

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ РАН

На правах рукописи



ШЕВЦОВА
Елена Феофановна

МИТОХОНДРИИ КАК МИШЕНЬ ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ
ЛЕЧЕНИЯ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

03.01.04 – биохимия

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора химических наук

Научный консультант:
доктор химических наук,
член-корр. РАН С.О. Бачурин

Москва – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	8
1.1. Актуальность и степень разработанности темы исследования	8
1.2. Цели и задачи исследования.	9
1.3. Научная новизна.	10
1.4. Теоретическая и практическая значимость работы.	11
1.5. Методология и методы исследования.	12
1.6. Основные положения, выносимые на защиту:	13
1.7. Степень достоверности и апробация работы.	14
1.8. Конкретное личное участие автора в получении результатов.	15
1.9. Публикации.	16
2. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	17
2.1. Митохондрии и патогенез нейродегенеративных заболеваний	20
2.2. Регуляция митохондриального гомеостаза кальция	23
2.3. Соединения, влияющие на митохондриальные функции, как нейроактивные препараты	25
2.3.1. Стимуляция клеточной биоэнергетики.	25
2.3.2. Стимуляция биогенеза митохондрий.	30
2.3.3. Ингибиторы процесса открытия пор митохондриальной проницаемости.	32
2.4. Ингибиторы МП как пронеурогенные препараты	44
2.5. Митохондрии как регуляторы синаптической пластичности	46
2.6. Мультицелевые нейроактивные препараты.	50
2.7. Заключение	53
3. МЕТОДЫ.	54
3.1. Животные	54

3.2. Исследования на изолированных митохондриях	55
3.2.1. Выделение митохондрий	55
3.2.2. Определение мембранного потенциала митохондрий	56
3.2.3. Исследование влияния соединений на «набухание» митохондрий	57
3.2.4. Регистрирование захвата ионов кальция митохондриями и кальциевой ёмкости изолированных митохондрий	58
3.3. Оценка влияния соединений на активность ДЦМ	60
3.3.1. Респирометрия высокого разрешения	60
3.3.2. Оценка поглощения кислорода с помощью биоэнергетического анализатора SeaHorse XFe96	60
3.4. Антиоксидантный потенциал соединений	61
3.4.1. Определение перекисного окисления липидов в митохондриях печени крыс	61
3.4.2. Определение ПОЛ в гомогенате мозга крыс	61
3.4.3. Определение влияния соединений на активность фермента липоксигеназы.	62
3.5. Верификация нейропротекторного эффекта соединений на клеточных моделях нейродегенерации	63
3.5.1. Приготовление нейрональных первичных культур из мозга крыс	63
3.5.2. Дизайн моделей нейродегенерации	64
3.5.3. Визуализация цитозольного и митохондриального кальция и митохондриального мембранного потенциала в нейронах.	66
3.6. Исследование in vivo эффектов соединений	67
3.6.1. Определение просудорожной активности	67
3.6.2. Литий-пилокарпиновая модель эпилептического статуса.	68
3.6.3. Оценка нейропротекторной и/или когнитивно-стимулирующей активности соединений на in vivo моделях амнезии и нейродегенерации.	68

3.7. Оценка влияния соединений на агрегацию Аβ	70
3.7.1. Регистрация фибриллизации Аβ с тιοфлавином Т	70
3.7.2. Электронная микроскопия Аβ	71
3.8. Оценка влияния соединений на активность КГС-3β	72
3.9. Расчёт результатов, достоверность и статистический анализ	72
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	74
4.1. Разработка стратегии использования митохондрий при скрининге цитопротекторных или цитотоксичных препаратов.	74
4.1.1. Митохондрии как мишень для поиска цитопротекторных и цитотоксичных препаратов соединений.	74
4.1.2. Методология формирования системы скрининга потенциальных нейропротекторов, мишенью действия которых являются митохондрии.	75
4.2. Оптимизация структуры производных γ-карболинов - димебона как митопротекторов для создания потенциальных лекарственных препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний.	91
4.2.1. Скрининговые исследования различных классов аналогов Димебона.	91
4.3. Стабилизация функций митохондрий как необходимый этап в создании мультитаргетных препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний	111
4.3.1. Мемантин как ингибитор МП	112
4.3.2. Митохондрии как мишень нейропротекторного эффекта в ряду биоизостерных аналогов МК801.	118
4.3.3. Изотиомочевины	119
4.3.4. Производные [1,2,4]-тиадиазола	126
4.4. Алломаргаритарин – триптаминовое производное секурина как потенциальный нейропротектор.	133

4.5. Бифармакофорные мультитаргетные препараты	145
4.5.1. Бис-гамма-карболины	148
4.5.2. Бис-аминоадамантаны	152
4.5.3. Конъюгаты производных МС и индолов, включая гамма-карболины	154
4.5.4. Производные адамантансодержащих индолов	168
4.5.5. Оценка эффектов соединения ТГ-2113х на <i>in vivo</i> моделях	187
5. ВЫВОДЫ.	192
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	194

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ и ОПРЕДЕЛЕНИЙ

МП	Митохондриальная проницаемость (MPT- mitochondrial permeability transition)
пМП	Пора митохондриальной проницаемости
A β	β -амилоидный пептид
ANT	Переносчик адениновых нуклеотидов (Adenine nucleotide translocator)
МФП+	1-Метил-4-фенилпиридиний
AF64A	циклический азиридиновый аналог холина
NMDA	N-метил-D-аспартат (NMDA-подтип глутаматных рецепторов - ионотропный рецептор глутамата, селективно связывающий NMDA).
БА	болезнь Альцгеймера
мтДНК	Митохондриальная дезоксирибонуклеиновая кислота
MCU	Потенциал-зависимый митохондриальный кальциевый унипортер (mitochondrial calcium uniporter)
RaM	система «быстрого поглощения» Ca ²⁺ митохондриями (rapid uptake mode)
NCLX	Na ⁺ /Ca ²⁺ митохондриальный антипортер (аббревиатура Na/Li/Ca exchanger)
АТФ	аденозинтрифосфат
GLUT4	глюкозный транспортёр тип 4
ДЦМ	Дыхательная цепь митохондрий
SMAC/DIABLO	second mitochondria-derived activator of caspases /direct Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP)-binding protein with low PI
АФК	Активные формы кислорода
тБГП	Трет-бутилгидроксипероксид
PiC	Митохондриальный переносчик неорганического фосфата

SPG7	Митохондриальная металлопротеиназа спастической параплегии 7
VDAC	потенциал-зависимый анионный канал наружной мембраны митохондрий
PHB/polyp/ Ca^{2+} комплекс	Комплекс, состоящий из поли-R-3-гидроксибутирата/полифосфата/ионов кальция
TSPO-	Митохондриальный транслокаторный белок, до 2006 назывался периферическим бензодиазепиновым рецептором
ЦсА	Циклоспорин А
БАС	Боковой амиотрофический склероз
ДВП	Долговременная потенция
ДВД	Долговременной депрессия
ДМСО	Диметилсульфоксид
FCCP	carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (карбонилцианид-4-трифтор метоксифенил-гидразон)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium – модифицированная по способу Дульбекко среда Игла
FBS	fetal bovine serum (телячья эмбриональная сыворотка)
КГС-3 β	Киназа Гликоген Синтазы -3 β
ПОЛ	Перекисное окисление липидов

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1. Актуальность и степень разработанности темы исследования

Нейродегенеративные заболевания представляют в настоящее время не только медицинскую, но в большой степени социальную и экономическую проблему. Основными причинами отсутствия значительного прогресса в создании эффективных лекарственных препаратов для лечения спорадических форм нейродегенеративных заболеваний является то, что выявляются они уже при развитом нейродегенеративном процессе в мозге, а развитие заболевания может протекать по различным путям в зависимости от провоцирующих факторов и индивидуальных генетических особенностей.

Возможными решениями этой проблемы может быть активное применение нейропротекторных стратегий при состояниях, несущих риск последующего развития нейродегенерации. В настоящее время общепринято, что митохондрии и процесс открытия пор митохондриальной проницаемости (пМП) являются ключевым этапом в запуске клеточной гибели и, соответственно, перспективной мишенью при поиске нейропротекторных препаратов. В этой связи использование митохондрий как мишени для создания нового поколения лекарственных средств, способных оказывать нейропротекторное действие, а также выступать в качестве когнитивных и метаболических стимуляторов, представляет особый научный интерес и может иметь большое практическое значение.

К началу наших работ значение увеличения устойчивости митохондрий к индукции открытия пор митохондриальной проницаемости (пМП) было далеко не очевидно. Более того, многие считали сам феномен МП артефактом. Предпосылкой развития стратегии митохондриального направления поиска новых лекарственных средств были работы, показавшие, что пМП является мишенью известных нейротоксинов и нейропротекторов. Мы впервые показали, что ключевой патогенетический метаболит нейротоксин β -

амилоидный пептид (β A) (как патогенные эндогенные формы 1-40 и 1-42, так и искусственный нейротоксичный пептид 25-35), является индуктором открытия пМП. Именно это может обусловить его внутриклеточную токсичность и как результат – нейродегенерацию. Такой же эффект показан и для модельных нейротоксинов, таких как 1-Метил-4-фенилпиридиниевый ион (МФП⁺) и циклический азиридиниевый аналог холина (AF64A), применяемых для моделирования болезни Паркинсона и Альцгеймера, соответственно. Кроме того, у ряда нейропротекторов - димебон, такрин, N-ацетилсеротонин, мелатонин, пирацетам и растительный экстракт Гинкго билоба - обнаружена способность ингибировать открытие пМП.

Эти данные являются основой для поиска соединений, способных снизить уязвимость митохондрий к индукции открытия пМП, что может быть новым перспективным направлением создания лекарственных препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний.

Таким образом, **объектом настоящего исследования** являются мишени эффективных лекарственных препаратов для лечения спорадических форм нейродегенеративных заболеваний, а непосредственным **предметом настоящего исследования** - создание стратегии митохондриального направления поиска новых лекарственных средств.

1.2. Цели и задачи исследования.

Целью настоящей работы явились разработка и валидация общей митохондриальной стратегии поиска нейропротекторов и выявление на этой основе перспективных кандидатов в лекарственные препараты для лечения нейродегенеративных заболеваний.

Для достижения поставленной цели в рамках настоящей работы решались следующие задачи:

изучение механизмов взаимодействия с митохондриями ряда модельных нейропротекторов с целью определения основных мишеней и/или

процессов для дальнейшей разработки комплексной системы поиска потенциальных лекарственных препаратов;

разработка комплексной системы поиска лекарств для лечения нейродегенеративных заболеваний как стабилизаторов митохондриальных функций и проведение поиска митопротекторных соединений в различных рядах новых соединений;

исследование молекулярных и клеточных механизмов действия выявленных соединений-лидеров, анализ ЦНС-направленной активности и нейропротекторного эффекта соединений-лидеров на клеточных и *in vivo* моделях нейродегенерации.

1.3. Научная новизна.

На основе результатов изучения механизмов взаимодействия с митохондриями ряда известных лекарственных препаратов и модельных нейропротекторов с доказанной нейротропной активностью, в частности, препарата димебона, была создана оригинальная комплексная система поиска новых ингибиторов пор митохондриальной проницаемости (МП), как потенциальных нейропротекторов.

Впервые показано, что ингибиторы ионных каналов NMDA-подтипа глутаматных рецепторов (мемантин, МК801 и ряд его новых биоизостерных аналогов) проявляют также свойства ингибиторов пор МП. В сочетании с имеющимися данными об общности структурных элементов глутаматных рецепторов и пор МП эти данные позволили наметить новые подходы к созданию нового поколения лекарственных препаратов, воздействующих одновременно на эти мишени.

Выявлен ряд новых оригинальных соединений, обладающих митопротекторным действием, перспективных для дальнейшей разработки с целью создания новых лекарственных препаратов. Определены соединения-

лидеры, нейропротекторный эффект которых валидирован на клеточных и *in vivo* моделях нейродегенерации.

Выявлен уникальный механизм регуляции кальциевого гомеостаза в митохондриях: подавление захвата кальция митохондриями при низких концентрациях вненейронального глутамата и низких концентрациях цитозольного кальция, но увеличение кальциевой ёмкости митохондрий и ингибирование открытия пор МП в условиях эксайтотоксичности и кальциевого стресса. Этот эффект показан для соединения-лидера ТГ-2112х в ряду оригинальных аминокислот-содержащих индолов.

1.4. Теоретическая и практическая значимость работы.

Теоретическое и практическое значение имеют установленные механизмы влияния на митохондрии известных нейропротекторов и созданная на этой базе стратегия поиска потенциальных лекарственных препаратов для лечения болезни Альцгеймера, а также и система методических подходов, позволившая выявить как перспективные химические скаффолды для дальнейшей разработки, так и ряд соединений-лидеров.

Выявлен уникальный механизм влияния одного из соединений-лидеров (ТГ2112х) на кальциевый гомеостаз в митохондриях: снижение захвата кальция при низких концентрациях нейротрансмиттера глутамата, что может обусловить большую эффективность рецепторного сигнала; и одновременно - в условиях эксайтотоксических концентраций глутамата при неизменном клеточном кальциевом ответе в присутствии соединения наблюдается практически полная защита митохондрий от деполяризации, а также увеличение кальциевой ёмкости и дыхательной резервной ёмкости митохондрий. Это открывает новые практические подходы к использованию вновь выявленного механизма митопротекции - как универсального механизма защиты от гибели и увеличения функциональной активности нервных клеток.

Показана возможная связь между увеличением устойчивости митохондрий к индукции открытия пМП и снижением тяжести судорожного состояния при пилокарпин-вызванном эпилептическом статусе и стимулированием нейрогенеза во взрослом мозге мышей, что даёт возможность использовать митопротекторные стратегии при поиске противосудорожных и нейрорегенеративных препаратов.

