V. 6, Iss. 11. – P. 1253–1256.
- 17) Nakamura, E. Biological Activity of Water-Soluble Fullerenes. Structural Dependence of DNA Cleavage, Cytotoxicity and Enzyme Inhibitory Activities Including HIV-Protease Inhibition / E. Nakamura, H. Tokuyama, S. Yamago et al. // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* – 1996. – V. 69, Iss. 8. – P. 2143–2151.
- 18) Marcorin, G. L. Design and synthesis of novel [60]fullerene derivatives as potential HIV aspartic protease inhibitors / G. L. Marcorin, T. Da Ros, S. Castellano et al. // *Org. Lett.* – 2000. – V. 2, Iss. 25. – P. 3955–3958.
- 19) Котельникова, Р. А. Антиоксидантные свойства водорастворимых аминокислотных производных фуллеренов и их роль в ингибировании герпесвирусной инфекции / Р. А. Котельникова, И. И. Файнгольд, Д. А. Полетаева, Д. В. Мищенко, В. С. Романова, В. Н. Штолько, Г. Н. Богданов, А. Ю. Рыбкин, Е. С. Фрог, **А. В. Смолина**, А. А. Куш, Н. Е. Федорова, А. И. Котельников // *Известия Академии наук. Сер. Химическая*. – 2011. – № 6. – С. 1146–1150.
- 20) Pantarotto, D. Solid-phase synthesis of fullerene-peptides / D. Pantarotto, A. Bianco, F. Pellarini et al. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2002. – V. 124, Iss. 42. – P. 12543–12549.

- 21) Da Ros, T. Easy Access to Water-Soluble Fullerene Derivatives via 1,3-Dipolar Cycloadditions of Azomethine Ylides to C(60) / T. Da Ros, M. Prato, F. Novello et al. // *J. Org. Chem.* – 1996. – V. 61. Iss. 25. – P. 9070–9072.
- 22) Mashino, T. Inhibition of *E. coli* growth by fullerene derivatives and inhibition mechanism / T. Mashino, K. Okuda, T. Hirota et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 1999. – V. 9, Iss. 20. – P. 2959–2962.
- 23) Mashino, T. Antibacterial and antiproliferative activity of cationic fullerene derivatives / T. Mashino, D. Nishikawa, K. Takahashi et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2003. – V. 13, Iss. 24. – P. 4395–4397.
- 24) Illescas, B. M. Synthesis of water soluble fulleropyrrolidines bearing biologically active arylpiperazines / B. M. Illescas, R. Martinez-Alvarez, J. Fernandez-Gadeab, N. Martina // *Tetrahedron.* – 2003. – Iss. 59. – P. 6569–6577.
- 25) Kornev, A. B. Facile preparation of amine and amino acid adducts of [60]fullerene using chlorofullerene C₆₀Cl₁₆ as a precursor / A. B. Kornev, E. A. Khakina, S. I. Troyanov et al. // *Chem Commun (Camb).* – 2012. – V. 48, Iss. 44. – P. 5461–5463.
- 26) Hilder, T. A. Binding of fullerenes and nanotubes to MscL / T. A. Hilder, P. Ridone, Y. Nakayama et al. // *Sci Rep.* – 2014. – V. 4. – P. 5609.
- 27) Ballatore, M. B. Synthesis, spectroscopic properties and photodynamic activity of porphyrin-fullerene C₆₀ dyads with application in the photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* / M. B. Ballatore, M. B. Spesia, M. E. Milanesio, E. N. Durantini // *Eur J Med Chem.* – 2014. – V. 83C. – P. 685–694.
- 28) Chaudhuri, P. Fullerenol-cytotoxic conjugates for cancer chemotherapy / P. Chaudhuri, A. Paraskar, S. Soni et al. // *ACS Nano* – 2009. – V. 3, Iss.9. – P. 2505–2514.

- 29) Krusic, P. J. Radical reactions of C₆₀ / P. J. Krusic, E. Wasserman, P. N. Keizer et al. // *Science*. – 1991. – V. 254, Iss. 5035. – P. 1183–1185.
- 30) Ikeda, A. Induction of cell death by photodynamic therapy with water-soluble lipid-membrane-incorporated [60]fullerene / A. Ikeda, Y. Doi, K. Nishiguchi et al. // *Org. Biomol. Chem.* – 2007. – V. 5, Iss. 8. – P. 1158–1160.
- 31) Markovic, Z. Biomedical potential of the reactive oxygen species generation and quenching by fullerenes (C₆₀) / Z. Markovic, V. Trajkovic // *Biomaterials*. – 2008. – V. 29, Iss. 26. – P. 3561–3573.
- 32) Liao, F. Anticancer effects of fullerene [C60] included in polyethylene glycol combined with visible light irradiation through ROS generation and DNA fragmentation on fibrosarcoma cells with scarce cytotoxicity to normal fibroblasts / F. Liao, Y. Saitoh, N. Miwa // *Oncol Res.* – 2011. – V. 19, Iss. 5. – P. 203–216.
- 33) Ikeda, A. Cyclodextrin complexed [60]fullerene derivatives with high levels of photodynamic activity by long wavelength excitation / A. Ikeda, T. Iizuka, N. Maekubo et al. // *ACS Med Chem Lett.* – 2013. – V. 4, Iss. 8. – P. 752–756.
- 34) Котельников, А. И. Фотодинамическая активность гибридной наноструктуры на основе поликатионного производного фуллерепа и фталоцианинового красителя фотосенса / А. И. Котельников, А. Ю. Рыбкин, Н. С. Горячев и др. // *Доклады Академии наук*. – 2013. – Т. 452, № 4. – С. 408–412.
- 35) Kotelnikov, A. I. Hybrid photoactive fullerene derivative-ruboxyl nanostructures for photodynamic therapy / A. I. Kotelnikov, A. Yu. Rybkin, E. A. Khakina et al. // *Org Biomol Chem.* – 2013. – V. 11, Iss. 26. – P. 4397–4404.
- 36) Kornev, A. V. Synthesis and biological activity of a novel water-soluble methano[60]fullerene tetracarboxylic derivative / A. V. Kornev, A.

- S. Peregodov, V. M. Martinenko et al. // *Mendeleev Communications*. – 2013. – V. 23, Iss. 6. – C. 323–325.
- 37) Meng, J. Biological characterizations of [Gd@C₈₂(OH)₂₂]n nanoparticles as fullerene derivatives for cancer therapy / J. Meng, X. Liang, X. Chen, Y. Zhao // *Integr Biol (Camb)*. – 2013. – V. 5, Iss. 1. – P. 43–47.
- 38) Wang, I. C. C₆₀ and water-soluble fullerene derivatives as antioxidants against radical-initiated lipid peroxidation / I. C. Wang, L. A. Tai, D. D. Lee et al. // *J. Med. Chem.* – 1999. – V. 42, Iss. 22. – P. 4614–4620.
- 39) Lai, H. S. Free radical scavenging activity of fulleranol on the ischemia-reperfusion intestine in dogs / H. S. Lai, W. J. Chen, L. Y. Chiang // *World J. Surg.* – 2000. – V. 24, Iss. 4. – P. 450–454.
- 40) Ali, S. S. A biologically effective fullerene (C₆₀) derivative with superoxide dismutase mimetic properties / S. S. Ali, J. I. Hardt, K. L. Quick et al. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2004. – V. 37, Iss. 8. – P. 1191–1202.
- 41) Allen, N. S. Antioxidant capacity of novel amine derivatives of buckminsterfullerene: determination of inhibition rate constants in a model oxidation system / N. S. Allen, E. B. Zeynalov, K. Taylor, P. Birkett // *Polymer Degradation and Stability*. – 2009. – V. 94, Iss. 11. – P. 1932–1940.
- 42) Andrievsky, G. V. Peculiarities of the antioxidant and radioprotective effects of hydrated C₆₀ fullerene nanostructures in vitro and in vivo / G. V. Andrievsky, V. I. Bruskov, A. A. Tykhomyrov, S. V. Gudkov // *Free Radic. Biol. Med.* – 2009. – V. 47, Iss. 6. – P. 786–793.
- 43) Kadowaki, A. The antioxidative effect of fullerenes during the peroxidation of methyl linoleate in toluene / A. Kadowaki, S. Iwamoto, R. Yamauchi // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 2012. – V. 76, Iss. 1. – P. 212–214.
- 44) Pradhan, A. Polyhydroxy fullerene binds cadmium ions and alleviates oxidative stress induced by metals in yeasts / A. Pradhan, J. P. Pinheiro, S.