Практическую значимость работы подтверждает тот факт, что два соединения-лидера, отобранные на основе их митопротекторного эффекта, успешно прошли доклинические испытания в рамках Государственных контрактов, ещё одно соединение-лидер проходит доклинические испытания по контракту с ФМБА РФ.

1.5.Методология и методы исследования.

Проведенное исследование направлено на совершенствование методологии поиска новых лекарственных препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний. Методология самого исследования включала информационный поиск и анализ литературных данных, исследования механизмов действия известных препаратов, выбор необходимых характеристик для нейропротекторов митохондриального типа действия, формирование нового комплекса методик для их анализа. Следующий этап включал применение этого методологического подхода для поиска эффективных нейропротекторов митохондриального типа действия в библиотеках соединений, выбор соединений-лидеров и верификация их эффектов на клеточных и *in vivo* моделях нейропатологии. Используемые в данном исследовании методы включают современные методы анализа митохондриальных функций с использованием спектрофотометрии, флюорометрии, респирометрии высокого разрешения, анализа биоэнергетических характеристик изолированных митохондрий и клеток,

методы и модели на клеточных культурах, модели нейродегенерации, эпилепсии на животных.

1.6. Основные положения, выносимые на защиту:

1. Оценка митопротекторного потенциала соединений является необходимым этапом при поиске болезнь-модифицирующих лекарственных препаратов для лечения спорадических форм нейродегенеративных заболеваний, в частности, болезни Альцгеймера, сочетание митопротекторной активности с компенсаторным механизмом стимуляции нейромедиаторной функции может обеспечить создание нового поколения лекарственных препаратов для лечения спорадической формы болезни Альцгеймера.

2. Биохимические принципы поиска и отбора перспективных кандидатов в лекарства для лечения нейродегенеративных заболеваний на основе исследования их способности нормализовать функциональные характеристики митохондрий определяют необходимость комплексного исследования влияния на митохондриальный потенциал, кальций-вызванное «набухание» митохондрий и кальциевую ёмкость митохондрий.

3. Оригинальная комплексная система оценки нейропротекторного потенциала соединений на основе разработанного комплекса методов для определения влияния на функциональную активность митохондрий обеспечивает одновременно оценку возможной токсичности соединений и устойчивости митохондрий к индукции открытия пор митохондриальной проницаемости.

4. Модельные и вновь синтезированные блокаторы глутаматных рецепторов модулируют кальций-зависимое открытие пор митохондриальной проницаемости, что позволяет предположить возможную структурную общность компонентов поры и глутаматных рецепторов.

5. Наиболее перспективные как митопротекторы соединения-лидеры различных структурных типов проявляют нейропротекторную активность на

клеточных и *in vivo* моделях нейродегенерации, стимулируют нейрогенез и проявляют противосудорожную активность.

6 Уникальный механизм двойственного влияния на кальций-буферную систему митохондрий, заключающийся в снижении захвата кальция митохондриями при его низких физиологических концентрациях и увеличении кальциевой ёмкости митохондрий, характерен для соединения-лидера класса адамантан-содержащих индолов.

7. Выявленные соединения-лидеры, обладающие митопротекторным действием и значительным нейропротекторным эффектом на клеточных и *in vivo* моделях заболеваний, успешно прошли доклинические испытания.

1.7. Степень достоверности и апробация работы.

Современные методы исследования, проведение не менее трёх независимых повторов экспериментов, использование необходимых соответствующих контролей и применение адекватных методов статистической обработки результатов с помощью лицензированных программ (GraphPad, Excel) обеспечивают достоверность полученных данных. Воспроизводимость экспериментов подтверждает достоверность экспериментальных результатов. Успешная верификация нейропротекторного эффекта соединений-лидеров на моделях нейродегенеративных заболеваний *in vivo* и в наибольшей степени – в рамках проводимых доклинических испытаний этих фармакологических субстанций также подтверждает достоверность данного исследования.

Результаты диссертационной работы были представлены на 4th Annual Meeting ICGP, Basel, Switzerland, Oct.14-16, 2004; 4th INMED/TINS conference “Nature and Nurture in brain development and neurological disorders”, 4-7 September, 2005, abstract 18. La Ciotat, France; Симпозиуме “Современное состояние исследований, диагностики и терапии нейродегенеративных заболеваний (болезни Альцгеймера, Паркинсона и др.), Москва, 17-18 ноября

2005 г; Конференции “Фундаментальные науки – медицине”. Москва. 27-29 ноября 2006 г.; XIV European Bioenergetics Conference. 22-27 July 2006. Moscow; Proc. of 8th International Symposium on Neurobiology and Neuroendocrinology of Aging, 2006, Bregenz, Austria; ECNP. September 2006. Paris; III съезда фармакологов России “Фармакология – практическому здравоохранению”, 23-27 сентября 2007 г., г. С-Петербург; 21st ECNP Congress, 30 August - 3 September 2008, Barcelona, Spain IV Российской научно-практической конференции «Болезнь Альцгеймера и когнитивные нарушения в пожилом возрасте: достижения в нейробиологии и терапии», 4-5 июня 2008, Москва; 44th ISTC-RIKEN BSI workshop “Bridging non-linear dynamics with cellular and molecular neuroscience” 18-19 march 2008; ELRIG Drug discovery (September, 2009) Liverpool; 5ый международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии». Судак, Крым, Украина, 3-13 июня 2009г; International symposium on the pathophysiology of reactive oxygen and nitrogen species. Salamanca (Spain), 2010; MipTec - The Leading European Event for Drug Discovery. Basel. 2010; Society for Neuroscience Meeting, Washington, USA, November 11-15. 2011; 8th IBRO World Congress of Neuroscience; Первая Российская конференция по медицинской химии (MedChem Russia-2013) с международным участием; 29ый конгресс Европейского колледжа Нейропсихофармакологии, Вена, Австрия, сентябрь 2016г; 3-я Российская конференция по медицинской химии, Казань, Россия, 28 сентября - 3 ноября 2017; V Съезд фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств», 2018, Ярославль; 4-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием, 2019, Екатеринбург.

1.8. Конкретное личное участие автора в получении результатов.

Автору принадлежит ключевая роль в выработке цели и направления исследования, определении задач, плана и методологии исследования.

Основная часть экспериментальной работы, статистическая обработка результатов и анализ выполнены с непосредственным участием автора. Под руководством автора защищены две кандидатские диссертации, автор также являлась руководителем третьей диссертационной работы.

1.9. Публикации.

По материалам исследований опубликовано 33 статьи в журналах, индексируемых в Web of Science, Scopus, RSCI, из них 18 в журналах 1 и 2 квартилей, 5 статей в журналах, индексируемых в РИНЦ, 6 тезисов докладов, опубликованных в журналах, индексируемых в Web of Science 1 и 2 квартилей, получено 5 патентов.

2. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Нейродегенеративные последствия травм мозга, ишемических состояний и собственно нейродегенеративные заболевания в настоящее время представляют собой как медицинскую, так и в значительной степени социальную проблему. В России ежегодно регистрируются около 450 000 случаев этих заболеваний. Когнитивные нарушения могут быть как легкими, так и тяжелыми, вплоть до развития деменции. В 55-65% случаев умеренные когнитивные нарушения прогрессируют до клинически очерченной деменции, преимущественно альцгеймеровского типа, в течение 5 лет. Нейродегенеративные последствия также часто возникают в результате травм мозга и эпилептических состояний, что главным образом связано с гипоксией мозга при этих состояниях. Согласно статистике, хроническая ишемия мозга встречается в 70 - 75% от всех случаев цереброваскулярных заболеваний, а актуальность профилактики и своевременное лечение этой патологии определяется в первую очередь её социальной значимостью, связанной с развитием нейродегенерации, ведущей к целому ряду неврологических и психических расстройств, которые являются основными причинами стойкой утраты трудоспособности пациентов.

Развитие терапевтических стратегий для лечения нейродегенеративных повреждений мозга в настоящее время является одним из наиболее критичных, но и наиболее активно развивающимся направлением биомедицинских исследований.

Следует отметить, что эти стратегии могут представлять собой:

1) заместительную терапию, призванную компенсировать утраченные когнитивные функции, повысить эффективность нейротрансмиттерной передачи в мозге (именно к этому направлению относятся все зарегистрированные препараты для лечения нейродегенеративных заболеваний в настоящее время),

2) болезнь-модифицирующую терапию, основанную на воздействии на ключевые этапы или мишени патогенеза конкретного заболевания, и направленную на значительное замедление и остановку развития патологического процесса и

3) нейропротекторную и регенеративную терапию, целью которой является как остановка процесса нейродегенерации, так и возможное восстановление утраченных функций, прежде всего за счёт стимуляции процессов нейрогенеза в мозге.

Нужно отметить, что нормализация функций митохондрий, увеличение их устойчивости к индукции процесса скачка митохондриальной проницаемости и энергетической эффективности может внести вклад во все эти направления.

Прежде всего, энергетическая состоятельность нейрона является абсолютно необходимым условием для эффективной работы нейрона и нейротрансмиттерной передачи.

Во-вторых, есть значительное количество экспериментальных данных, доказывающих взаимосвязь таких болезней специфических факторов как образование амилоида, гиперфосфорилирование тау-белка с нарушениями функций митохондрий.

И наконец, собственно процессы нейрональной гибели зависят от состояния митохондрий.

Успех поиска стратегии лечения заболеваний и эффективных лекарственных препаратов закономерно связан со знанием патогенеза заболевания и, соответственно, основных мишеней, взаимодействие с которыми может обеспечить блокаду развития патологического процесса. Наиболее распространенным нейродегенеративным заболеванием в пожилом возрасте является болезнь Альцгеймера (БА). Для нее характерно неуклонное снижение когнитивных функций и памяти вплоть до полного распада личности. Для БА как и для многих других нейродегенеративных заболеваний как исходные триггеры заболевания, так и патогенетическая цепочка развития

заболевания остаётся в целом нерешенной проблемой, несмотря на значительное число исследований [1-4]. Наследственные формы БА составляют не более 10% от всех заболевших [5]. Для спорадической формы БА возраст является важнейшим фактором риска и это во многом определяет интерес к митохондриям как возможному фактору развития нейродегенеративной патологии и мишени для поиска нейропротекторов.

До настоящего времени для лечения БА основными препаратами являются препараты, действие которых обеспечивает компенсаторный когнитивно-стимулирующий эффект, что связано с влиянием на нейротрансмиттерные системы. К ним относятся и четыре наиболее часто применяемых препарата: три ингибитора ацетилхолинэстеразы - ривастигмин, донепезил, галантамин и внутриканальный низкоаффинный ингибитор NMDA-подтипа глутаматных рецепторов - мемантин, повышающие эффективность холинэргической и глутаматной нейротрансмиссии. Вместе с тем, активно развиваются направления поиска препаратов, способных остановить развитие патологического процесса. Прежде всего, это воздействие на известные пути патогенеза болезни Альцгеймера, что отражается в относительном вкладе соединений с различными механизмами действия в общую статистику клинических испытаний. Так, из общего числа около 2170-ти клинических испытаний препаратов, проведенных до 2019 года, 22,3% - составляют препараты, действие которых направлено на блокаду амилоидного пути развития патогенеза, 12,2% - действующие на тау-патологию при БА, 17% препараты, мишени действия которых связаны с митохондриальной гипотезой патогенеза БА и 7,9% - препараты нейрососудистого действия. Кроме того, 19% составляют препараты, действующие на процессы нейротрансмиссии, [6].

2.1. Митохондрии и патогенез нейродегенеративных заболеваний

Митохондриальная гипотеза развития нейродегенеративных заболеваний и, в частности, БА тесно связана с митохондриальной теорией старения. Митохондриальная теория старения основывается на идее порочного круга: накопление с возрастом мутаций мтДНК увеличивает нарушения работы ДЦМ, что провоцирует продукцию свободных радикалов, что обуславливает дальнейшее нарастание мутаций мтДНК. Накапливаясь, митохондриальные нарушения приводят к биоэнергетическому коллапсу в клетках и к явной дисфункции и дегенеративным изменениям клеток и органов. Согласно митохондриальной теории БА [7], возраст-зависимое снижение эффективности митохондриального дыхания приводящее к увеличению продукции свободных радикалов и окислительному стрессу, в условиях определённого генетического бэкграунда и/или последствий ряда других продегенеративных патологических событий в жизни пациента приводят к специфическим, характерным для БА нарушениям – появлению амилоидных отложений, гиперфосфорилированию тау белка, нарушениям когнитивных функций. Показано, что именно нарушения работы дыхательной цепи митохондрий являются причиной не только окислительного стресса, а также нарушений кальциевого гомеостаза, амилоидоза и гиперфосфорилирования тау-белка на клеточном уровне). Кроме того, и *in vivo* нейроны отвечают на окислительный стресс увеличением продукции β -амилоида. Предполагают, что это связано с физиологической функцией этого пептида, как подлинным антиоксидантом, который может действовать как супероксид дисмутаза. Действительно, увеличение продукции β -амилоида снижает последствия окислительного стресса [8]. По этой логике пациенты с наследственной формой БА с мутациями предшественника $A\beta$ теряют из-за мутации эффективную антиоксидантную способность, а отложения $A\beta$ сами по себе являются маркерами не нейротоксичности как таковой, а окислительного дисбаланса и реакции на окислительный стресс.

С другой стороны, в 2005 году впервые было показано, что внутримитохондриальное накопление олигомерных форм Аβ предшествует внеклеточному накоплению [9]. Ранее, нами было показано, что токсичность Аβ может быть обусловлена и прямым взаимодействием с митохондриями – индукцией открытия пор МП [10]. Олигомеры Аβ вызывают значительное нарушение работы дыхательной цепи митохондрий, и также индуцируют открытие пор МП, что запускает каскад гибели клетки и усугубляет окислительный стресс, что может вызвать продукцию Аβ. Таким образом, именно нарушение митохондриальной функции запускает цикл самостимулированной генерации Аβ. Кроме того, многочисленные исследования показывают, что как нарушения энергетических функций в целом, так и нарушения работы митохондрий являются одними из самых первых признаков БА [11].

Нужно отметить, что помимо возраста, факторами риска для развития спорадических форм нейродегенеративных заболеваний является как недостатки здорового образа жизни, так и целый ряд неврологических нарушений – нейрососудистые нарушения, травматические повреждения мозга, диабет, депрессия, эпилептические эпизоды [12-17]. Для практически всех вышеперечисленных патологических состояний нарушения функций митохондрий играют роль и как непосредственный участник развития нарушений и как один из главных виновников вторичных нарушений и, в частности, последующей нейродегенерации, возможного развития когнитивных нарушений и в ряде случаев БА.

В частности, убедительные доказательства роли митохондрий в развитии эпилепсии следуют из наблюдений, симптоматики и изучения редких орфанных наследственных митохондриальных заболеваний, практически всегда сопровождающимися эпилептическими припадками, например MERRF-синдром (миоклонус-эпилепсия с наличием "рваных красных волокон" в мышечном биоптате) и MELAS-синдром (митохондриальная энцефаломиопатия, лактат-ацидоз, инсультоподобное

состояние). Мутации митохондриальной ДНК, нарушения митохондриальных функций и спонтанная судорожная активность проявляются при обоих заболеваниях [18]. Кроме того, эпилепсия значительно чаще встречается у больных БА, чем у здоровых людей того же возраста [19]: в три раза чаще для спонтанной формы БА и в 87 раз чаще у больных с наследственной формой БА [20]. А для больных, имеющих диагноз эпилепсия, с возрастом показана значительно большая частота возникновения БА [21].

Показана роль митохондрий в развитии и возникновении приобретенных форм эпилепсии, составляющих более 60% всех форм эпилепсии. Именно нарушения функций митохондрий и окислительный стресс становятся факторами, которые могут способствовать эпилептогенезу и хронической эпилепсии [22]. Дисфункция митохондрий при моделировании хронической формы эпилепсии (литий-пилокарпиновая модель) проявляется в снижении активности комплекса I и IV дыхательной цепи митохондрий, повышении активности комплекса II и снижении митохондриального потенциала [23]. Нарушения гомеостаза кальция в астроцитах и нейронах также являются фактором эпилептогенеза, и повышенная концентрация цитозольного кальция может вызывать чрезмерную синхронизацию нейронов, в том числе и в связи с нарушением захвата кальция митохондриями [24-26]. Именно поэтому, нормализация способности митохондрий регулировать цитозольный кальций, в значительной степени благодаря повышению их кальциевой ёмкости, способности буферизировать излишки кальция может быть одним из механизмов противосудорожной терапии.

Но описанное выше нарушение митохондриальных функций как при БА, так и ряде неврологических состояний с возможными нейродегенеративными последствиями, приводит не только к снижению способности митохондрий регулировать гомеостаз кальция в клетке, но и к снижению порога для индукции открытия пМП, что является ключевым этапом каскадов гибели клеток и приводит со временем к запуску порочного круга развития нейродегенеративных процессов. Именно поэтому митохондрии, регуляция их

способности накапливать ионы кальция и особенно процесс МП, являются крайне перспективной мишенью для поиска нейропротекторных препаратов [27-29].

2.2. Регуляция митохондриального гомеостаза кальция

Существуют различные способы увеличения устойчивости митохондрий к открытию пор МП, одним из перспективных подходов является регуляция кальциевого гомеостаза митохондрий. Это может быть реализовано через модуляцию процессов захвата и выброса кальция митохондриями, ингибированию формирования и открытия пор МП с соответствующим увеличением кальциевой ёмкости митохондрий, что особенно важно для нейронов в мозге. Поглощение Ca^{2+} в матрикс митохондрий реализуется через потенциал-зависимый митохондриальный унипортер Ca^{2+} (MCU), расположенный во внутренней мембране и представляющий собой белковый комплекс, состоящий из порообразующего компонента - и нескольких регуляторных единиц. Использование ингибиторов MCU предполагается как один из перспективных путей преодоления нейродегенеративных последствий после травматических повреждений мозга [30], при болезни Паркинсона, боковом амиотрофическом склерозе, БА [31]. С одной стороны, перегрузка митохондрий Ca^{2+} , особенно в условиях окислительного стресса, запускает открытие поры МП, что ведёт к гибели клетки, то есть стимуляции нейродегенеративного процесса. И в этом случае, применение ингибиторов митохондриального захвата кальция может обеспечить нейропротекторный процесс. Но, с другой стороны, увеличение митохондриального Ca^{2+} стимулирует митохондриальную биоэнергетику. Это предполагает физиологическую роль митохондриального Ca^{2+} в адаптации продукции энергии – АТФ – к нуждам физиологической активности данной клетки.

Поэтому важнее было бы предотвратить перегрузку митохондрий кальцием, не блокируя полностью вход кальция в митохондрии.

Учитывая то, что делеция MCU не полностью блокирует митохондриальный захват Ca^{2+} , можно предположить возможное существование дополнительных путей захвата Ca^{2+} митохондриями [32]. Одним из возможных таких путей является антипортер $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, способный работать также как K^+/H^+ обменник [33]. Также до сих пор обсуждается так называемая система «быстрого поглощения» Ca^{2+} (rapid uptake mode, RaM) [34], которая с большой скоростью обеспечивает захват кальция митохондриями в условиях низких концентраций цитозольного кальция. Но молекулярная природа этого механизма не известна, нокаут MCU нарушает также и митохондриальный захват кальция в режиме RaM, и есть предположение, что этот феномен реализуется также через MCU в особой структурной организации [35].

Выброс ионов кальция из митохондрий реализуется через антипортер $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCLX), расположенный также во внутренней митохондриальной мембране и использующий электрохимический градиент Na^+ для вытеснения Ca^{2+} из митохондрий, был недавно молекулярно идентифицирован. Есть экспериментальные доказательства того, что снижение активного выброса Ca^{2+} из митохондрий подавляется на ранних этапах патогенеза БА. Этот ранний компенсаторный ответ на метаболический стресс в нейроне затем быстро превращается дезадаптивный из-за перегрузки митохондрий кальцием и нейродегенеративных последствий этого. Таким образом, раннее подавление активного выброса кальция из митохондрий ускоряет развитие БА, а его увеличение может быть основой терапии для уменьшения прогрессирования БА и других нейродегенеративных заболеваний [36].

2.3.Соединения, влияющие на митохондриальные функции, как нейроактивные препараты

2.3.1. *Стимуляция клеточной биоэнергетики.*

Препараты, мишенью которых являются митохондрии условно можно разделить на группы: компенсация энергетической недостаточности при нейродегенерации – это стимуляторы клеточной и митохондриальной биоэнергетики и активаторы биогенеза митохондрий; митохондриальные антиоксиданты и нейропротекторы - соединения, увеличивающие устойчивость митохондрий к открытию пор МП.

Энергетическая недостаточность, характеризующаяся снижением потребления глюкозы и нарушениями митохондриальной биоэнергетики, является наиболее ранним признаком, проявляющимся уже на продромальной стадии болезни Альцгеймера [37]. Нарушения транспорта глюкозы через гематоэнцефалический барьер и её метаболизма используются как один из маркеров ранних стадий болезни Альцгеймера, но также является и одним из факторов патогенеза и перспективной терапевтической мишенью для предотвращения и лечения болезни Альцгеймера на ранних стадиях [38, 39].

Известно, что инсулинорезистентность повышает риск развития деменции [40]. Более того, в последние годы ряд исследователей называют болезнь Альцгеймера диабетом 3-го типа [41, 42]. Инсулин играет важную роль в метаболизме энергии в мозге и его рецепторы достаточно обширно представлены в височной доле мозга, играющей вместе с гиппокампом важную роль в формировании долговременной памяти, обработке визуальной и слуховой информации, понимании языка [43]. Известно, что инсулин-чувствительный переносчик глюкозы GLUT4 экспрессируется в участках мозга, связанных с процессами формирования памяти и когнитивными функциями, в частности в гиппокампе. Поэтому одним из путей активизации биоэнергетики мозга могло бы быть дополнительное его обеспечение

глюкозой, а частности, благодаря введению инсулина. Клинические испытания II/III стадии эффективности интраназального введения инсулина были проведены на достаточно репрезентативной выборке больных болезнью Альцгеймера и вселяют надежду на появления нового пути лечения этого заболевания [<https://www.aarp.org/health/dementia/info-2019/alzheimers-drugs-clinical-trials.html>, Craft S 2018]. В то же время, кажется маловероятным, что только обеспечение биоэнергетическими субстратами может обеспечить значительный терапевтический успех при лечении БА, особенно учитывая нарушения не только системы транспорта и метаболизма глюкозы, но и значительную дисфункцию митохондрий мозга при БА.

Гипометаболизм глюкозы в головном мозге при БА тесно связан с нарушением энергетического метаболизма в цепи окислительного фосфорилирования и в лобной, височной и парietальной части коры головного мозга у пациентов с БА коррелирует со сниженным уровнем тиаминдифосфата в крови, критического кофермента пируватдегидрогеназы и α -кетоглутаратдегидрогеназы в цикле Кребса и транскетолазы в пентозофосфатном пути [44]. Снижение активности дыхательной цепи митохондрий, экспрессии и активности отдельных комплексов этой цепи обнаруживается уже на ранних продромальных стадиях заболевания у людей и до проявления симптоматики на животных с моделью болезни Альцгеймера [45]. Более того, у трансгенных нематод *Caenorhabditis elegans* с экспрессией пан-нейронального β A даже до появления минимально определяемого уровня агрегатов β A наблюдается сниженная активность скорость-лимитирующего фермента цикла трикарбоновых кислот α -кетоглутарат дегидрогеназы. Этот эффект сопровождается более ранним увеличением карбонильных производных белков именно в митохондриях, что позволяет предположить триггерную роль нарушений редокс-состояния митохондрий в снижении α -кетоглутарат дегидрогеназы и увеличении продукции склонного к агрегированию β A [46]. Было показано, что лекарственный препарат для лечения диабета 2 типа, снижающий уровень глюкозы в крови - метформин

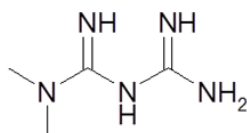
(Рисунок 1) даёт в данном случае положительный эффект: позволяет предотвратить снижение активности α -кетоглутарат дегидрогеназы, появление агрегатов β A и даже продлить жизнь свободноживущей нематоды *Caenorhabditis elegans*. При фармакологических концентрациях метформин увеличивает активность ДЦМ и деление (fission) митохондрий [47].

С нарушениями митохондриальных энергетических функций при болезни Альцгеймера связано и развитие направления «митохондриальных усилителей» для лечения ранних стадий болезни Альцгеймера. К их числу относятся коэнзим Q и его синтетический аналог – идебенон (Рисунок 1), способные переносить электроны от комплексов I и II на комплекс III, стимулировать работу электронно-транспортной цепи митохондрий и увеличивать продукцию АТФ. Также эти соединения обладают антиоксидантной и радикал-связывающей активностью. Ранее было показано значительное увеличение соотношения окисленной формы коэнзима Q к общему его содержанию в спинномозговой жидкости больных с болезнью Альцгеймера [48, 49]. Данные о защитном эффекте коэнзима Q и его синтетических аналогов в различных *in vitro* и *in vivo* моделях амилоидоза и β -амилоидной токсичности, а также стимуляция им нарушенных когнитивных функций у возрастных животных и у диабетических крыс на фоне β -амилоида широко представлены в научной литературе [50]. Исследования возможности их применения, в том числе и при комплексной терапии продолжают и в настоящее время, несмотря на то, что не было показано значительной достоверной эффективности в клинических испытаниях [51-53].

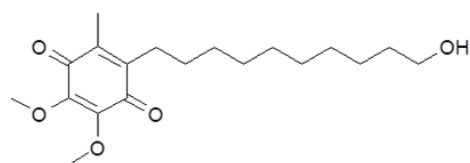
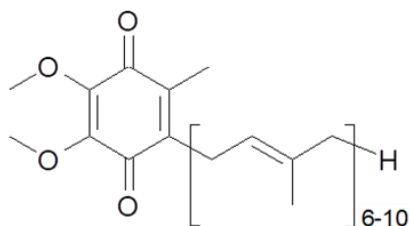
Близким по механизму взаимодействия с митохондриями, способным реализовывать альтернативный перенос электронов на цитохром оксидазу, увеличивая таким образом её активность и обладающий антиоксидантными свойствами, является препарат метиленовый синий (МС, Рисунок 1). МС является членом семейства фенотиазинов с широким спектром терапевтических и диагностических применений [54-56]. Благодаря сочетанию липофильных свойств и наличия отрицательного заряда (т.н. «липофильные

катионы») МС легко проникает через гематоэнцефалический барьер, клеточную и митохондриальную мембрану и диффундирует в митохондриальный матрикс, где при низких дозах он способен подвергаться окислительным и восстановительным процессам под действием ферментов электронтранспортной цепи, усиливая митохондриальное дыхание [57]. Таким образом, МС является мощным «шунтирующим» окислительно-восстановительным агентом с высокой биодоступностью для митохондрий, может снижать образование митохондриальных АФК и, соответственно, задерживать клеточное старение [58, 59]. МС является представителем так называемых мультитаргетных препаратов, способных одновременно действовать на несколько биомишеней. Так, помимо отмеченного действия на митохондрии, он модифицирует активность ряда мембранно-связанных переносчиков и ионных каналов, в частности, потенциал-зависимого Na^+ канала и Ca^{2+} -зависимого K^+ канала [60, 61], и активность холинэргической, моноаминэргической или глутаматэргической синаптической нейротрансмиссии [62-64] и, соответственно, может проявлять когнитивно-стимулирующие свойства. Многие исследователи связывают этот эффект не только с влиянием на рецепторные и ферментные структуры нейротрансмиттерных систем, но и в значительной степени с направленным на митохондрии действием [65]. Перечисленные выше свойства дали основание считать, что МС обладает высоким потенциалом для лечения ишемических и гипоксических расстройств, болезни Альцгеймера и некоторых других нейродегенеративных заболеваний [55, 56, 66, 67]. Важно отметить, что МС значительно снижает уровень аномальных агрегатов таких белков как хантингтина, α -синуклеина, тау-белка и β -амилоида. Однако возможные механизмы, благодаря которым реализуется защитный эффект, могут быть различными - от активации протеасомной системы, окислительно-восстановительного ингибирования процессов фибриллизации и соответствующего уменьшения количества олигомеров β -амилоида или α -синуклеина до ингибирования образования тау-фибрил с одновременным