- Seena et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2014. – V. 80, Iss. 18. – P. 5874–5881.
- 45) Liu, Q. Protective effect of C70-carboxyfullerene against oxidative-induced stress on postmitotic muscle cells / Q. Liu, J. Zheng, M. Guan et al. // *ACS Appl Mater Interfaces.* – 2013. – V. 5, Iss. 10. – P. 4328–4333.
- 46) Huang, H. M. Blockage of amyloid beta peptide-induced cytosolic free calcium by fullerenol-1, carboxylate C₆₀ in PC12 cells / H. M. Huang, H. C. Ou, S. J. Hsieh, L. Y. Chiang // *Life Sci.* – 2000. – V. 66, Iss.16. – P. 1525–1533.
- 47) Ali, S. S. SOD Activity of carboxyfullerenes predicts their neuroprotective efficacy: a structure-activity study / S. S. Ali, J. I. Hardt, L. L. Dugan // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.* – 2008. – V. 4, Iss.4. – P. 283–294.
- 48) Basso, A. S. Reversal of axonal loss and disability in a mouse model of progressive multiple sclerosis / A. S. Basso, D. Frenkel, F. J. Quintana et al. // *Journal of Clinical Investigation.* – 2008. – V. 118, Iss. 4. – P. 1532–1543.
- 49) Pastorin, G. Design and activity of cationic fullerene derivatives as inhibitors of acetylcholinesterase / G. Pastorin, S. Marchesan, J. Hoebeke et al. // *Org. Biomol. Chem.* – 2006. – V. 4, Iss. 13. – P. 2556–2562.
- 50) Файнгольд, И. И. Гибридные соединения на основе фуллерена C₆₀ / И. И. Файнгольд, Р. А. Котельникова, Н. П. Коновалова – Саарбрюккен, Германия: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2011. – 112 с.
- 51) Kim, J. E. Fullerene inhibits beta-amyloid peptide aggregation / J. E. Kim, M. Lee // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – V. 303, Iss. 2. – P. 576–579.
- 52) Podolski, I. Y. Effects of hydrated forms of C₆₀ fullerene on amyloid 1-peptide fibrillization in vitro and performance of the cognitive task / I. Y.

- Podolski, Z. A. Podlubnaya, E. A. Kostenko et al. // *J. Nanosci. Nanotechnol.* – 2007. – V. 7, Iss. 4–5. – P. 1479–1485.
- 53) Marsagishvili, L. G. Effect of Fullerenes C₆₀ on X-Protein Amyloids / L. G. Marsagishvili, A. G. Bobylev, M. D. Shpagina et al. // *Biophysics.* – V. 54, Iss. 2. – 2009. – P. 135–138.
- 54) Бобылев, А. Г. Действие нитропроизводных фуллерена C₆₀ на амилоидные фибриллы Aβ(1-42)-пептида мозга и мышечного X-белка / А. Г. Бобылев, Л. Г. Марсагишвили, М. Д. Шпагина и др. // *Биофизика.* – 2010. – Т. 55, № 3. – С. 394–399.
- 55) Dugan, L. L. Carboxyfullerene as neuroprotective agents / L. L. Dugan, D. M. Turetsky, C. Du et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – V. 94, Iss. 17. – P. 9434–9439.
- 56) Jin, H. Polyhydroxylated C(60), fullerlenols, as glutamate receptor antagonists and neuroprotective agents / H. Jin, W. Q. Chen, X. W. Tang et al. // *J. Neurosci. Res.* – 2000. – V. 62, Iss. 4. – P. 600–607.
- 57) Lotharius, J. Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons / J. Lotharius, L. L. Dugan, K. L. O'Malley // *J. Neurosci.* – 1999. – V. 19, Iss. 4. – P. 1284–1293.
- 58) Dugan, L. L. Fullerene-based antioxidants and neurodegenerative disorders / L. L. Dugan, E. G. Lovett, K. L. Quick et al. // *Parkinsonism. Relat. Disord.* – 2001. – V. 7, Iss. 3. – P. 243–246.
- 59) Kornev, A. B. Synthesis and antiviral activity of highly water-soluble polycarboxylic derivatives of [70]fullerene / A. B. Kornev, A. S. Peregudov, V. M. Martynenko, et al. // *Chem. Commun. (Camb).* – 2011. – V. 47, Iss. 29. – P. 8298–8300.
- 60) Khakina, E. A. Highly selective reactions of C₆₀Cl₁₆ with thiols for synthesis of functionalized [60]fullerene derivatives / E. A. Khakina, A. A. Yurkova, A. S. Peregudov et al. // *Chem. Commun (Camb).* – 2012. – V. 48, Iss. 57. – P. 7158–7160.

- 61) Sayes, C. M. The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes / C. M. Sayes, J. D. Fortner, W. Guo et al. // *Nano Letters*. – 2004. – V. 4, Iss. 10. – P. 1881–1887.
- 62) Oberdorster, E. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass / E. Oberdorster // *Environ. Health Perspect.* – 2004. – V. 112, Iss. 10. – P. 1058–1062.
- 63) Zhu, S. Toxicity of an engineered nanoparticle (fullerene, C60) in two aquatic species, *Daphnia* and fathead minnow / S. Zhu, E. Oberdorster, M. L. Haasch // *Mar. Environ. Res.* – 2006. – Iss. 62. – P. S5–S9.
- 64) Kovoichich, M. Comparative toxicity of C₆₀ aggregates toward mammalian cells: role of tetrahydrofuran (THF) decomposition / M. Kovoichich, B. Espinasse, M. Auffan et al. // *Environ. Sci. Technol.* – 2009. – V. 43, Iss. 16. – P. 6378–6384.
- 65) Yamago, S. In vivo biological behavior of a water-miscible fullerene: 14C labeling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity / S. Yamago, H. Tokuyama, E. Nakamura et al. // *Chem Biol.* – 1995. – V. 2, Iss. 6. – P. 385–389.
- 66) Monteiro-Riviere, N. A. Lack of hydroxylated fullerene toxicity after intravenous administration to female Sprague-Dawley rats / N. A. Monteiro-Riviere, K. E. Linder, A. O. Inman et al. // *J. Toxicol. Environ. Health A.* – 2012. – V. 75, Iss. 7. – P. 367–373.
- 67) Quick, K. L. A carboxyfullerene SOD mimetic improves cognition and extends the lifespan of mice / K. L. Quick, S. S. Ali, R. Arch et al. // *Neurobiol. Aging.* – 2008. – V. 29, Iss. 1. – P. 117–128.
- 68) Baati, T. The prolongation of the lifespan of rats by repeated oral administration of [60]fullerene / T. Baati, F. Bourasset, N. Gharbi et al. // *Biomaterials.* – 2012. – V. 33, Iss. 19. – P. 4936–4946.
- 69) Ji, Z. Q. Biodistribution and tumor uptake of C₆₀(OH)_x in mice / Z. Q. Ji, H. Sun, H. Wang et al. // *J. Nanopart. Res.* – 2006. – Iss. 8. – P. 53–63.

- 70) Немов, Р. С. Общие основы психологии / Р. С. Немов – М: Владос, 2010. – 687 с.
- 71) Wenk, G. L. Neuropathologic changes in Alzheimer's disease / G. L. Wenk // J. Clin. Psychiatry. – 2003. – V. 64, Suppl. 9. – P. 7–10.
- 72) Farooqui, A. A. Glutamate Receptors and Neurological Disorders / In Neurochemical Aspects of Excitotoxicity / A. A. Farooqui, W.-Y. Ong, L. A. Horrocks – New York: Springer, 2008. – P. 161–203.
- 73) Hardy, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics / J. Hardy, D. J. Selkoe // Science. – 2002. – V. 297, Iss. 5580. – P. 353–356.
- 74) Barnes, D. E. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence / D. E. Barnes, K. Yaffe // Lancet Neurol. – 2011. – V. 10, Iss. 9. – P. 819–828.
- 75) Davies, P. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease / P. Davies, A. J. Maloney // Lancet. – 1976. – V. 2, Iss. 8000. – P. 1403.
- 76) Евсегнеев, Р. А. Болезнь Альцгеймера и другие деменции пожилого возраста: есть ли изменения к лучшему? / Р. А. Евсегнеев. – Минск: професс. издания. – 2011. – Т. 1. – С. 57–66.
- 77) Васенина, Е. Е. Комбинированная терапия болезни Альцгеймера / Е. Е. Васенина, Н. А. Трусова, О. А. Ганькина, О. С. Левин // Совр. тер. в псих. и неврол. – 2013. – Т. 2. – С. 10–14.
- 78) Hardy, J. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease / J. Hardy, D. Allsop // Trends. Pharmacol. Sci. – 1991. – V. 12, Iss. 10. – P. 383–388.
- 79) Mudher, A. Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands? / A. Mudher, S. Lovestone // Trends. Neurosci. – 2002. – V. 25, Iss. 1. – P. 22–26.