Метформин

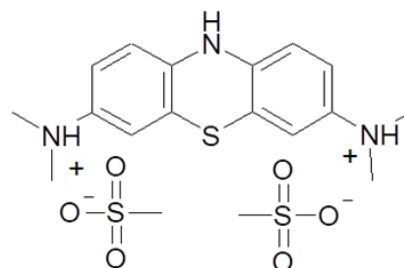
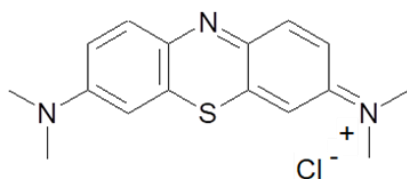


Идебенон



Метиленовый Синий

**Лейко-Метилтиониниум
Бис(Гидрометалсульфонат)**



29

Разобщение окислительного фосфорилирования, несмотря на отрицательное влияние на энергетические характеристики клетки, также рассматривается как возможный путь для нейропротекции. Как упоминалось ранее, вход Ca^{2+} в митохондрии зависит от митохондриального потенциала. FCCP - карбонилцианид-п- (трифторметокси)фенилгидразон, являющийся протонофором и сильным разобщителем окислительного фосфорилирования деполяризует митохондриальную мембрану и ингибирует поглощение Ca^{2+} митохондриями, в том числе и вызванное олигомерами $\beta\text{A}(1-42)$ и выброс цитохрома c из митохондрий [75]. Эти результаты предполагают возможность нейропротекторного эффекта деполяризующих разобщителей при условии отсутствия их значительной токсичности. Аллостерические модуляторы разобщающих белков могли бы представлять более безопасный альтернативный подход для фармакологического снижения митохондриального мембранного потенциала.

2.3.2. *Стимуляция биогенеза митохондрий.*

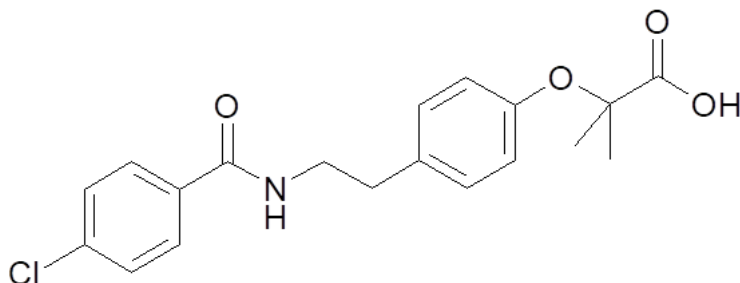
Другим путём компенсации сниженной митохондриальной функции может быть направление, связанное со стимуляцией биогенеза, т.е. de novo образования митохондриальных структур. Регуляторные механизмы, связанные с биогенезом митохондрий включают peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) и коактиваторы транскрипции, такие как peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 (PGC-1) family, ядерные транскрипционные факторы - nuclear respiratory factors 1 (NRF-1) and 2 (NRF-2) и митохондриальный транскрипционный фактор TFAM. Коактиватор транскрипции PGC-1 α является ключевым регулятором биогенеза митохондрий и активно экспрессируется в тканях с высоким потреблением энергии, в том числе и в мозге, особенно в период созревания, и является

основным регулятором биогенеза митохондрий, координируя экспрессию соответствующих транскрипционных факторов. Важно отметить, что содержание PGC-1 α значительно снижено в мозге больных болезнью Альцгеймера и уровень его экспрессии обратно пропорционален выраженности деменции [76]. Нарушения PGC-1 α -опосредованного биогенеза митохондрий обнаруживается у мышей с 3xTg моделью болезни Альцгеймера не только до появления олигомеров β -амилоида, но и раньше появления митохондриальных нарушений [77]. Таким образом, активация экспрессии PGC-1 α может быть перспективным путём преодоления биоэнергетического дефицита при болезни Альцгеймера. Вместе с тем, избыточная активация PGC-1 α ведёт к аномальному биогенезу митохондрий и оказывается токсичной, в том числе и вызывая нарушение когнитивных функций [78]. Поэтому оптимальным путем было бы увеличение PGC-1 α благодаря активации его регулятора – PPAR. Агонист PPAR (α , β/δ , γ) безафибрат (Рисунок 2), используемый для лечения дислипидемии, снижает уровень таубелка, активацию микроглии, усиливает биогенез митохондрий и улучшает поведенческие характеристики у трансгенных мышей с моделью таупатии P301s [79], и в настоящее время проходит клинические испытания для лечения болезни Альцгеймера. Агонисты PPAR- γ - тиазолидинтионы, пиоглитазон и розиглитазон (Рисунок 2), используемые для лечения диабета, в значительной степени могут стимулировать биоэнергетику нейронов и улучшать память у мышей с моделью болезни Альцгеймера. Другой PPAR-гамма агонист розиглитазон проявил значительное улучшение когнитивных функций в испытаниях на ограниченной группе пациентов со слабыми когнитивными нарушениями. К сожалению, в развёрнутых клинических испытаниях не было выявлено достоверной эффективности, кроме того, это соединение слабо проникает через гематоэнцефалический барьер [80-84].

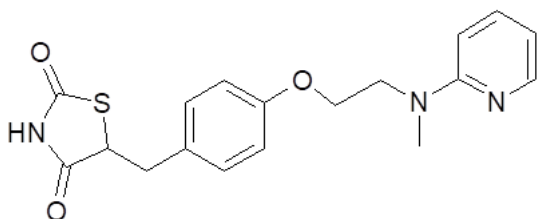
Биоэнергетическое «усиление» и стимуляция биогенеза митохондрий являются очевидными мишенями для лекарственных препаратов, применяемых на крайне ранних стадиях альцгеймеро-подобной патологии, но

их применение как единственного лечения для больных с выраженной симптоматикой вряд ли окажется достаточно эффективным.

Безафибрат



Розиглитазон



Пиоглитазон

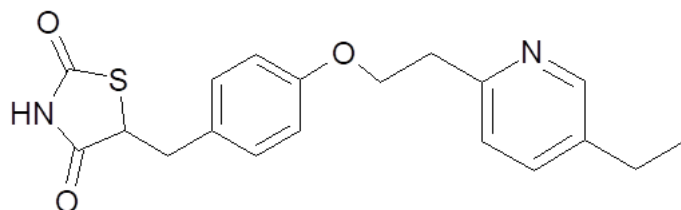


Рисунок 2 Стимуляторы митохондриального биогенеза

2.3.3. *Ингибиторы процесса открытия пор митохондриальной проницаемости.*

Еще одно, и пожалуй, одно из наиболее очевидных и перспективных направлений создания лекарственных препаратов для лечения болезни Альцгеймера – это поиск нейропротекторов, основным механизмом действия которых является увеличение устойчивости митохондрий к индукции открытия пор МП. Это могут быть лиганды киназ, действие которых связано с регуляцией чувствительности пор МП. В частности, регуляция пор МП связана с активностью киназы гликоген-синтазы 3β (КГС- 3β).

Фосфорилирование КГС-3 β по серину 9 положительно коррелирует с порогом открытия пор МП: ингибирование КГС-3 β снижает связывание CyP-D с ANT, взаимодействие которых может значительно снизить порог открытия пор МП [85].

Но прежде всего, это ингибиторы поры МП, включая и модуляторы кальциевого гомеостаза митохондрий, антиоксиданты и упоминаемые выше разобщители окислительного фосфорилирования.

Важнейшей кальций-зависимой функцией митохондрий является их ключевая роль в запуске каскадов клеточной гибели как результата индукции процесса МП. Впервые этот феномен был показан в 1979 году в работе [86]. Физиологическая роль этого процесса не ограничивается апоптотической элиминацией клеток в процессе развития, уничтожением скомпрометированных митохондрий (митоптоз) и клеток, но также связана и с регуляцией физиологических функций в возбудимых клетках - функционированием поры как быстрого канала выхода кальция из митохондрий, особенно в состоянии обратимой низкопроводимой формы [87-92]. Недавно была показана ещё одна потенциальная физиологическая роль МП, вернее, её обратимой низкопроводимой формы, результатом которой могут быть мерцательные всплески продукции и выброса из митохондрий супероксида – именно эти вспышки супероксида являются сигнальным триггером дифференциации нейрональных клеток-предшественников в зубчатой извилине гиппокампа [93].

Тем не менее, именно ингибиторы МП способны предотвращать развитие нейродегенеративных процессов и могут рассматриваться как потенциальные нейропротекторы. Существуют различные подходы к поиску соединений, способных увеличивать устойчивость митохондрий к индукции открытия пор МП. Прежде всего, это традиционный подход выявления молекулярных мишеней с известными структурами связывающих центров с дальнейшим виртуальным и экспериментальным скринингом различных химических структур. Этот путь тесно связан с вопросами состава, структуры

образуемой поры МП и знанием механизмов действия её эндогенных регуляторов. Однако, несмотря на крайне интенсивное изучение этой проблемы она остаётся ещё очень далекой от разрешения. Первоначально появление неспецифической проницаемости митохондриальных мембран связывали с активностью фосфолипаз и именно с разрушением мембран [94]. В научной литературе можно встретить несколько гипотез структуры поры МП. Комплекс, состоящий из поли-R-3-гидроксibuтирата, полифосфатов и катионов кальция (РНВ/polyp/ Ca^{2+} комплекс), выделенный из митохондрий печени крыс, обладает свойствами, схожими со свойствами поры МП [95], позже было показано, что поли-R-3-гидроксibuтират является частью системы митохондриального ионного транспорта с высоким сродством к ионам Ca^{2+} [96]. Важно отметить, что полифосфат играет существенную роль в митохондриальном метаболизме и в процессах накопления Ca^{2+} митохондриями. Экспериментально показано, что снижение уровня полифосфата увеличивает кальциевую ёмкость митохондрий и снижает вероятность Ca^{2+} -вызванного открытия поры МП [97]. Как гидролиз, так и образование полифосфата может быть связано с активностью митохондриальной АТФ-синтазы, причём для образования необходимо присутствие субстратов дыхательной цепи и неорганического фосфата [98].

В рамках гипотезы о строении поры как мультибелкового образования было предложено значительное количество гипотез, предполагающих, что структура поры может быть сформирована с участием таких компонентов митохондриальных мембран как: в наружной мембране митохондрий - потенциал-зависимый анионный канал (VDAC), апоптоз-регулирующие белки семейства Bcl-2 (олигомеры Bax и Bak с участием Bid белка); во внутренней мембране митохондрий - ряд митохондриальных мембранных транспортных систем, в частности, транслоказа адениновых нуклеотидов (ANT) и переносчик неорганического фосфата (PiC); а также металлопротеиназа спастической параплегии 7 (SPG7), c-субъединица F₀-АТФ-синтазы и димеры фермента F₁F₀-АТР синтазы во внутренней мембране (Рисунок 7). Кроме

того, показано, что с-субъединица F₀-АТФ-синтазы при взаимодействии с PNB/polyp/Ca²⁺ комплексом также могут образовывать канал, обладающий свойствами пор МП [99]. Вместе с тем, для всех вышеперечисленных кандидатов есть экспериментальные молекулярно-генетические доказательства возможности формирования пМП без их участия [88, 100-104].

Пожалуй, единственный компонент пМП, регуляторная роль которого не оспаривается - это пептидил-пролил, цис-транс изомеразы циклофилин D - [105, 106].

Кроме того, функциональная активность поры зависит от редокс-статуса митохондрий, наличия неорганического фосфата, а также креатинкиназы, TSP0 - транслокаторного белка (до 2006 года называвшегося периферическим бензодиазепиновым рецептором), и состояния компонентов дыхательной цепи [107-110].

Открытие пор МП регулируется потоком электронов через комплекс дыхательной цепи I. Повышенная вероятность открытия пор наблюдается в митохондриях скелетных мышц, когда поток электронов увеличивается через комплекс I (но не через комплекс II, III или IV). Кроме того, убихинон 0 и децилубихинон являются мощными ингибиторами МП независимо от метода, используемого для индукции открытия пор МП, что указывает на то, что эти хиноны являются общими ингибиторами пор. Убихинон 0 столь же эффективен, как и ЦсА, в присутствии субстратов комплекса II сукцината, и более эффективен, чем ЦсА в присутствии субстратов комплекса I глутамата и малата. Если предположить, что эндогенные убихиноны связываются со структурными элементами пор МП, стабилизируя их в закрытой конформации, увеличение потока электронов через комплекс I может вытеснить убихиноны с этого сайта, увеличив, в свою очередь, вероятность открытия поры [111].

Существует также гипотеза о том, что пора МП образована мембранными белками с нарушенным вследствие окислительного и прочих

видов стресса фолдингом и ее регулируют шапероноподобные белки, к которым относится, в частности, и циклофилин Д [112].