- 80) Zafrilla, P. Oxidative stress in Alzheimer patients in different stages of the disease / P. Zafrilla, J. Mulero, J. M. Xandri et al. // *Curr. Med. Chem.* – 2006. – V. 13, Iss. 9. – P. 1075–1083.
- 81) Mattson, M. P. Oxidative stress, perturbed calcium homeostasis, and immune dysfunction in Alzheimer's disease / M. P. Mattson // *J Neurovirol.* – 2002. – V. 8, Iss. 6. – P. 539–550.
- 82) Nistor, M. Alpha- and beta-secretase activity as a function of age and beta-amyloid in Down syndrome and normal brain / M. Nistor, M. Don, M. Parekh et al. // *Neurobiol. Aging.* – 2007. – V. 28, Iss. 10. – P. 1493–1506.
- 83) Lott, I. T. Alzheimer disease and Down syndrome: factors in pathogenesis / I. T. Lott, E. Head // *Neurobiol. Aging.* – 2005. – V. 26, Iss. 3. – P. 383–389.
- 84) Polvikoski, T. Apolipoprotein E, dementia, and cortical deposition of beta-amyloid protein / T. Polvikoski, R. Sulkava, M. Haltia et al. // *N. Engl. J. Med.* – 1995. – V. 333, Iss. 19. – P. 1242–1247.
- 85) Holmes, C. Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial / C. Holmes, D. Boche, D. Wilkinson et al. // *Lancet.* – 2008. – V. 372, Iss. 9634. – P. 216–223.
- 86) Iqbal, K. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies/ K. Iqbal, C. Alonso Adel, S. Chen et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2005. – V. 1739, Iss. 2–3. – P. 198–210.
- 87) Marksteiner, J. Cerebrospinal fluid biomarkers for diagnosis of Alzheimer's disease: beta-amyloid(1-42), tau, phospho-tau-181 and total protein / J. Marksteiner, H. Hinterhuber, C. Humpel // *Drugs Today.* – 2007. – V. 43, Iss. 6. – P. 423–431.
- 88) Talantova, M. A β induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation and synaptic loss / M. Talantova, S. Sanz-Blasco,

- X. Zhang et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2013. – V. 110, Iss. 27. – P. E2518–E2527.
- 89) Riederer P. From benefit to damage. Glutamate and advanced glycation end products in Alzheimer brain / P. Riederer, S. Hoyer // *J. Neural. Transm.* – 2006. – V. 113, Iss. 11. – P. 1671–1677.
- 90) Demuro, A. Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease / A. Demuro, I. Parker, G. E. Stutzmann // *J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 285, Iss. 17. – P. 12463–12468.
- 91) Morley, J. E. The senescence accelerated mouse (SAMP8) as a model for oxidative stress and Alzheimer's disease / J. E. Morley, H. J. Armbrecht, S. A. Farr, V. B. Kumar // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – V. 1822, Iss. 5. – P. 650–656.
- 92) Massaad, C. A. Neuronal and vascular oxidative stress in Alzheimer's disease / C. A. Massaad // *Curr. Neuropharmacol.* – 2011. – V. 9, Iss. 4. – P. 662–673.
- 93) Massaad, C. A. Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory / C. A. Massaad, E. Klann // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2011. – V. 14, Iss. 10. – P. 2013–2054.
- 94) Snyder, E. M. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta / E. M. Snyder, Y. Nong, C. G. Almeida et al. // *Nat. Neurosci.* – 2005. – V. 8, Iss. 8. – P. 1051–1058.
- 95) Morishita, W. Distinct triggering and expression mechanisms underlie LTD of AMPA and NMDA synaptic responses / W. Morishita, H. Marie, R. C. Malenka // *Nat. Neurosci.* – 2005. – V. 8, Iss. 8. – P. 1043–1050.
- 96) Butterfield, D. A. Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment / D. A. Butterfield, T. Reed, S. F. Newman, R. Sultana // *Free Radic. Biol. Med.* – 2007. – V. 43, Iss. 5. – P. 658–677.

- 97) Kilbride, S. M. Age-related changes in H₂O₂ production and bioenergetics in rat brain synaptosomes / S. M. Kilbride, J. E. Telford, G. P. Davey // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – V. 1777, Iss. 7–8. – P. 783–788.
- 98) Newington, J. T. Amyloid beta resistance in nerve cell lines is mediated by the Warburg effect / J. T. Newington, A. Pitts, A. Chien et al. // *PLoS ONE*, Edited by Hitoshi Okazawa. – 2011. – V. 6, Iss. 4. – P. e19191.
- 99) Viña, J. Antioxidant pathways in Alzheimer's disease: possibilities of intervention / J. Viña, A. Lloret, E. Giraldo et al. // *Curr. Pharm. Des.* – 2011. – V. 17, Iss. 35. – P. 3861–3864.
- 100) Skovronsky, D. M. Detection of a novel intraneuronal pool of insoluble amyloid beta protein that accumulates with time in culture / D. M. Skovronsky, R. W. Doms, V. M. Lee // *J. Cell. Biol.* – 1998. – V. 141, Iss. 4. – P. 1031–1039.
- 101) Lee, S. J. A detergent-insoluble membrane compartment contains A beta in vivo / S. J. Lee, U. Liyanage, P. E. Bickel et al. // *Nat. Med.* – 1998. – V. 4, Iss. 6. – P. 730–734.
- 102) Knauer, M. F. Intracellular accumulation and resistance to degradation of the Alzheimer amyloid A β protein / M. F. Knauer, B. Soreghan, D. Burdick et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* – 1992. – V. 89. – P. 7437–7441.
- 103) Ahlander, M. A behavioral analysis of the spatial learning deficit induced by the NMDA receptor antagonist MK-801 (dizocilpine) in the rat / M. Ahlander, I. Misane, P. A. Schott, S. O. Ogren // *Neuropsychopharmacology.* – 1999. – V. 21, Iss. 3. – P. 414–426.
- 104) Whishaw, I. Q. Immediate and long-lasting effects of MK-801 on motor activity, spatial navigation in a swimming pool and EEG in the rat / I. Q. Whishaw, R. N. Auer // *Psychopharmacology (Berl).* – 1989. – V. 98, Iss. 4. – P. 500–507.

- 105) Hollmann, M. Cloned glutamate receptors / M. Hollmann, S. Heinemann // *Annu. Rev. Neurosci.* – 1994. – V. 17. – P. 31–108.
- 106) Pin, J. P. Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors / J. P. Pin, T. Galvez, L. Prézeau // *Pharmacol. Ther.* – 2003. – V. 98, Iss. 3. – P. 325–354.
- 107) Болдырев, А. А. Функциональные взаимодействия между глутаматными рецепторами разных классов / А. А. Болдырев // *Бюл. экспер. биол. и мед.* – 2000. – Т. 130, № 9. – С. 244–252.
- 108) Walker, C. S. A novel *Conus* snail polypeptide causes excitotoxicity by blocking desensitization of AMPA receptors / C. S. Walker, S. Jensen, M. Ellison et al. // *Curr. Biol.* – 2009. – V. 19, Iss. 11. – P. 900–908.
- 109) McBain, C. J. Heterogeneity of synaptic glutamate receptors on CA3 stratum radiatum interneurons of rat hippocampus / C. J. McBain, R. Dingledine // *J. Physiol.* – 1993. – Iss. 462. – P. 373–392.
- 110) Holm, M. M. Structural determinants of agonist-specific kinetics at the ionotropic glutamate receptor 2 / M. M. Holm, M. L. Lunn, S. F. Traynelis et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2005. – V. 102, Iss. 34. – P. 12053–12058.
- 111) Sheng, M. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity: major unanswered questions / M. Sheng, S. Hyoungh Lee // *Neurosci. Res.* – 2003. – V. 46, Iss. 2. – P. 127–134.
- 112) Joshi, P. P. AMPA receptor: a review / P. P. Joshi, M. Moradipour, A. G. Nerkar, S. D. Sawant // *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* – 2012. – V. 4, Iss. 3. – P. 39–44.
- 113) Francotte, P. In Search of Novel AMPA Potentiators / P. Francotte, P. De Tullio, P. Fraikin et al. // *Recent Patents on CNS Drug Discovery.* – 2006. – V. 1, Iss. 3. – P. 239–246.
- 114) Wisden, W. Mammalian ionotropic glutamate receptors / W. Wisden, P. H. Seeburg // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 1993. – V. 3, Iss. 3. – С. 291–298.

- 115) Scannevin, R. H. Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses / R. H. Scannevin, R. L. Huganir // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2000. – V. 1, Iss. 2. – P. 133–141.
- 116) Malinow, R. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity / R. Malinow, R. C. Malenka // *Annu. Rev. Neurosci.* – 2002. – V. 25. – P. 103–126.
- 117) Bliss, T. V. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus / T. V. Bliss, G. L. Collingridge // *Nature.* – 1993. – V. 361, Iss. 6407. – P. 31–39.
- 118) Malenka, R. C. Long-term potentiation - a decade of progress? / R. C. Malenka, R. A. Nicoll // *Science.* – 1999. – V. 285, Iss. 5435. – P. 1870–1874.
- 119) Chen, C. Molecular genetic analysis of synaptic plasticity, activity-dependent neural development, learning, and memory in the mammalian brain / C. Chen, S. Tonegawa // *Annu. Rev. Neurosci.* – 1997. – Iss. 20. – P. 157–184.
- 120) Staubli, U. Facilitation of glutamate receptors enhances memory / U. Staubli, G. Rogers, G. Lynch // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1994. – V. 91, Iss. 2. – P. 777–781.
- 121) O’Neill, M. J. AMPA receptor potentiators for the treatment of CNS disorders / M. J. O’Neill, D. Bleakman, D. M. Zimmerman, E. S. Nisenbaum // *Curr. Drug. Targets. CNS Neurol. Disord.* – 2004. – V. 3, Iss. 3. – P. 181–194.
- 122) Lynch, G. Ampakines and the threefold path to cognitive enhancement / G. Lynch, C. M. Gall // *Trends Neurosci.* – 2006. – V. 29, Iss. 10. – P. 554–562.
- 123) Bleakman, D. AMPA receptors in the therapeutic management of depression / D. Bleakman, A. Alt, J. M. Witkin // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* – 2007. – V. 6, Iss. 2. – P. 117–126.

- 124) Goebel, D. J. NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: a quantitative analysis of endogenous mRNA levels of NR1Com, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D and NR3A / D. J. Goebel, M. S. Poosch // *Brain Res. Mol. Brain Res.* – 1999. – V. 69, Iss. 2. – P. 164–170.
- 125) Dingledine, R. The glutamate receptor ion channels / R. Dingledine, K. Borges, D. Bowie, S. F. Traynelis // *Pharmacol. Rev.* – 1999. – V. 51, Iss. 1. – P. 7–61.
- 126) Wenthold, R. J. Trafficking of NMDA receptors / R. J. Wenthold, K. Prybylowski, S. Standley et al. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2003. – Iss. 43. – P. 335–358.
- 127) Stephenson, F. A. Assembly and forward trafficking of NMDA receptors / F. A. Stephenson, S. L. Cousins, A. V. Kenny // *Mol. Membr. Biol.* – 2008. – V. 25, Iss. 4. – P. 311–320.
- 128) Das, S. Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A / S. Das, Y. F. Sasaki, T. Rothe et al. // *Nature.* – 1998. – V. 393, Iss. 6683. – P. 377–381.
- 129) Sasaki, Y. F. Characterization and comparison of the NR3A subunit of the NMDA receptor in recombinant systems and primary cortical neurons / Y. F. Sasaki, T. Rothe, L. S. Premkumar et al. // *J. Neurophysiol.* – 2002. – V. 87, Iss. 4. – P. 2052–2063.
- 130) Pérez-Otaño, I. Endocytosis and synaptic removal of NR3A-containing NMDA receptors by PACSIN1/syndapin1 / I. Pérez-Otaño, R. Luján, S. J. Tavalin et al. // *Nat. Neurosci.* – 2006. – V. 9, Iss. 5. – P. 611–621.
- 131) Meddows, E. Identification of molecular determinants that are important in the assembly of N-methyl-D-aspartate receptors / E. Meddows, B. Le Bourdelles, S. Grimwood et al. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276, Iss. 22. – P. 18795–18803.

- 132) Paoletti, P. NMDA receptor subunits: function and pharmacology / P. Paoletti, J. Neyton // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2007. – V. 7, Iss. 1. – P. 39–47.
- 133) Johnson, J. W. Glycine potentiates the NMDA responses in cultured mouse brain neurons / J. W. Johnson, P. Asher // *Nature.* – 1987. – Iss. 325. – P. 529–531.
- 134) Hashimoto, A. Endogenous D-serine in rat brain: N-methyl-D-aspartate receptor-related distribution and aging / A. Hashimoto, T. Nishikawa, T. Oka, K. Takahashi // *J. Neurochem.* – 1993. – V. 60, Iss. 2. – P. 783–786.
- 135) Mothet, J. P. D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor / J. P. Mothet, A. T. Parent, H. Wolosker et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2000. – V. 97, Iss. 9. – P. 4926–4931.
- 136) Wieronska, J. M. The loss of glutamate-GABA harmony in anxiety disorders / J. M. Wieronska, K. Stachowicz, G. Nowak, A. Pilc / *In Anxiety Disorders*. Ed. by V. Kalinin. – 2011. – P. 138.
- 137) Ichinose, T. Ca²⁺-independent, but voltage- and activity-dependent regulation of the NMDA receptor outward K⁺ current in mouse cortical neurons / T. Ichinose, S. Yu, X. Q. Wang, S. P. Yu // *J. Physiol.* – 2003. – V. 551, Pt. 2. – P. 403–417.
- 138) Hardingham, G. E. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways / G. E. Hardingham, Y. Fukunaga, H. Bading // *Nat. Neurosci.* – 2002. – V. 5, Iss. 5. – P. 405–414.
- 139) Léveillé, F. Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors / F. Léveillé, F. El Gaamouch, E. Gouix et al. // *FASEB J.* – 2008. – V. 22, Iss. 12. – P. 4258–4271.

- 140) Lipton, S. A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders / S. A. Lipton, P. A. Rosenberg // *N. Engl. J. Med.* – 1994. – V. 330, Iss. 9. – P. 613–622.
- 141) Arundine, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity / M. Arundine, M. Tymianski // *Cell. Calcium.* – 2003. – V. 34, Iss. 4–5. – P. 325–337.
- 142) Ikonomidou, C. Neuronal death enhanced by N-methyl-D-aspartate antagonists / C. Ikonomidou, V. Stefovaska, L. Turski // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – V. 97, Iss. 23. – P. 12885–12890.
- 143) Tashiro, A. NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus / A. Tashiro, V. M. Sandler, N. Toni et al. // *Nature.* – 2006. – V. 442, Iss. 7105. – P. 929–933.
- 144) Winblad, B. Memantine in severe dementia: results of the 9M-Best Study (Benefit and efficacy in severely demented patients during treatment with memantine) / B. Winblad, N. Poritis // *Int. J. Geriatr. Psychiatry.* – 1999. – V. 14, Iss. 2. – P. 135–146.
- 145) Danysz, W. Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease—a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action / W. Danysz, C. G. Parsons, H. J. Mobius et al. // *Neurotox. Res.* – 2000. – V. 2, Iss. 2–3. – P. 85–97.
- 146) Parsons, C. G. Memantine and cholinesterase inhibitors: complementary mechanisms in the treatment of Alzheimer's disease / C. G. Parsons, W. Danysz, A. Dekundy, I. Pulte // *Neurotox. Res.* – 2013. – V. 24, Iss. 3. – P. 358–369.
- 147) Lacor, P. N. Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease / P. N. Lacor, M. C. Buniel, P. W. Furlow et al. // *J. Neurosci.* – 2007. – V. 27, Iss. 4. – P. 796–807.

- 148) De Felice, F. G. Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine / F. G. De Felice, P. T. Velasco, M. P. Lambert et al. // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Iss. 282. – P. 11590–11601.
- 149) Bettini, E. Identification and characterization of novel NMDA receptor antagonists selective for NR2A- over NR2B-containing receptors / E. Bettini, A. Sava, C. Griffante et al. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2010. – V. 335, Iss. 3. – P. 636–644.
- 150) Mosley, C. A. Quinazolin-4-one derivatives: A novel class of noncompetitive NR2C/D subunit-selective N-methyl-D-aspartate receptor antagonists / C. A. Mosley, T. M. Acker, K. B. Hansen et al. // *J. Med. Chem.* – 2010. – V. 53, Iss. 15. – P. 5476–5490.
- 151) Hansen, K. B. Structural and mechanistic determinants of a novel site for noncompetitive inhibition of GluN2D-containing NMDA receptors / K. B. Hansen, S. F. Traynelis // *J. Neurosci.* – 2011. – V. 31, Iss. 10. – P. 3650–3661.
- 152) Acker, T. M. Mechanism for noncompetitive inhibition by novel GluN2C/D N-methyl-D-aspartate receptor subunit-selective modulators / T. M. Acker, H. Yuan, K. B. Hansen et al. // *Mol Pharmacol.* – 2011. – V. 80, Iss. 5. – P. 782–795.
- 153) Beal, M. F. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? / M. F. Beal // *Ann. Neurol.* – 1992. – V. 31, Iss. 2. – P. 119–130.
- 154) Albin, R. L. Alternative excitotoxic hypotheses / R. L. Albin, J. T. Greenamyre // *Neurology.* – 1992. – V. 42, Iss. 4. – P. 733–738.
- 155) Khachaturian, Z. S. Calcium hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging / Z. S. Khachaturian // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1994. – Iss. 747. – P. 1–11.