Циклофилин Д блокирует проводимость через эти белковые агрегаты, но когда число подобных белковых кластеров превышает количество циклофилина Д, происходит нерегулируемое открытие пор, стимулированное кальцием и ингибируемое связыванием ЦсА с циклофилином Д. Функции неизбирательного канала, взаимодействующего с кардиолипином и обеспечивающего выброс цитохрома С из митохондрий могут играть и патогенетически связанные с нейродегенеративными заболеваниями олигомерные формы тау белка-441, α -синуклеина, β -амилоидного пептида, [113], в том числе и благодаря связыванию с проапоптотическими белками Вак семейства bcl2 [114]. Показано, что олигомеры А β могут образовывать неспецифический ионный канал как в клеточной мембране, так и в мембране митохондрий [115]. Анализ трехмерной структуры показал, что олигомеры А β могут образовывать канал и в липидном бислое, и этот канал проявляет сильное селективное сродство к ионам кальция [116, 117].

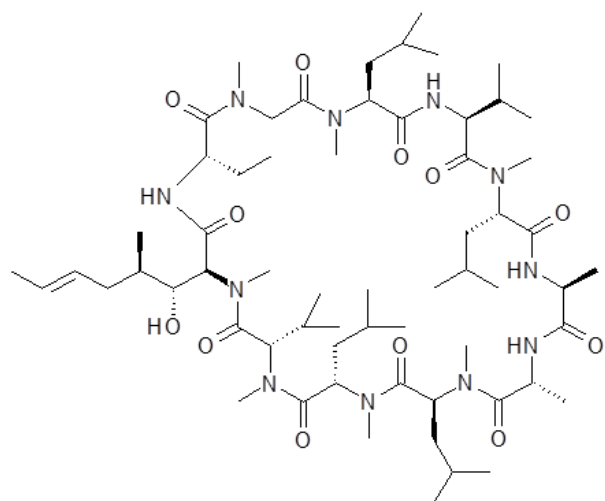
В соответствии с моделями структуры поры МП было разработано значительное количество её специфических ингибиторов как лигандов её потенциальных структурных составляющих.

Прежде всего, это лиганд циклофилина Д – специфический и высокоэффективный ($IC_{50}=0.5nM$) ингибитор МП циклоспорин А (Рисунок 3). Однако поскольку он обладает рядом нежелательных свойств - иммуносупрессивным действием, активно секвестрируется эритроцитами, плохо проникает через гематоэнцефалический барьер и др., были разработаны его неиммунносупрессивные производные и аналоги. В частности, это алиспоривир (Рисунок 3, Debio025), который десенситизирует МП, но не влияет на активность кальцинейрина, снижает интенсивность некротической гибели клеток, и оптимизирует кальциевые сигналы в состоянии стресса у мышей с моделью миодистрофии Дюшенна; N-метил-4-изолейцин-циклоспорин - NIM811 (Рисунок 4), показавший способность восстанавливать

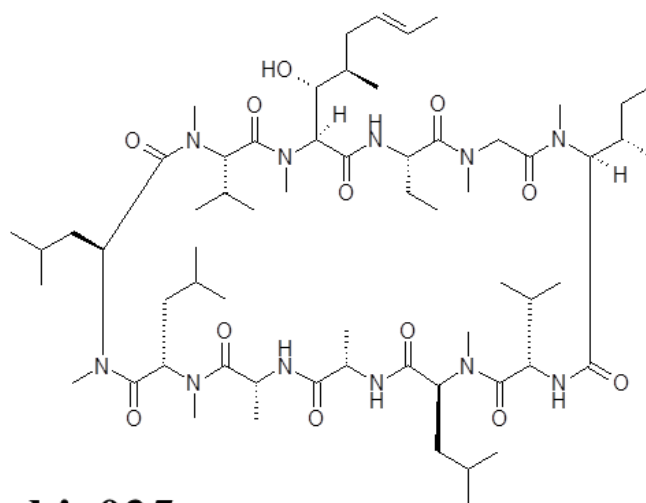
как характеристики митохондрий, так и снижать маркеры апоптоза и уменьшать площадь дегенерации в спинном мозге, а также функциональные характеристики [118]; и низкомолекулярные лиганды циклофилина Д - ингибиторы МП, такие как производное 4-аминобензолсульфонамида - С-9 (Рисунок 3), который также предотвращает Аβ-индуцированные набухание митохондрий и гибель клеток [119-121].

Было также выявлено значительное количество циклофилин Д независимых ингибиторов МП - производные имидазолов, тиadiaзолов, мочевины; N-фенил-бензамидины, изоксазолы и другие [122]. В частности, это соединения, предотвращающие олигомеризацию VDAC1 и, соответственно, образование неспецифического канала в наружной мембране митохондрий как компонента поры МП, связанного с выбросом цитохрома С из митохондрий [123, 124]. В результате скрининга библиотеки из 1,468 соединений с использованием метода биолюминесцентного резонансного переноса энергии для оценки VDAC1 олигомеризации были выделены соединения-лидеры – замещённые производные пиперазина и пиперидина VBIT-3 и VBIT-4 (Рисунок 4), которые ингибируют не только олигомеризацию VDAC1, но и предотвращают деполяризацию и выброс цитохрома С из митохондрий и апоптоз [125]. Для соединения-лидера группы коричневых анилидов GNX-4728 (Рисунок 4) показано, что ингибирование кальций-индуцированного и потенцированного окислительным стрессом процесса МП связано со стабилизацией взаимодействия между другими предполагаемыми компонентами поры МП - РiС и с-конформацией ANT.

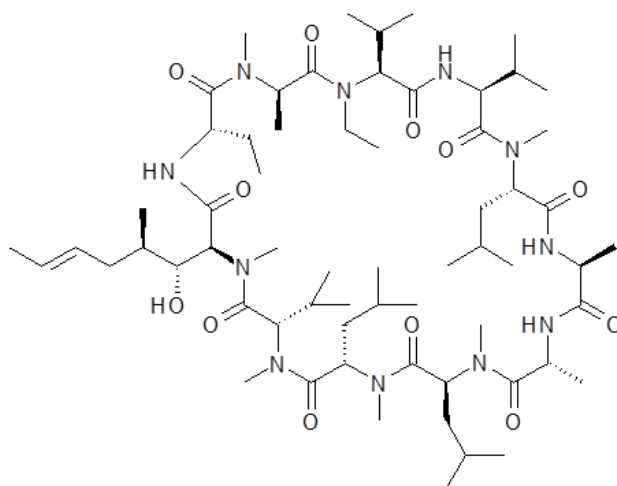
Циклоспорин А



NIM811



Debio025



C-9

Производное 4-аминобензенсульфоната

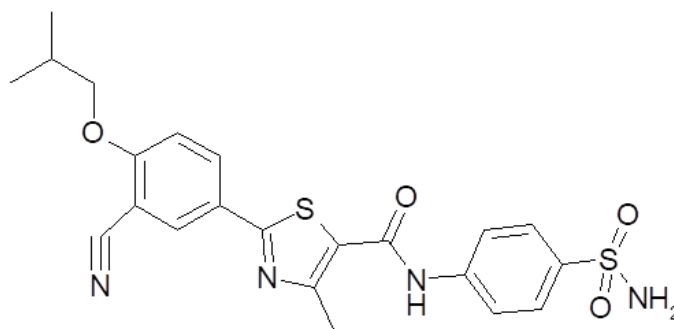
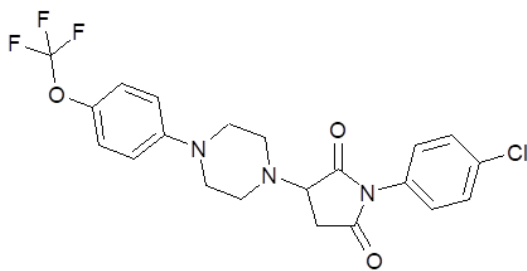
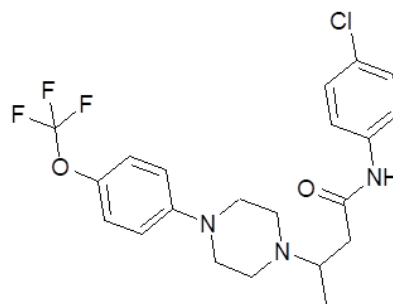


Рисунок 3 Ингибиторы МРТ – лиганды циклофилина Д

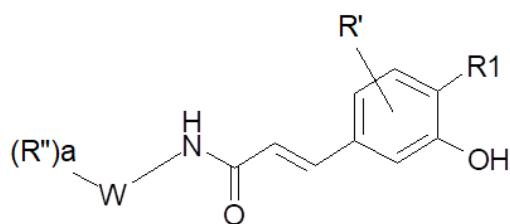
VBIT-3



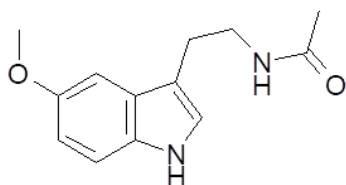
VBIT-4



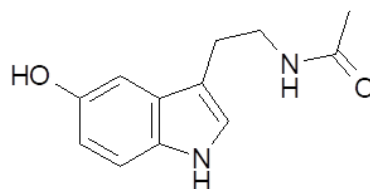
**Коричный анилин
GNX-4728**



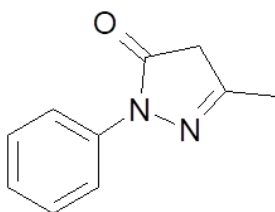
Мелатонин



N-ацетилсеротонин



Эдаравон



SkQT1

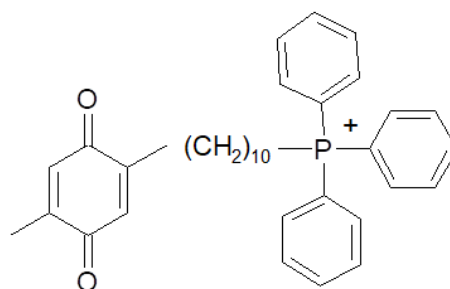


Рисунок 4 Ингибиторы МРТ – циклофилин Д независимые

Ингибирование МП соединением GNX-4728 сопровождается увеличением кальциевой ёмкости митохондрий мозга. Как следствие митопротекторной активности, для этого соединения показано улучшение моторных функций, выживаемости мотонейронов и функциональной целостности нервно-мышечного соединения у мышей с мутацией супероксид дисмутазы - hSOD1-G37R, которые являются трансгенной моделью амиотрофического латерального склероза (БАС) [126].

Однако данных по проведению или инициации клинических испытаний для лечения болезни Альцгеймера или других нейродегенеративных заболеваний для вышеописанных соединений в настоящий момент ещё нет.

Значительная часть соединений с показанным нейропротекторным потенциалом также обладают всеми характеристиками ингибиторов или десенсibilизаторов МП, но не имеют установленной молекулярной мишени как компонента поры МП. Более того, наиболее распространённые в настоящее время методы скрининга ингибиторов пМП являются скорее фенотипическими [127, 128]. Одним из первых препаратов, предотвращающих открытие пМП и предназначенных для лечения болезни Альцгеймера был димебон (Рисунок 5). Уникальной особенностью димебона можно назвать мультинаправленность его действия, наличие когнитивно-стимулирующего и нейропротекторного эффектов с соответствующим сочетанием мишеней. Когнитивно-стимулирующий эффект препарата связывают, в основном, с ингибированием ряда нейрональных рецепторов и ионных каналов, в том числе серотониновых 5-HT₇ рецепторов, глутаматных рецепторов и потенциал-зависимых кальциевых каналов L-типа [129-132]. Отличия в эффективных концентрациях при действии на эти мишени могут быть причиной и наблюдаемой волнообразной дозозависимости когнитивно-стимулирующего эффекта Димебона в *in vivo* экспериментах [133]. Важной особенностью действия Димебона является его способность именно нормализовать нарушенные в условиях стресса или патологии функции. В

частности, не вызывая изменений в составе фосфолипидов мозга, Димебон нормализовал нарушения фосфолипидного состава, вызванные одновременным введением фактора некроза опухолей [134]. Нейропротекторный потенциал димебона может во многом быть результатом его способности увеличивать функциональную устойчивость митохондрий. На изолированных митохондриях печени и мозга крыс было показано, что димебон подавляет индукцию МП различными стимулами (ионами фосфата, кальция или трет-бутилгидроксипероксидом – тБГП). Ингибирование индукции МП димебоном сопровождается увеличением кальциевой ёмкости митохондрий [135], что вносит свой вклад в когнитивно-стимулирующие свойства димебона, нормализуя синаптическую нейротрансмиссию. Нейропротекторный эффект димебона широко подтверждается на клеточных культурах: как защита от глутаматной эксайтотоксичности, амилоидной, МФП⁺-, АF64А-, тБГП- и иономицин-вызванной токсичности и т.п. С использованием первичной культуры нейронов коры головного мозга мышей и клеток нейробластомы человека SH-SY5Y было показано, что уже наномолярные концентрации димебона увеличивают выживаемость клеток при иономицин-вызванной токсичности, стабилизируют митохондриальный трансмембранный потенциал и увеличивают уровень АТФ в клетке [136].

В то же время, важно отметить, что и для одобренного в настоящее время для лечения БАС препарата эдаравона (Рисунок 4) [137] помимо антиоксидантного и радикал-связывающего эффекта, показана способность ингибировать открытие пМП, в том числе и потенцированное Аβ [138, 139].