- 156) Olney, J. W. New mechanisms of excitatory transmitter neurotoxicity / J. W. Olney // *J. Neural. Transm. Suppl.* – 1994. – Iss. 43. – P. 47–51.
- 157) Meldrum, B. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease / B. Meldrum, J. Garthwaite // *Trends Pharmacol. Sci.* – 1990. – V. 11, Iss. 9. – P. 379–387.
- 158) Leigh, P. N. Excitotoxicity in ALS / P. N. Leigh, B. S. Meldrum // *Neurology.* – 1996. – V. 47, Iss. 6, Suppl. 4. – P. S221–S227.
- 159) Farber, N. B. The glutamate synapse in neuropsychiatric disorders. Focus on schizophrenia and Alzheimer's disease / Farber N. B., Newcomer J. W., Olney J. W. // *Prog. Brain. Res.* – 1998. – Iss. 116. – P. 421–437.
- 160) Novelli, A. Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced / A. Novelli, J. A. Reilly, P. G. Lysko, R. C. Henneberry // *Brain Res.* – 1988. – V. 451, 1–2. – P. 205–212.
- 161) Pappolla, M. A. Evidence of oxidative stress and in vivo neurotoxicity of beta-amyloid in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a chronic oxidative paradigm for testing antioxidant therapies in vivo / M. A. Pappolla, Y. J. Chyan, R. A. Omar et al. // *Am. J. Pathol.* – 1998. – V. 152, Iss. 4. – P. 871–877.
- 162) Smith, M. A. Amyloid-beta deposition in Alzheimer transgenic mice is associated with oxidative stress / M. A. Smith, K. Hirai, K. Hsiao et al. // *J. Neurochem.* – 1998. – V. 70, Iss. 5. – P. 2212–2215.
- 163) Chakrabarti, S. Mitochondrial Dysfunction during Brain Aging: Role of Oxidative Stress and Modulation by Antioxidant Supplementation / S. Chakrabarti, S. Munshi, K. Banerjee et al. // *Aging Dis.* – 2011. – V. 2, Iss. 3. – P. 242–256.
- 164) Владимиров, Ю. А. Свободные радикалы в живых системах / Ю. А. Владимиров, О. А. Азизова, А. И. Деев и др. // *Итоги Науки и техники ВИНТИ АН СССР, сер. Биофизика.* – 1991. – № 29. – 250 с.

- 165) Han, D. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol / D. Han, F. Antunes, R. Canali et al. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278, Iss. 8. – P. 5557–5563.
- 166) Kellner, A. Autoantibodies against beta-amyloid are common in Alzheimer's disease and help control plaque burden / A. Kellner, J. Matschke, C. Bernreuther et al. // *Annals of neurology.* – 2009. – V. 1, Iss. 65. – P. 24–31.
- 167) Lloret, A. Amyloid- β toxicity and tau hyperphosphorylation are linked via RCAN1 in Alzheimer's disease / A. Lloret, M. C. Badia, E. Giraldo et al. // *J. Alzheimers Dis.* – 2011. – V. 27, Iss. 4. – P. 701–709.
- 168) Guo, Q. Increased vulnerability of hippocampal neurons from presenilin-1 mutant knock-in mice to amyloid beta-peptide toxicity: central roles of superoxide production and caspase activation / Q. Guo, L. Sebastian, B. L. Sopher et al. // *J. Neurochem.* – 1999. – V. 72, Iss. 3. – P. 1019–1029.
- 169) Keller, J. N. Impairment of glucose and glutamate transport and induction of mitochondrial oxidative stress and dysfunction in synaptosomes by amyloid beta-peptide: role of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal / J. N. Keller, Z. Pang, J. W. Geddes et al. // *J. Neurochem.* – 1997. – V. 69, Iss. 1. – P. 273–284.
- 170) Markesbery, W. R. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease / W. R. Markesbery // *Free Radical Biology and Medicine.* – 1997. – V. 23, Iss. 1. – P. 134–147.
- 171) Alessenko, A. V. Connection of lipid peroxide oxidation with the sphingomyelin pathway in the development of Alzheimer's disease / A. V. Alessenko, A. E. Bugrova, L. B. Dudnik // *Biochemical Society Transactions.* – 2004. – V. 32, Iss. 1. – P. 144–146.

- 172) Dykens, J. A. Mechanism of kainite toxicity to cerebellar neurons in vitro is analogous to reperfusion tissue injury / J. A. Dykens, A. Stern, E. Trenkner // *J. Neurochem.* – 1987. – Iss. 49. – P. 1222–1228.
- 173) Gonzalez-Zulueta, M. Manganese superoxide dismutase protects nNOS neurons from NMDA and nitric oxide-mediated neurotoxicity / M. Gonzalez-Zulueta, L. M. Ensz, G. Mukhina et al. // *J. Neurosci.* – 1998. – V. 18, Iss. 6. – P. 2040–2055.
- 174) Lafon-Cazal, M. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity / M. Lafon-Cazal, S. Pietri, M. Culcasi, J. Bockaert // *Nature.* – 1993. – V. 364, Iss. 6437. – P. 535–537.
- 175) Dugan, L. L. Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate / L. L. Dugan, S. L. Sensi, L. M. Canzoniero et al. // *J. Neurosci.* – 1995. – V. 15, Iss. 10. – P. 6377–6388.
- 176) Reynolds, I. J. Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation / I. J. Reynolds, T. G. Hastings // *J. Neurosci.* – 1995. – V. 15, Iss. 5, Pt. 1. – P. 3318–3327.
- 177) Huie, R. E. The reaction of NO with superoxide / R. E. Huie, S. Padmaja // *Free Radic. Res. Commun.* – 1993. – V. 18, Iss. 4. – P. 195–199.
- 178) Thomas, R. S. An antibody to the beta-secretase cleavage site on amyloid-beta-protein precursor inhibits amyloid-beta production / R. S. Thomas, J. E. Liddell, L. S. Murphy et al. // *Journal of Alzheimer's disease.* – 2006. – V. 4, Iss. 10. – P. 379–390.
- 179) Bridges, R. J. Increased excitotoxic vulnerability of cortical cultures with reduced levels of glutathione / R. J. Bridges, J. Y. Koh, C. G. Hatalski, C. W. Cotman // *Eur. J. Pharmacol.* – 1991. – V. 192, Iss. 1. – P. 199–200.
- 180) Marklund, N. Effects of the nitron radical scavengers PBN and S-PBN on in vivo trapping of reactive oxygen species after traumatic brain

- injury in rats / N. Marklund, T. Lewander, F. Clausen, L. Hillered // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2001. – V. 21, Iss. 11. – P. 1259–1267.
- 181) McIntosh, T. K. The novel 21-aminosteroid U74006F attenuates cerebral edema and improves survival after brain injury in the rat / T. K. McIntosh, M. Thomas, D. Smith, M. Banbury // *J. Neurotrauma.* – 1992. – V. 9, Iss. 1. – P. 33–46.
- 182) Fici, G. J. Effects of lazaroids and a peroxynitrite scavenger in a cell model of peroxynitrite toxicity / G. J. Fici, J. S. Althaus, P. F. VonVoigtlander // *Free Radic. Biol. Med.* – 1997. – V. 22, Iss. 1–2. – P. 223–228.
- 183) Müller, W. E. Mitochondrial dysfunction: common final pathway in brain aging and Alzheimer's disease-therapeutic aspects / W. E. Müller, A. Eckert, C. Kurz et al. // *Mol. Neurobiol.* – 2010. – V. 41, Iss. 2–3. – P. 159–171.
- 184) Facecchia, K. Oxidative toxicity in neurodegenerative diseases: role of mitochondrial dysfunction and therapeutic strategies / K. Facecchia, L. A. Fochesato, S. D. Ray et al. // *J. Toxicol.* – 2011. – Article ID 683728, 12 p. <http://www.hindawi.com/journals/jt/2011/683728/>
- 185) Palacios, H. H. Mitochondrion-specific antioxidants as drug treatments for Alzheimer disease / H. H. Palacios, B. B. Yendluri, K. Parvathaneni et al. // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* – 2011. – V. 10, Iss. 2. – P. 149–162.
- 186) Dumont, M. Mitochondria and antioxidant targeted therapeutic strategies for Alzheimer's disease / M. Dumont, M. T. Lin, M. F. Beal // *J. Alzheimers Dis.* – 2010. – Iss. 20, Suppl. 2. – P. S633– S643.
- 187) Ma, T. Amyloid β -induced impairments in hippocampal synaptic plasticity are rescued by decreasing mitochondrial superoxide / T. Ma, C. A. Hoeffler, H. Wong et al. // *J. Neurosci.* – 2011. – V. 31, Iss. 15. – P. 5589–5595.

- 188) Skulachev, V. P. Mitochondria-targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases / V. P. Skulachev // *J. Alzheimers Dis.* – 2012. – V. 28, Iss. 2. – P. 283–289.
- 189) Manczak, M. Mitochondria-targeted antioxidants protect against amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease neurons / Manczak M., Mao P., Calkins M. J. et al. // *Alzheimers Dis.* – 2010. – Iss. 20, Suppl. 2. – P. S609–S631.
- 190) Perez, S. E. Dimebon alters hippocampal amyloid pathology in 3xTg-AD mice / S. E. Perez, M. Nadeem, K. R. Sadleir et al. // *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* – 2012. – V. 4, Iss. 3. – P. 115–127.
- 191) Calkins, M. J. Mitochondria-Targeted Antioxidant SS31 Prevents Amyloid Beta-Induced Mitochondrial Abnormalities and Synaptic Degeneration in Alzheimer's Disease / M. J. Calkins, M. Manczak, P. H. Reddy // *Pharmaceuticals (Basel)*. – 2012. – V. 5, Iss. 10. – P. 1103–1119.
- 192) Kapay, N. A. Mitochondria-targeted plastoquinone antioxidant SkQ1 prevents amyloid- β -induced impairment of long-term potentiation in rat hippocampal slices / N. A. Kapay, O. V. Popova, N. K. Isaev et al. // *J. Alzheimers Dis.* – 2013. – V. 36, Iss. 2. – P. 377–383.
- 193) Stefanova, N. A. Alzheimer's disease-like pathology in senescence-accelerated OXYS rats can be partially retarded with mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 / N. A. Stefanova, N. A. Muraleva, V. P. Skulachev, N. G. Kolosova // *J. Alzheimers Dis.* – 2014. – V. 38, Iss. 3. – P. 681–694.
- 194) Bortolato, M. Monoamine oxidase inactivation: from pathophysiology to therapeutics / M. Bortolato, K. Chen, J. C. Shih // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2008. – V. 60, Iss. 13-14. – P. 1527–1533.
- 195) Nagatsu, T. Molecular mechanism of the relation of monoamine oxidase B and its inhibitors to Parkinson's disease: possible implications of glial cells / T. Nagatsu, M. Sawada // *J. Neural. Transm. Suppl.* – 2006. – Iss. 71. – P. 53–65.

- 196) Westlund, K. N. Distinct monoamine oxidase A and B cell populations in primate brain / K. N. Westlund, R. M. Denney, L. M. Kochersperger et al. // *Science* – 1985. – V. 230, Iss. 4722. – P. 181–183.
- 197) Westlund, K. N. Localization of distinct monoamine oxidase A and monoamine oxidase B cell populations in human brain stem / K. N. Westlund, R. M. Denney, R. M. Rose, C. W. Abell // *Neuroscience*. – 1988. – V. 25, Iss. 2. – P. 439–456.
- 198) Westlund, K. N. The distribution of monoamine oxidases A and B in normal human brain / In: *Monoamine oxidase inhibitors in neurological diseases*. Ed. by A. Lieberman, C. W. Olanow, M. B. H. Youdim, K. F. Tipton New York: Marcel Dekker, 1994. – P. 1–19.
- 199) Amsterdam, J. D. MAOI efficacy and safety in advanced stage treatment-resistant depression: a retrospective study / J. D. Amsterdam, J. Shults // *J. Affect. Disord.* – 2005. – V. 89, Iss. 1-3. – P. 183–188.
- 200) Cyr, M. Treatment for posttraumatic stress disorder / M. Cyr, M. K. Farrar // *Ann. Pharmacother.* – 2000. – V. 34, Iss. 3. – P. 366–376.
- 201) Liebowitz, M. R. Reversible and irreversible monoamine oxidase inhibitors in other psychiatric disorders / M. R. Liebowitz, E. Hollander, F. Schneier et al. // *Acta Psychiatr. Scand. Suppl.* – 1990. – V. 360. – P. 29–34.
- 202) Binda, C. Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders / C. Binda, P. Newton-Vinson, F. Hubálek et al. // *Nat. Struct. Biol.* – 2002. – V. 9, Iss. 1. – P. 22–26.
- 203) Fowler, C. J. The effect of age on the activity and molecular properties of human brain monoamine oxidase / C. J. Fowler, A. Wiberg, L. Orelund et al. // *J. Neural. Transm.* – 1980. – V. 49, Iss. 1–2. – P. 1–20.
- 204) Boulton, A. A. Aliphatic N-methylpropargylamines: monoamine oxidase-B inhibitors and antiapoptotic drugs / A. A. Boulton, P. H. Yu, B. A. Davis et al. // *Adv. Pharmacol.* – 1998. – Iss. 42. – P. 308–311.

- 205) Vindis, C. Monoamine oxidase B induces ERK-dependent cell mitogenesis by hydrogen peroxide generation / C. Vindis, M. H. Séguélas, P. Bianchi et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2000. – V. 271, Iss. 1. – P. 181–185.
- 206) Saura, J. Increased monoamine oxidase B activity in plaque-associated astrocytes of Alzheimer brains revealed by quantitative enzyme radioautography / J. Saura, J. M. Luque, A. M. Cesura et al. // *Neuroscience.* – 1994. – V. 62, Iss. 1. – P. 15–30.
- 207) Медведев, А. Е. Окислительная модификация моноаминоксидаз / А. Е. Медведев, К. Ф. Типтон // *Вопр. мед. Химии.* – 1997. – Т. 43, № 6. – С. 471–481.
- 208) Mangoni, A. Effects of a MAO-B inhibitor in the treatment of Alzheimer disease / A. Mangoni, M. P. Grassi, L. Frattola et al. // *Eur. Neurol.* – 1991. – V. 31, Iss. 2. – P. 100–107.
- 209) Knoll, J. Phenylisopropylmethyl-propinylamine (E-250), a new spectrum psychic energizer / J. Knoll, Z. Ecséri, K. Kelemen et al. // *Archives of International Pharmacodynamics.* – 1965. – Iss. 155. – P. 154–164.
- 210) Foley, P. MAO-B inhibitors: multiple roles in the therapy of neurodegenerative disorders? / P. Foley, M. Gerlach, M. B. Youdim, P. Riederer // *Parkinsonism Relat. Disord.* – 2000. – V. 6, Iss. 1. – P. 25–47.
- 211) Magyar, K. (-)-Deprenyl, a selective MAO-B inhibitor, with apoptotic and anti-apoptotic properties / K. Magyar, B. Szende // *Neurotoxicology.* – 2004. – V. 25, Iss. 1–2. – P. 233–242.
- 212) Cesura, A. M. The new generation of monoamine oxidase inhibitors / A. M. Cesura, A. Pletscher // *Prog. Drug Res.* – 1992. – Iss. 38. – P. 171–297.

- 213) Cohen, G. Deprenyl suppresses the oxidant stress associated with increased dopamine turnover / G. Cohen, M. B. Spina // *Annals of Neurology*. – 1989. – Iss. 26. – P. 689–690.
- 214) Knoll, J. The striatal dopamine dependency of life span in male rats, longevity study with (2)deprenyl / J. Knoll // *Mechanisms of Ageing and Development*. – 1988. – Iss. 46. – P. 237–262.
- 215) Weinstock, M. TV3326, a novel neuroprotective drug with cholinesterase and monoamine oxidase inhibitory activities for the treatment of Alzheimer's disease / M. Weinstock, C. Bejar, R. H. Wang et al. // *J. Neural. Transm (Suppl.)*. – 2000. – Iss. 60. – P. 157–169.
- 216) Weinstock, M. Development of a novel neuroprotective drug (TV3326) for the treatment of Alzheimer's disease, with cholinesterase and monoamine oxidase inhibitory activities / M. Weinstock, T. Goren, M. B. H. Youdim // *Drug Dev. Res.* – 2000. – V. 50, Iss. 3–4. – P. 216–222.
- 217) Lee, C. M. C₆₀ fullerene-pentoxifylline dyad nanoparticles enhance autophagy to avoid cytotoxic effects caused by the β -amyloid peptide / C. M. Lee, S. T. Huang, S. H. Huang et al. // *Nanomedicine*. – 2011. – V. 7, Iss. 1. – P. 107–114.
- 218) Dugan, L. L. Carboxyfullerene neuroprotection postinjury in Parkinsonian nonhuman primates / L. L. Dugan, L. Tian, K. L. Quick et al. // *Ann. Neurol.* – 2014. – V. 76, Iss. 3. – P. 393–402.
- 219) Bobylev, A. G. Fullerenolates: metallated polyhydroxylated fullerenes with potent anti-amyloid activity / A. G. Bobylev, A. B. Kornev, L. G. Bobyleva // *Org. Biomol. Chem.* – 2011. – V. 9, Iss. 16. – P. 5714–5719.
- 220) Makarova, E. G. Fullerene C₆₀ prevents neurotoxicity induced by intrahippocampal microinjection of amyloid-beta peptide / E. G. Makarova, R. Y. Gordon, I. Y. Podolski // *J. Nanosci. Nanotechnol.* – 2012. – V. 12, Iss. 1. – P. 119–126.