Молекулярная мишень в составе поры МП для этого соединения не определена. Другое соединение, активно развиваемое в настоящее время как потенциальный лекарственный препарат для лечения БАС - TRO19622 (Рисунок 5, Olesoxime) является лигандом предполагаемого регулятора поры МП - митохондриального транслокаторного белка 18 кДа (TSPO). TSPO расположен в основном в местах контакта внешней и внутренней митохондриальных мембран. TSPO транспортирует холестерин через

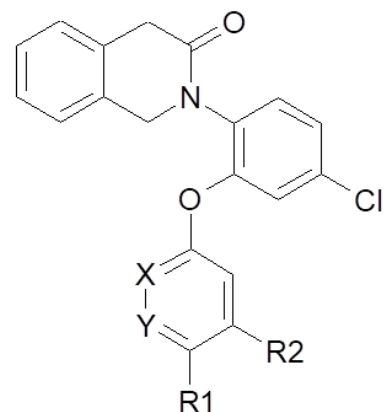
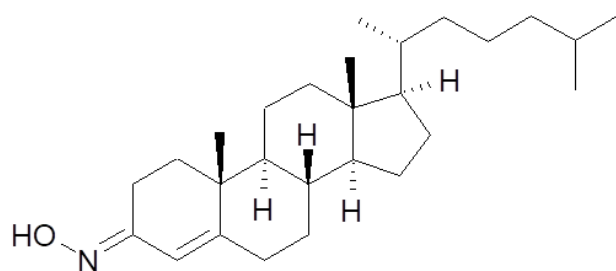
митохондриальные мембраны и регулирует митохондриальный стероидогенез, в том числе и продукцию нейростероидов. Лиганды TSPO могут играть важную роль в нейропротекции как благодаря модуляции эндогенной продукции нейростероидов в нервной системе [140], так и благодаря регуляции процесса МП [141-145].

Нейропротекторную и митопротекторную активность на клеточных моделях амилоидоза и таупатии проявили производные имидазо [1,2-с] хиназолинона (Рисунок 5), которые являются высокоаффинными лигандами TSPO. Эти соединения увеличивают сниженный синтез прегненолона в митохондриях клеток нейробластомы с повышенной экспрессией предшественника амилоидного пептида, а также в клетках с оверэкспрессией тау-белка, в том числе и с мутацией характерной для AD - P301s. Кроме того, они в значительно меньшей концентрации эффективно восстанавливают синтез АТФ, повышают митохондриальный потенциал [146-148].

Ряд лигандов TSPO в настоящее время проходят II или III фазы клинических испытаний: TRO40303 (Олезоксим) как кардиопротектор, снижающий последствия реперфузии, XBD173 и этофоксин как анксиолитики и TRO19622 как потенциальное лекарственное средство для мышечной атрофии позвоночника (SMA) и БАС (Рисунок 5). Олезоксим увеличивает выживание мотонейронов, а *in vivo* у трансгенных мышей с мутациями супероксиддисмутазы, характерными для БАС (SOD1G93A), улучшает двигательную активность, задерживает начало клинического заболевания и продлевает выживание животных, причём этот эффект авторы связывают именно с подавлением открытия пМП и высвобождения цитохрома C из митохондрий [149]. Также показан нейропротекторный и митопротекторный эффект олезоксима TRO19622 и на модели амилоидоза как модели БА (Thy-1-A β PPSL). TRO19622 восстанавливает активность комплекса IV дыхательной цепи митохондрий и митохондриальный потенциал в диссоциированных клетках мозга Thy-1-A β PPSL мышей, хотя увеличивает уровень A β ₍₁₋₄₀₎ [150].

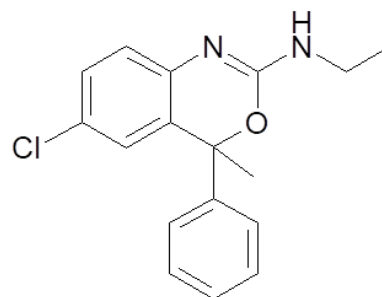
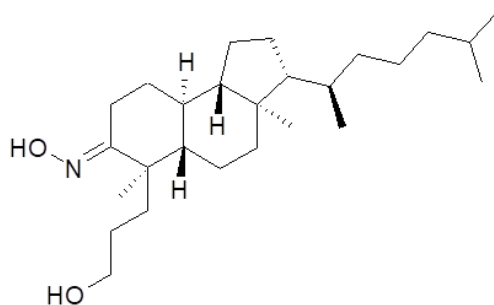
TRO19622 (Олезоксим)

**Производные имидазо[1,2-с]
хиназолинона**



TRO40303

Этифоксин



XBD173

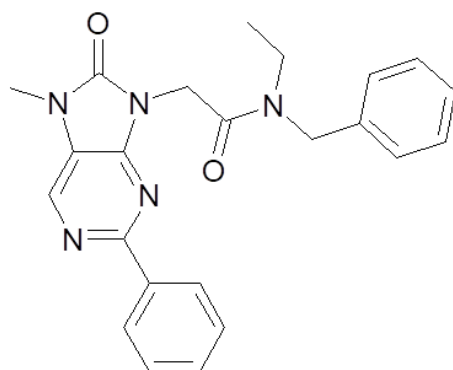


Рисунок 5 Ингибиторы МП –лиганды транслокаторного белка TSPO

2.4. Ингибиторы МП как пронеурогенные препараты

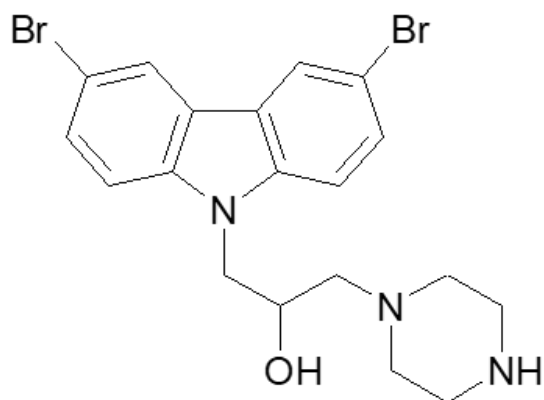
Весь накопленный массив данных о структуре и регуляции пор МП, во многом противоречивый, может свидетельствовать о том, что процесс формирования пор МП зависит как от типа клеток, в которых находятся митохондрии, так и от условий в данный момент времени, от соиндукторов её открытия. То есть пора МП может быть образована различными ансамблями участников и регулироваться различным набором регуляторов. И тем не менее, не вызывает сомнения тот факт, что увеличение устойчивости митохондрий к индукции МП имеет большое значение как для стимуляции синаптических функций и нейропротекторного потенциала, так и для синаптической пластичности и нейрогенеза.

Во время нейрогенеза в субвентрикулярной зоне 60% клеток новорожденных подвергаются клеточной гибели в течение 6-дневного периода [151], а в зубчатой фации гиппокампа 50% нейронов новорожденного умирают в базовых условиях [152]. Существует множество данных о том, что запрограммированная гибель клеток является одним из важнейших регуляторов нейрогенеза и у взрослых и значительное число новых нейрональных клеток подвергается гибели [153]. Поэтому стратегии выживания клеток для усиления нейрогенеза *in vivo* могут быть очень перспективным направлением. А процесс МП как ключевой этап апоптоза может быть важным регулятором нейрогенеза у взрослых.

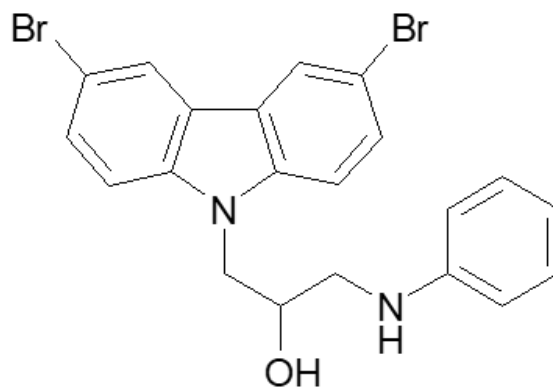
Так, специфический ингибитор МП циклоспорин А увеличивает *in vitro* количество нейросфер и *in vivo* количество нейрональных клеток-предшественников в зубчатой фации гиппокампа, в значительной степени благодаря способности увеличивать выживаемость вновь дифференцированных клеток, что связано с его свойством ингибировать МП [154]. Стимулируют нейрогенез в гиппокампе также димебон и бром-содержащий карбазол Serono-1 (Рисунок 6), причем авторы отмечают корреляцию между митопротекторным эффектом, нейропротекцией и

пронейрогенной активностью: наиболее активное соединение во всех тестах — соединение-лидер P7C3 (Рисунок 6) в ряду аминопропилкарбазолов, менее активны Serono-1 и димебон [155].

Serono-1



P7C3



Димебон (латрепирдин)

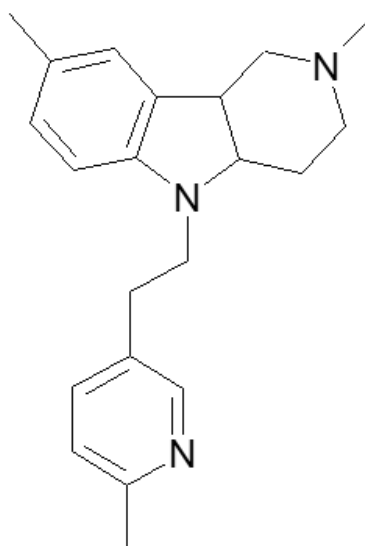


Рисунок 6 Ингибиторы МРТ как пронейрогенные препараты

Как в вопросах выживаемости-гибели зрелых и вновь образованных нейронов, так и в вопросе дифференцировки полипотентных клеток при нейрогенезе митохондрии играют крайне важную роль. Дифференцировка полипотентных клеток в нейроны сопровождается переключением биоэнергетики клетки с анаэробного гликолиза на аэробное окислительное фосфорилирование. Образующиеся при работе дыхательной цепи в результате кратковременного локального открытия пМП «вспышки» (flash) образования супероксид-анионов, по-видимому, являются одним из механизмов регуляции дифференцировки этих клеток. В зависимости от частоты вспышек-открытия пМП и выброса супероксид-аниона клетка либо включает каскад дифференцировки, либо реагирует на повышение свободных радикалов супероксид-анионов запуском апоптоза или некроза. [93, 156]. Поэтому, очень перспективными представляются, именно модуляторы МП, т.е. соединения, увеличивающие устойчивость митохондрий к индукции МП, увеличивающие пороговые значения ионов кальция, при которых наблюдается необратимое открытие пМП, но не подавляющих полностью этот процесс.

2.5. Митохондрии как регуляторы синаптической пластичности

Благодаря способности регулировать внутринейронный, внутрисинаптический кальций, уровень АТФ и продукцию АФК митохондрии играют ключевую роль и в других процессах нейропластичности - способности мозга адаптивно изменяться прежде всего структурно и функционально в процессе обучения, запоминания, а также в ответ на повреждение как под действием экотоксинов, травматических и эпилептических повреждений мозга [25, 157, 158], так и связанное с развитием возраст-зависимых нейродегенеративных процессов [159]. В частности, в процессах важных для обучения и формирования памяти - в динамической регуляции долговременной потенциации и долговременной депрессии (ДВП и

ДВД), высвобождении нейромедиаторов и в ремоделировании синапсов [160-162]. Показано участие изоформ потенциал-зависимого анионного канала - VDAC1 и VDAC3 и угнетающая роль внутрижелудочкового введения высокоаффинного ингибитора МП циклоспорина А в процессах ДВП [163]. Оценка соотношения процессов ДВП/ДВД в значительной степени используется во многих различных экспериментальных условиях и на животных моделях в качестве индикатора когнитивной функции; и нарушение регуляции ДВП/ДВД является характерной чертой ряда состояний с риском нейродегенерации и нейродегенеративных заболеваний, в частности, болезни Альцгеймера [164]. Состояния, которые способствуют ДВД, например после значительного повышения внутриклеточных олигомерных форм А β , способствуют потере синапсов. С другой стороны, восстановление способности нейронов к ДВП, может представлять собой защитный механизм для сохранения синаптической пластичности и когнитивных функций. Введение ингибитора МП циклоспорина А восстанавливает нарушения соотношения процессов ДВП/ДВД в срезах гиппокампа после травматического повреждения мозга [157].

Стимуляция энергетической функции митохондрий мозга также может быть основой для восстановления синаптической пластичности. Так, ацетил-L-карнитин (ALC), который является донором ацетильной группы для образования ацетилкофермента А без расходования АТФ и кислорода, способен восстанавливать процессы ДВП на модели ишемии, вызванной азидом натрия. Таким образом, ALC обеспечивает улучшение энергетического обеспечения нейронов в условиях нейротоксичности, а также обладает антиоксидантным эффектом. Важно, что одновременно ALC восстанавливает функционирование митохондриального дыхательного комплекса IV, нарушенного в ишемической модели ДВП [165].

Антиоксидантная активность, направленная на преодоление именно митохондриального окислительного стресса, также может явиться механизмом восстановления синаптической пластичности. Введение

митохондриально-направленного антиоксиданта SkQT1 (**Ошибка! Источник ссылки не найден.**) восстанавливало ДВП, нарушенное введением токсичной формы бета-амилоида (1-42) в область СА1 гиппокампа крысы [166].

Таким образом, соединения, способные поддерживать энергетическую функцию митохондрий и предотвращать аберантную продукцию свободных радикалов, снижать уязвимость митохондрий к индукции МП и нормализовать кальциевый гомеостаз могут влиять и на нарушенные при нейродегенеративных заболеваниях процессы синаптопластичности и таким образом улучшать процессы формирования памяти.

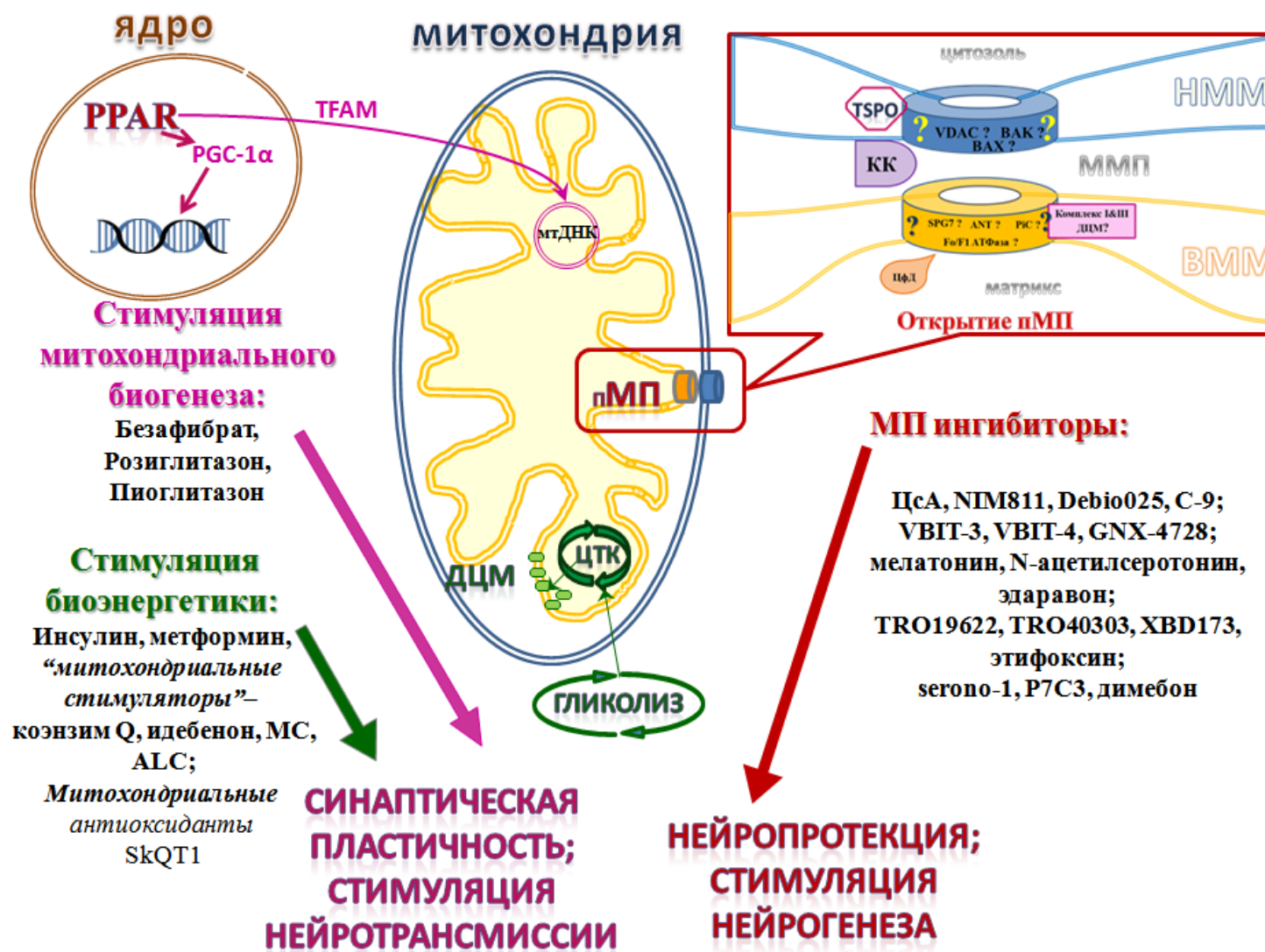


Рисунок 7 Основные, связанные с митохондриями мишени и их нейробиологические эффекты

(ЦТК- цикл трикарбоновых кислот; ДЦМ – дыхательная цепь; НММ- наружная митохондриальная мембрана; ВММ- внутренняя митохондриальная мембрана; ММП - межмембранное пространство; пМП- пора митохондриальной проницаемости – VDAC – потенциал-зависимый анионный канал, BAX and BAK – проапоптотические белки Bcl-2 семейства, TSPO – транслокаторный белок, КК – креатин киназа, SPG7 - параплегин, ANT – переносчик адениновых нуклеотидов, PiC – фосфатный переносчик, ЦфД – циклофилин Д; PPAR – Рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами, PGC-1 α - Коактиватор гамма-рецептора, активируемого пролифератором пероксисом, 1-альфа, TFAM – митохондриальный транскрипционный фактор A).

2.6. Мультитаргетные нейроактивные препараты.

В последнее время для лечения возраст-зависимых нейродегенеративных заболеваний нарастающую популярность приобретают направления создания лекарственных препаратов с мультитаргетным типом действия, т.е. обеспечивающим влияние на несколько мишеней одновременно [167]. Оптимальным может быть сочетание мишеней, способных одновременно обеспечить наличие у потенциального лекарственного препарата когнитивно-стимулирующего эффекта, компенсируя уже утраченные функции, нейропротекторного эффекта, благодаря которому возможно замедлить или даже остановить нарастающую гибель нейронов и способности воздействовать на специфические болезнь-формирующие механизмы, в частности, для болезни Альцгеймера это механизмы, связанные с продукцией токсичных форм олигомеров A β и тау-белок связанные патологии. При создании таких препаратов оценка их потенциальной нейропротекции, их способности снижать уязвимость митохондрий к индукции МП приобретает особое значение.

Обоснование возможности создания препаратов, целенаправленно конструируемых для одновременного воздействия на различные клеточные мишени, участвующие в патогенезе заболевания базируется на знании о взаимозависимости различных клеточных путей и наличия общих структурных компонентов в различных клеточных структурах. Так, в последние годы получен ряд данных о существовании и в мембране митохондрий кальциевых каналов, подобных рецептор-связанным ионным каналам плазматической мембраны. Показано, что изоформы натрий-кальциевого обменника плазматической мембраны (NCX) также экспрессируются и в митохондриях [168]. Серотониновые рецепторы 5-HT₃ и 5-HT₄ подтипов также могут быть локализованы в митохондриальной мембране и их лиганды ингибируют процесс МП [169].

Никотиновые ацетиохолиновые рецепторы ацетилхолина $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$ обнаружены в наружной мембране митохондрий, и показано, что они регулируют активность потенциал-зависимого анионного канала (VDAC) и МП [170, 171]. В последние годы было показано, что препарат донепезил, классический ингибитор АХЭ, одобренный А для лечения АД, оказывает, прежде всего, симптоматическое действие на пациентов с АД, улучшая их когнитивные функции. Но он же проявляет нейропротекторные свойства, снижая скорость атрофии мозга [172]. И вероятно, механизмом его нейропротекторного эффекта может быть именно влияние на митохондрии – на чувствительность их к индукции МП. Было показано, что донепезил снижает А β потенцированное набухание изолированных митохондрий мозга, увеличивая продукцию АТФ и снижая накопление А β в митохондриях, а также снижает и чувствительность к индукции МП изолированных митохондрий мозга трансгенных мышей APP/PS1 практически до уровня контрольных мышей [173]. Есть экспериментальные основания полагать, что нейропротекторный эффект донепезила, как и других применяемых в настоящее время для лечения болезни Альцгеймера ингибиторов АХЭ -

галантамина и ривастигмина может быть связан со стимуляцией $\alpha 7$ - and $\alpha 4$ -подтипов никотиновых рецепторов ацетилхолина (nAChRs) [174, 175].

Ряд работ свидетельствует о схожести (общности) глутаматных рецепторов и некоторых митохондриальных структур. ND2-субъединица комплекса I дыхательной цепи митохондрий (ДЦМ), которая кодируется митохондриальной ДНК, одновременно является адаптерным белком, обеспечивающим связывание Src тирозинкиназы с NMDA-рецепторным комплексом [176]. Показано, что митохондриальные мембраны содержат как NMDA-глутаматные, так и ГАМК рецепторы [177]. Кроме того, митохондрии экспрессируют белки комплекса кальциевого канала NMDA рецептора, и формируют рецепторно-канальный комплекс, функционально ему идентичный. Причём, направленная экспрессия NR1-NR2a субъединиц NMDA-рецепторного комплекса увеличивает внутримитохондриальный кальций и защищает нейрональные клетки от глутаматной токсичности [178].

Всё вышесказанное может быть теоретическим обоснованием перспективности и реализуемости направления поиска мультитаргетных лекарственных препаратов, которые будут одновременно влиять на нейротрансмиттерные характеристики нейрона и обеспечивать митохондриальный тип нейропротекции. К мультитаргетным препаратам можно отнести и значительную часть уже используемых для лечения или разрабатываемых препаратов – мемантин и донепезил, димебон, олезоксим и т.д. [149, 179, 180].

Особый интерес представляет направленный поиск митопротекторных препаратов, способных оказывать защитное действие на самых ранних стадиях развития НДЗ. При этом большое практическое значение могут иметь препараты сочетающие способность увеличивать устойчивость митохондрий к индукции проапоптотических событий с воздействием на другие биомешины: как участвующие в патогенезе заболеваний и связанные с формированием так называемые «болезнь образующих факторов», в частности, с процессами образования и преодоления токсичности A β или

гиперфосфорилированного тау белка; так и на мишени (рецепторы или ферменты), обеспечивающие нейротрансмиттерное усиление и способные обеспечить компенсаторную стимуляцию когнитивных функций. Можно ожидать, что такие препараты будут способны обеспечить одновременно нейропротекторный эффект, стимуляцию когнитивных функций и болезнь-модифицирующий эффекты.

2.7. Заключение

Анализ современного состояния исследований в области поиска новых эффективных путей лечения болезни Альцгеймера и других форм деменций позволяет заключить, что ведущими направлениями работ являются направленное создание препаратов, действующих на ключевые стадии патогенеза этих заболеваний [181-183].

Поскольку митохондрии являются одним из ключевых (и наиболее ранних) звеньев в развитии нейродегенеративных процессов в мозге [184, 185], и обеспечивают как функциональную активность, так и нейропластичность синапсов и нейронов, то поиск фармакологических агентов, способных нормализовать функционирование этой важнейшей биологической структуры для жизнеобеспечения нервной клетки в условиях развивающейся патологии рассматривается сейчас как крайне перспективный подход к созданию высокоэффективных нейропротекторных препаратов (Рисунок 7) [186-188].

Особый интерес при этом представляет возможность создания нового поколения мультитаргетных препаратов, которые могли бы сочетать в одной структуре способность нормализовать состояние митохондрий и усилить память и когнитивные функции за счет воздействия на рецепторные и ферментные системы, обеспечивающие передачу синаптического сигнала [189-191].

Результаты, полученные в последние годы в этих направлениях на уровне доклинических исследований, дают основание надеяться на положительное решение этих задач и принципиальную возможность создания нового поколения болезнь-модифицирующих агентов, способных не только компенсировать дефицит когнитивных функций, но и блокировать общее развитие нейродегенеративного процесса.

3. МЕТОДЫ.

3.1. Животные

Для опытов *in vitro* использовали самцов нелинейных беспородных белых крыс, массой 200-300 г в возрасте 3.5 – 4 месяца. Для *in vivo* экспериментов были использованы мыши линий CD1, C57Bl6j и трансгенные 5xFAD мыши, которые содержат обнаруживаемые при наследственных формах болезни Альцгеймера мутации: тройную мутацию в гене, кодирующем белок-предшественник, бета-амилоида, и двойную мутацию пресенилина (линия Tg (APP^{SwFlLon}, PSEN1*^{M146L}*^{L286V})6799Vas/J). Мышей использовали в возрасте 7-8 месяцев.

Мыши и крысы разводились в виварии Центра доклинических исследований ИФАВ РАН и от рождения на протяжении исследования содержались в группах 5-8 штук в клетке либо поодиночке в стандартных лабораторных условиях ($22 \pm 1^\circ\text{C}$, 55% влажности, при свободном доступе к воде и пище) при цикле освещения 12:12 часов (выключение света в 19:00).

Введение веществ мышам и забор биологического материала осуществляли с 8:30 до 9:30. Для забора биологического материала крыс наркотизировали CO₂ и декапитацию проводили с помощью гильотины (“OpenScience”, Москва). Поведенческое тестирование мышей проводили в отдельном от комнат содержания лабораторном помещении, в темноте, с 9:00 до 18:00. Для акклиматизации мышей приносили в экспериментальную комнату за час до начала экспериментов.

Все манипуляции с животными проводились в соответствии с решениями комиссии по Биоэтике ИФАВ РАН.

3.2. Исследования на изолированных митохондриях

3.2.1. *Выделение митохондрий*

3.2.1.1. Выделение митохондрий печени

Митохондрии из печени крыс выделяли по стандартной методике дифференциального центрифугирования с использованием буфера выделения следующего состава (210mM маннитол, 70mM сахароза, 5 mM Hepes, 0.5 mM ЭДТА, 0.52 mM ЭГТА, 1 мг/мл БСА, pH 7.4). Последнюю процедуру отмывки и окончательное суспендирование митохондрий проводили в буфере отмывания, состав которого аналогичен составу буфера выделения, но без ЭДТА и в присутствии 0.02mM ЭГТА. Определение белка в препарате митохондрий проводили биуретовым методом.

3.2.1.2. Выделение митохондрий из мозга крыс

Из полушарий головного мозга крыс методом дифференциального центрифугирования выделяли синапто-митохондриальную p2-фракцию и несинаптосомальные митохондрии. Все процедуры по выделению митохондрий проводили при температуре 0-4°C.

Крыс наркотизировали при помощи CO₂ и проводили декапитацию с помощью гильотины (“OpenScience”, Москва). Быстро на льду извлекали мозг, отделяли полушария, измельчали ножницами, промывали в буфере выделения (225 mM маннитол, 75 mM сахароза, 10 mM Hepes, 0.5 mM ЭДТА, 0.52 mM ЭГТА, 1 мг/мл БСА, pH 7.4), и гомогенизировали с помощью гомогенизатора Поттера с тефлоновым пестиком (900 об/мин) в десятикратном объеме буфера выделения.

Гомогенат центрифугировали при 1500g и 4°C в течение 10-15 минут. p2-Фракцию получали центрифугированием супернатанта при 10000-11000g и 4°C в течение 10-15 минут. Осадок p2-фракции ресуспендировали в

минимальном объеме буфера отмывания (225 мМ маннитол, 75 мМ сахароза, 10 мМ Hepes, 0.02 мМ ЭГТА, рН 7.4). Использовали в течение 4-6 часов с момента выделения. Для дальнейшего получения митохондрий синапсом и тел нейрональных клеток р2-фракцию ресуспендировали в 30% Перколле, разведенном в буфере выделения, до получения 13% суспензии Перколла.