- 221) Xie, L. The molecular mechanism of fullerene-inhibited aggregation of Alzheimer's β -amyloid peptide fragment / L. Xie, Y. Luo, D. Lin et al. // *Nanoscale*. – 2014. – V. 6, Iss. 16. – P. 9752–9762.
- 222) Giust, D. Modulation of gene expression of adenosine and metabotropic glutamate receptors in rat's neuronal cells exposed to L-glutamate and [60]fullerene / D. Giust, T. Da Ros, M. Martín, J. L. Albasanz // *Journal of Biomedical Nanotechnology*. – 2014. – V. 10, Iss. 8. – P. 1610–1619.
- 223) Bisaglia, M. C3-fullero-tris-methanodicarboxylic acid protects cerebellar granule cells from apoptosis / M. Bisaglia, B. Natalini, R. Pellicciari et al. // *J. Neurochem*. – 2000. – V. 74, Iss. 3. – P. 1197–1204.
- 224) Husebo, L. O. Fullerenols revisited as stable radical anions / L. O. Husebo, B. Sitharaman, K. Furukawa et al. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2004. – V. 126, Iss. 38. – P. 12055–12064.
- 225) Корнев, А. Б. Биологически активные производные фуллеренов, методы их получения и применения в медицине / А. Б. Корнев, О. А. Трошина, П. А. Трошин / монография под ред. В. Ф. Разумова, М. В. Ключева. Иваново: Иван. гос. ун-т, 2013. – С. 439–446.
- 226) Романова, В. С. Присоединение аминокислот и дипептидов к фуллерену C_{60} с образованием моноаддуктов / В. С. Романова, В. А. Цыряпкин, Ю. И. Ляховецкий и др. // *Изв. РАН. Сер. хим.* – 1994. – № 6. – С. 1154–1155.
- 227) Kotelnikov, A. I. Polyfunctional fullerene C_{60} amino acid derivatives. / A. I. Kotelnikov, V. S. Romanova, G. N. Bogdanov et al. Patent CA 2687557 A1.–2008.

Режим доступа:

<http://www.google.com/patents/CA2687557A1?hl=ru&cl=en>

- 228) Van Rooijen, N. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications / N. Van Rooijen, A. Sanders // *J. Immunol. Methods.* – 1994. – V. 174. – P. 83–93.
- 229) Меклер, В. М. Применение фосфоресцентных зондов для исследования модельных и биологических мембран / В. М. Меклер, А. И. Котельников, Г. И. Лихтенштейн, М. А. Беркович // *Журн. Биофизика.* – 1982. – Т. 27, № 4. – С. 641–645.
- 230) Maksimov, E. G. Photosystem 2 effective fluorescence cross-section of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 and its mutants. / E. G. Maksimov, F. I. Kuzminov, I. V. Konyuhov, I. V. Elanskaya, V. Z. Paschenko // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 2011. – V. 104, Iss. 1–2 – P. 285–291.
- 231) Maksimov, E. G. Fluorescence quenching in the lichen *Peltigera aphthosa* due to desiccation. / E. G. Maksimov, F. J. Schmitt, G. V. Tsoraev, A.V. Ryabova, T. Friedrich, V. Z. Paschenko // *Plant Physiol. Biochem.* – 2014. – Iss. 81. – P. 67–73.
- 232) Stadnichuk, I. N. Fluorescence quenching of the phycobilisome terminal emitter LCM from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 detected *in vivo* and *in vitro* / I. N. Stadnichuk, M. F. Yanyushin, G. Bernát, D. V. Zlenko, P. M. Krasilnikov, E. P. Lukashev, E. G. Maksimov, V. Z. Paschenko // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 2013. – Iss. 125. – P. 137–145.
- 233) Kotelnikova, R. A. Membranotropic properties of the water soluble amino acid and peptide derivatives of fullerene C60 / R. A. Kotelnikova, A. I. Kotelnikov, G. N. Bogdanov et al. // *J. FEBS Lett.* – 1996. – V. 389, Iss. 2. – P. 111–114.
- 234) Slater, T. F. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation / T. F. Slater // *Methods in Enzymology.* – 1984. – Iss. 105. – P. 283–292.

- 235) Артюхов, В. Г. Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами: учебное пособие / В. Г. Артюхов, М. А. Наквасина. Воронеж: Изд-во Воронеж. гос. ун-та. – 2000. – С. 232–234.
- 236) Фархутдинов, Р. Р. Хемилюминесцентные методы исследования свободно-радикального окисления в биологии и медицине / Р. Р. Фархутдинов, В. А. Лиховских. Уфа: БГМУ. – 1995. – 90 с.
- 237) Васильев, Р. Ф. Хемилюминесценция в растворах / Р. Ф. Васильев // Успехи физ. наук. – 1966. – Т. 89, № 3. – С. 409–436.
- 238) Владимиров, Ю. А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина // Успехи биологической химии. – 2009. – № 49. – С. 341–388.
- 239) Lowry, O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall // Biol. Chem. – 1951. – № 193. – P. 265–269.
- 240) Gorkin, V. Z. On natural modulators of amine oxidases / V. Z. Gorkin // Biochem. Pharmacol. – 1972. – Т. 38, № 2. – С. 28–30.
- 241) Березин, И. В. Практический курс химической и ферментативной кинетики / И. В. Березин, А. А. Клесов. – М.: Моск. Универс., 1976. – С. 79–82.
- 242) Hamill, O. P. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cell and cell-free membrane patches / O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher et al. // Pflugers Arch. – 1981. – V. 391, Iss. 2. – P. 85–100.
- 243) Kaneda, M. Mechanical and enzymatic isolation of mammalian CNS neurons / M. Kaneda, H. Nakamura, N. Akaike // Neurosci. Res. – 1988. – Iss. 5. – P. 299–315.
- 244) Zhou, L.-M. (2S,4R)-4-methylglutamic acid (SYM 2081): a selective, high-affinity ligand for kainate receptors / L.-M. Zhou, Z.-Q. Gu, A. M.

- Costa et al. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1997. – V. 280, Iss. 1. – P. 422–427.
- 245) Nowak, G. Adaptive changes in the N-methyl-D-aspartate receptor complex after chronic treatment with imipramine and 1-aminocyclopropanecarboxylic acid / G. Nowak, R. Trullas, R. T. Layer et al. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1993. – V. 265, Iss. 3. – P. 1380–1386.
- 246) Gershenfeld, H. K. Mapping quantitative trait loci for open-field behavior in mice / H. K. Gershenfeld, P. E. Neumann, C. Mathis et al. // *Behav Genet.* – 1997. – V. 27, Iss. 3. – P. 201–210.
- 247) Ennaceur, A. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data / A. Ennaceur, J. Delacour // *Behav. Brain Res.* – 1988. – V. 31, Iss. 1. – P. 47–59.
- 248) Dodart, J. C. Scopolamine-induced deficits in a two-trial object recognition task in mice / J. C. Dodart, C. Mathis, A. Ungerer // *NeuroReport.* – 1997. – V. 8, Iss. 5. – P. 1173–1178.
- 249) Гублер, Е. В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов / Е. В. Гублер. – Ленинград: Медицина, Ленингр. отд-ние, 1978. – 294 с.
- 250) Григоренко, А. П. Молекулярные основы болезни Альцгеймера / А. П. Григоренко, Е. И. Рогаев // *Молекулярная биология.* – 2007. – V. 41, Iss. 2. – С. 331–345.
- 251) Lin, A. M. Local carboxyfullerene protects cortical infarction in rat brain / A. M. Lin, S. F. Fang, S. Z. Lin et al. // *Neurosci. Res.* – 2002. – V. 43, Iss. 4. – P. 317–321.
- 252) Wilson, S. R. Synthesis and photophysics of a linear non-covalently linked porphyrin–fullerene dyad / S. R. Wilson, S. MacMahon, F. T. Tat et al. // *Chem. Commun.* – 2003. – V. 2, Iss. 2. – P. 226–227.
- 253) Das, S. K. High-potential perfluorinated phthalocyanine–fullerene dyads for generation of high-energy charge-separated states: formation and

- photoinduced electron-transfer studies / S. K. Das, A. Mahler, A. K. Wilson, F. D'Souza // *Chemphyschem.* – 2014. – V. 15, Iss. 12. – P. 2462–2472.
- 254) Wang, F. Switching of the triplet excited state of rhodamine-C60 dyads / F. Wang, X. Cui, Z. Lou et al. // *Chem. Commun (Camb).* – 2014. – V. 50, Iss. 98. – P. 15627–15630.
- 255) Владимиров, Ю. А. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран / Ю. А. Владимиров, Г. Е. Добрецов. – М.: Наука, 1980. – 320 с.
- 256) Паркер, С. Фотолюминесценция растворов / С. Паркер. – М.: Мир., 1972. – С. 135–137.
- 257) Лакович, Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии / Дж. М. Лакович. – М.: Мир, 1986. – 496 с.
- 258) Borissevitch, I. E. Cooperative effects in CdSe/ZnS-PEGOH quantum dot luminescence quenching by a water soluble porphyrin / I. E. Borissevitch, G. G. Parra, V. E. Zagidullin, E. P. Lukashev, P. P. Knox, V. Z. Paschenko, A. B. Rubin // *Journal of Luminescence* –2013. –Iss. 134. – P. 84.
- 259) Jo, S. GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease / S. Jo, O. Yarishkin, Y. J. Hwang et al. // *Nat. Med.* – 2014. – V. 20, Iss. 8. – P. 886–896.
- 260) Frautschy, S. A. Effects of injected Alzheimer beta-amyloid cores in rat brain / S. A. Frautschy, A. Baired, G. M. Cole // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1991. – V. 88, Iss. 19. – P. 8362–8366.
- 261) Wenk, G. L. Neuropathologic changes in Alzheimer's disease: potential targets for treatment / G. L. Wenk // *J. Clin. Psychiatry.* – 2006. – Iss. 67, Suppl. 3 – P. 3–7.
- 262) Grigoriev, V. New group of positive modulators of AMPA-receptors with cognition enhancing properties / V. Grigoriev, M. Lavrov, S. Bachurin

- et al. // *Eur. Neuropsychopharmacol.* – 2006. – Iss. 16, Suppl. 4. – P. S516–S517.
- 263) Григорьев, В. В. Современные подходы к созданию стимуляторов памяти и когнитивных функций на основе лигандов АМРА-рецепторов / В. В. Григорьев, А.Н. Прошин, А. С. Кинзирский, С. О. Бачурин // *Успехи химии.* – 2009. – V. 78, Iss. 5. – С. 524–534.
- 264) Grigorev, V. V. Comparative study of action mechanisms of dimebon and memantine on AMPA- and NMDA-subtypes glutamate receptors in rat cerebral neurons / V. V. Grigorev, O. A. Dranyi, S. O. Bachurin // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2003. – V. 136, Iss. 5. – P. 474–477.
- 265) Higgins, G. A. The NMDA antagonist dizocilpine (MK801) attenuates motivational as well as somatic aspects of naloxone precipitated opioid withdrawal / G. A. Higgins, P. Nguyen, E. M. Sellers // *Life Sci.* – 1992. – V. 50, Iss. 21. – P. PL167–PL172.
- 266) Williams, K. Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors / K. Williams // *Mol. Pharmacol.* – 1993. – V. 44, Iss. 4. – P. 851–859.
- 267) Chenard, B. L. Antagonists selective for NMDA receptors containing the NR2B subunit / B. L. Chenard, F. S. Menniti // *Curr. Pharm. Des.* – 1999. – V. 5, Iss. 5. – P. 381–404.
- 268) Буреш, Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения: монография / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. П. Хьюстон. – М.: Высшая школа, 1991. – 399 с.
- 269) Kotelnikova, R. A. Influence of water-soluble derivatives of [60]fullerene on therapeutically important targets related to neurodegenerative diseases / R. A. Kotelnikova, A. V. Smolina, V. V. Grigoryev, I. I. Faingold, D. V. Mischenko, A. Yu. Rybkin, D. A. Poletayeva, G. I. Vankin, V. L. Zamoyskiy, I. I. Voronov, P. A. Troshin, A.

- I. Kotelnikov, S. O. Bachurin // *Med. Chem. Commun.* – 2014. – Iss. 5. – P. 1664–1668.
- 270) Kotelnikova, R. A. Generation of nitrogen monoxide by amino acid fullerene derivatives in mitochondrion / R. A. Kotelnikova, I. I. Faingold, A. I. Kotelnikov et al. / in *Book of Abstracts «Fullerenes and Atomic Clusters»*. – St. Petersburg. – 2007. – P. 218.
- 271) De la Torre, J. C. Evidence that Alzheimer's disease is a microvascular disorder: the role of constitutive nitric oxide / J. C. De la Torre, G. B. Stefano // *Brain Res. Rev.* – 2000. – V. 34, Iss. 3. – P. 119–136.
- 272) Calabrese, V. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity / V. Calabrese, C. Mancuso, M. Calvani et al. // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2007. – V. 8, Iss. 10. – P. 766–775.
- 273) Манухина, Е. Б. Роль оксида азота в предупреждении когнитивных нарушений при нейродегенеративном повреждении мозга у крыс / Е. Б. Манухина, М. Г. Пшенникова, А. В. Горячева и др. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2008. – № 10. – С. 371–375.
- 274) Alessenko, A. V. The relation between sphingomyelinase activity, lipid peroxide oxidation and NO-releasing in mice liver and brain / A. V. Alessenko, M. A. Shupik, A. E. Bugrova et al. // *FEBS Lett.* – 2005. – V. 579, Iss. 25. – P. 5571–5576.
- 275) Smith, S. A novel nitrate ester reverses the cognitive impairment caused by scopolamine in the Morris water maze / S. Smith, H. C. Dringenberg, B. M. Bennett et al. // *Neuroreport.* – 2000. – V. 11, Iss. 17. – P. 3883–3886.
- 276) Bennett, B. M. Cognitive deficits in rats after forebrain cholinergic depletion are reversed by a novel NO mimetic nitrate ester / B. M. Bennett,

- J. N. Reynolds, G. T. Prusky et al. // *Neuropsychopharmacology*. – 2007. – V. 32, Iss. 3. – P. 505–513.
- 277) Abdul-Hay, S. O. NO-flurbiprofen reduces amyloid-beta, is neuroprotective in cell culture, and enhances cognition in response to cholinergic blockade / S. O. Abdul-Hay, J. Luo, R. T. Ashghodom, G. R. Thatcher // *J. Neurochem.* – 2009. – V. 111, Iss. 3. – P. 766–776.
- 278) Abdul-Hay, S. NO-SSRIs: Nitric Oxide Chimera Drugs Incorporating a Selective Serotonin Reuptake Inhibitor / S. Abdul-Hay, I. T. Schiefer, R. E. Chandrasena et al. // *ACS Med. Chem. Lett.* – 2011. – V. 2, Iss. 9. – P. 656–661.
- 279) VandeVrede, L. An NO donor approach to neuroprotective and procognitive estrogen therapy overcomes loss of NO synthase function and potentially thrombotic risk / L. VandeVrede, R. Abdelhamid, Z. Qin et al. // *PLoS One*. – 2013. – V. 8, Iss. 8. – P. e70740.
- 280) Котельников, А. И. Проницаемость гематоэнцефалического барьера мозга животных для гибридных наноструктур на основе фуллеренов / А. И. Котельников, Р. А. Котельникова, В. С. Романова и др. // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2008. – Т. 3, № 7. – С. 97–98.
- 281) Melchior, C. The route and significance of endogenous synthesis of alkaloids in animals / C. Melchior, M. A. Collins // *Crit. Rev. Toxicol.* – 1982. – V. 9, Iss. 4. – P. 313–356.
- 282) Григорьев, В. В. Исследование нейропротекторного действия гибридных структур на основе фуллерена C₆₀ / В. В. Григорьев, Л. Н. Петрова, Т. А. Иванова и др. // *Известия РАН. Сер. Биологическая*. – 2011. – № 2. – С. 163–170.
- 283) Ivachtchenko, A. V. Synthesis and biological evaluation of novel γ -carboline analogues of Dimebon as potent 5-HT₆ receptor antagonists / A.

- V. Ivachtchenko, E. B. Frolov, O. D. Mitkin et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2009. – Iss. 19. – P. 3183–3187.
- 284) Алесенко, А. В. Защитный эффект димебона от нарушений в липидном спектре мозга мышей, индуцируемых провоспалительным цитокином фактором некроза опухоли альфа / А. В. Алесенко, А. А. Коротаева, Л. Н. Шингарова и др. // *Вестник новых медицинских технологий.* – 2009. – № 1. – С. 313–315.
- 285) Doody, R. S. Effect of dimebon on cognition, activities of daily living, behaviour, and global function in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled study / R. S. Doody, S. I. Gavrilova, M. Sano et al. // *Lancet.* – 2008. – V. 372, Iss. 9634. – P. 207–215.
- 286) Pfizer and medivation announce results from two phase 3 studies in Dimebon (latrepirdine*) Alzheimer's disease clinical development program / Medivation. – March 3, 2010. Режим доступа:
<http://investors.medivation.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=448818>.
- 287) Хританкова, И. В. Активация компонентов аутофагосомной системы под действием димебона в культуре клеток нейробластомы человека / И. В. Хританкова, М. С. Кухарский, О. А. Лыткина и др. // *Доклады академии наук.* – 2012. – Т. 446, № 4. – С. 471–473.
- 288) Eckert, S. H. Dimebon ameliorates amyloid- β induced impairments of mitochondrial form and function / S. H. Eckert, J. Eckmann, K. Renner et al. // *J. Alzheimers Dis.* – 2012. – V. 31, Iss. 1. – P. 21–32.
- 289) Steele, J. W. Latrepirdine (Dimebon®), a potential Alzheimer therapeutic, regulates autophagy and neuropathology in an Alzheimer mouse model / J. W. Steele, S. Gandy // *Autophagy.* – 2013. – V. 9, Iss. 4. – P. 617–618.

- 290) Brunner, H. G. Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A / H. G. Brunner, M. Nelen, X. O. Breakefield et al. // Science. – 1993. – V. 262, Iss. 5133. – P. 578–580.
- 291) Котельникова, Р. А. Создание гибридной наноструктуры на основе фуллерена C₆₀ и биологически активного вещества как один из путей моделирования физиологических свойств соединений / Р. А. Котельникова, В. В. Григорьев, **А. В. Смолина**, И. И. Файнгольд, Д. В. Мищенко, Г. И. Ванькин, В. Л. Замойский, Д. А. Полетаева, Н. А. Маркова, В. С. Романова, А. И. Котельников, Г. Алиев, С. О. Бачурин // Изв. Акад. наук. Сер. Химическая. – 2014. – №10. – С. 2375–2382.