Эту суспензию аккуратно наслаивали на предподготовленный градиент из 40% и 23% Перколла. Пробирки центрифугировали при 30000 - 31000g и 4°C в течение 15-20 минут. Отбирали несинапсомальную митохондриальную фракцию, расположенную на границе нижнего и среднего слоев Перколла, и ресуспендировали в буфере выделения в соотношении 1:4 (митохондриальная фракция:буфер). На границе верхнего и среднего слоев Перколла собирали синапсомальную фракцию, которую далее либо отмывали, либо с помощью детергента дигитонина (0.01%) разрушали синапсомы и далее также отмывали для получения синапсомальных митохондрий. Митохондриальные фракции отмывали от Перколла последовательным центрифугированием по 10 минут при 16000g и 7000g при 4°C. Осадки ресуспендировали в минимальном объеме буфера отмывания. Выход митохондрий составлял 5-12 мг на мозг. Митохондрии хранили в закрытых пластиковых пробирках типа эппендорф на льду и использовали в течение 3-4 часов с момента выделения

3.2.2. *Определение мембранного потенциала митохондрий*

Мембранный потенциал митохондрий измеряли по разнице светопоглощения при 554-524 нм, или по флуоресценции $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 485 \text{ нм}/590 \text{ нм}$ потенциал-зависимого индикатора сафранина О с использованием многофункциональных планшетных ридеров (Victor 3 или EnVision, Perkin Elmer, США).

Концентрация митохондрий составляла 0.2 мг/мл для несинапсомальных, синапсомальных митохондрий мозга или 0.5 мг/мл

для р-2 фракции мозга и митохондрий печени крыс. Сафранин (5 μ M) добавляли непосредственно перед началом измерения.

Субстраты ДЦМ добавляли либо до начала записи, либо через необходимое время с помощью инжектора планшетного ридера или многоканального дозатора. Использовали следующие субстраты дыхания митохондрий: субстраты комплекса 1 ДЦМ -5 mM глутамат калия и 2.5 mM малат калия, либо 5 mM пируват калия и 2.5 mM малат калия; субстрат комплекса 2 ДЦМ – 5 или 10 mM сукцинат калия в присутствии ингибитора комплекса 1 мкM ротенона, в ряде экспериментов использовали смесь субстратов комплексов 1 и 2 - 5 mM глутамат, 2.5 mM малат и 10 mM сукцинат калия. Через время (5-10 минут) добавляли тестируемые соединения и продолжали регистрацию флуоресценции или светопоглощения, затем добавляли кальций для индукции МП. В конце записи в некоторых случаях добавляли 1 мкM СССР для полной деполяризации митохондрий. Анализ полученных данных проводили с помощью программ Microsoft Excel и GraphPad.

В случае использования метода одновременной регистрации митохондриального потенциала и «набухания» митохондрий строили графики зависимости от времени как светопоглощения Сафранина О при 554-524 нм, так и значений светопоглощения при 554 нм.

3.2.3. Исследование влияния соединений на «набухание» митохондрий

Процесс «набухания» митохондрий, отражающий изменение формы митохондрий в результате открытия пМП, регистрировали спектрофотометрически в 96-луночных планшетах при 540, 554 или 620 нм на планшетных анализаторах Victor 3 или EnVision (Perkin Elmer, США) при 30°C. Действие соединений исследовали как на препаратах энергизованных митохондрий (в присутствии субстратов дыхательной цепи митохондрий), так и на препаратах деэнергизованных митохондрий (в условиях ингибирования работы дыхательной цепи митохондрий). Концентрация

митохондрий составляла 0.2 мг/мл для несинапсосомальных и синапсосомальных митохондрий мозга или 0.5 мг/мл для митохондрий печени крыс. В качестве индукторов пМП использовали растворы хлорида кальция, атрактилозида, $A\beta_{(25-35)}$ или $A\beta_{(1-42)}$. Максимальную скорость «набухания» оценивали как dA/dt для наиболее крутого участка кривой зависимости A от времени.

3.2.3.1. Регистрация «набухания» энергизованных митохондрий

Митохондрии с тестируемыми соединениями инкубировали в буфере следующего состава: 225 мМ маннитола, 75 мМ сахарозы, 10 мМ Hepes, 0.02 мМ ЭГТА, 1 мМ KH_2PO_4 , pH 7.4 в присутствии тех же вариантов субстратов ДЦМ, которые описаны выше. В контрольные пробы был добавлен равный объём растворителя (буфер или ДМСО). Концентрация ДМСО не превышала 1%. Через 5 минут после начала записи к суспензии митохондрий добавляли необходимое количество индуктора открытия пМП.

3.2.3.2. Регистрация «набухания» деэнергизованных митохондрий

Митохондрии с тестируемыми соединениями инкубировали в буфере следующего состава: 150 мМ KCl, 25 мМ Hepes, 10 мМ Tris, 0.5 μ М ротенон, 0.5 μ М антимицин А, 2 μ М A23187, pH 7.4. Остальное определение аналогично описанному ранее для определения влияния соединений на энергизированные митохондрии

3.2.4. *Регистрация захвата ионов кальция митохондриями и кальциевой ёмкости изолированных митохондрий*

Захват ионов кальция и кальциевую ёмкость митохондрий печени, р2-фракции мозга, синапсосомальных и несинапсосомальных митохондрий мозга крыс определяли либо спектрофотометрически с помощью индикатора кальция Арсеназо III, используя двухволновую методику регистрации светопоглощения при 654 и 685 нм. либо спектрофлуориметрически с использованием не проникающего кальциевого зонда – Calcium GreenTM-5N

(CaG5N) при $\lambda_{ex/em}=506/532$ нм. Измерения проводили на планшетных ридерах Victor 3 или EnVision (Perkin Elmer, США). Использовали различные способы добавок кальция к суспензии митохондрий: одиночная добавка, болюсное добавление кальция и добавление кальция в режиме «насоса».

100 нМ CaG5N добавляли к суспензии митохондрий непосредственно перед началом измерения. Митохондрии в тех же количествах, которые описаны ранее для определения митохондриального потенциала, инкубировали в буфере, содержащем 120 мМ KCl, 20 мМ HEPES, 100 мМ сахарозу, 0.2 мМ KH_2PO_4 , 0.45 мМ MgCl_2 , 0.15 мМ АДФ, 1 мг/мл олигомицин, pH 7.2, смеси субстратов ДЦМ и различные концентрации тестируемых соединений или равный объём растворителя.

Режим «насоса». Эксперимент проводили в 24-луночных планшетах с добавлением каждые 20 секунд по 5 мкл раствора хлорида кальция к суспензии митохондрий. Таким образом, скорость «насоса» или добавления ионов кальция составила 10 $\mu\text{M}/\text{мин}$ (или 150 нмоль $\text{Ca}^{2+}/\text{мг}$ белка митохондрий в минуту).

Одиночная или болюсная добавка ионов кальция. Эксперименты проводили в 96-луночных планшетах. В режиме болюсов CaCl_2 добавляли к суспензии митохондрий инъектором каждые 2 - 5 минут по 20 - 30 нмолей $\text{Ca}^{2+}/\text{мг}$ белка.

Кальциевую ёмкость определяли как количество ионов кальция, которое могут захватить митохондрии суспензии до начала открытия пМП, т.е. до начала массивного выброса ионов кальция из митохондрий и повышения флюоресценции комплекса с ионами кальция зонда CaG5N, локализованного вне митохондрий.

3.3. Оценка влияния соединений на активность ДЦМ

3.3.1. Респиометрия высокого разрешения

Влияние соединений на работу ДЦМ оценивали по скорости потребления кислорода изолированными митохондриями в суспензии с помощью кислородных электродов Кларка на оксиграфе Oxygraph-2k (“Oroboros corp.”, Австрия)

Для эксперимента с изолированными митохондриями печени или мозга крыс использовали протокол для последовательного измерения активностей комплексов ДЦМ.

К суспензии митохондрий добавляли субстраты - 5 мМ глутамат и 2 мМ малат (CI) или 5 μ М ротенон и 10 мМ сукцинат (CII); АТФ продуцирующее дыхание измеряли в присутствии 1 мМ АДФ; разобщенное дыхание оценивали в присутствии 0,05 μ М FCCP. Энергетические состояния митохондрий и дыхательный контроль определялись по методу Чанса [Chance, B., 1955]. Рассчитывали скорость дыхания митохондрий в следующих энергетических состояниях: V1 – базальное, V2 – субстрат-зависимое, V3 – фосфорилирующее, АТФ-производящее дыхание, в присутствии АДФ, V4 – дыхание после исчерпания добавленного ADP, а также дыхательный контроль (ДК) как отношение V3/V4.

3.3.2. Оценка поглощения кислорода с помощью биоэнергетического анализатора SeaHorse XFe96

Другой использованный метод для оценки митохондриального дыхания – с помощью кислородных флюоресцентных датчиков метаболического анализатора SeaHorse XFe96 (Agilent, США).

Потребление кислорода измеряли с помощью анализатора потока Seahorse XF96 на синапто-митохондриальной р2 фракции в присутствии субстратов комплекса I пирувата (5 мМ) и малата (2-5 мМ) или субстратов комплекса II сукцината (5-10 мМ) и ротенона (1 μ М). , в соответствии с протоколом, описанным в работе [192], но с использованием 96-луночного

планшета вместо 24-луночного. Дыхание р2 фракции (5 μ г/лунку) последовательно измеряли в сопряжённом состоянии с субстратом комплекса I или II (V2-базальное дыхание), далее после добавления АДФ через порт анализатора измеряли фосфорилирующее дыхание в присутствии АДФ и субстрата (состояние V3 по Чансу), нефосфорилирующее дыхание или дыхание в состоянии покоя, индуцированное добавлением олигомицина (состояние V4o), а затем максимальное дыхание, стимулированное разобщителем FCCP (Состояние V3u).

3.4. Антиоксидантный потенциал соединений

3.4.1. *Определение перекисного окисления липидов в митохондриях печени крыс*

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) в мембранах митохондрий оценивали по накоплению веществ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (диеновых диальдегидов, малонового диальдегида - МДА) спектрофотометрически при $\lambda=532$ нм [193].

3.4.2. *Определение ПОЛ в гомогенате мозга крыс*

Гомогенат мозг крыс получали гомогенизированием полушарий мозга крыс в 120 mM KCl/20mM Hepes на холоду и последующим выделением субклеточной фракции как супернатанта после центрифугирования при 2000g. Приготовленный гомогенат мозга использовали в эксперименте в этот же день либо замораживали при $-(18-24)^{\circ}\text{C}$.

ПОЛ в гомогенате мозга крыс также определяли по содержанию МДА. В качестве окислителей использовали ионы Fe^{2+} (FeCl_2), Fe^{3+} ($\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, FeCl_3), или тБГП и $\text{A}\beta_{(25-35)}$ или $\text{A}\beta_{(1-42)}$.

Регистрировали при длине волны 540 нм оптическую плотность на плащечном ридере Victor 3 или EnVision (PerkinElmer). В качестве контроля использовали гомогенат без добавления инициатора ПОЛ.

Эквивалент МДА рассчитывали, или используя коэффициент калибровки с 1,1,3,3-тетраэтоксипропаном, либо нормализуя показания между положительным контролем (в присутствии окислителя и растворителя) и отрицательным контролем (в присутствии только тестируемого соединения) к количеству белка в пробе.

3.4.3. *Определение влияния соединений на активность фермента липоксигеназы.*

Активность липоксигеназы измеряли спектрофотометрически. по содержанию продукта окисления линолевой кислоты – соответствующего гидропероксида (9- и 13-гидропероксиоктадекадиеновой кислоты) при $\lambda=234$ нм. 0.3мМ линолевой кислоты в боратном буфере (pH 9.0) инкубировали с различными концентрациями тестируемых соединений или равными объёмами растворителя. Реакцию запускали добавлением 500 единиц раствора фермента липоксигеназы 5 и в течении 10 минут при 25°C регистрировали A_{234} .

Степень ингибирования липоксигеназы (I, %) определяли по формуле:

$$I, \% = v_o (\text{раствор вещества}) / v_o (\text{ДМСО}) * 100\%$$

Значение начальной скорости (v_o) рассчитывали по формуле:

$$v_o = dC/dt = dI/(dt) * \epsilon$$

где C - концентрация продукта, t – время реакции, ϵ – коэффициент молярного поглощения.

Значения IC_{50} определяли с помощью программы GraphPad.

3.5.Верификация нейропротекторного эффекта соединений на клеточных моделях нейродегенерации

3.5.1. *Приготовление нейрональных первичных культур из мозга крыс*

У крысят вскрывали черепную коробку, извлекали мозжечок (у 7-9 дневных крысят), гиппокамп или кору мозга (2-4 дневные крысята), 2-3 раза промывали в бескальциевом и безмагниеовом растворе Хенкса (“Gibco”, США) с 0,04% NaHCO_3 (HBSS) при +4°C, измельчали и помещали на 15 мин в предварительно согретый до 37°C 0,05% раствор трипсина с 0,02% ЭДТА. После инкубации клетки осторожно двукратно отмывали от трипсина тёплым стандартным раствором Хенкса (“Gibco”, США) с феноловым красным, а затем культуральной средой MEM (Minimal Essential Medium, “Gibco”, США) с добавлением глюкозы, глутамина, NaHCO_3 , инсулина, 10% сыворотки инактивированной (MEM+FBS). Затем клетки диспергировали в свежей среде (MEM+FBS) до получения однородной суспензии, которую центрифугировали 1 мин при 3000 об/мин. Осаждённые клетки ресуспендировали в соответствующем объёме NBM (Neurobasal Medium, “Gibco”, США) с добавлением Supplement B-27 (“Gibco”, США), и 2 mM L-глутамин или GlutaMax (“Gibco”, США), антибиотиков пенициллина и стрептомицина (“Gibco”, США) и 20 mM KCl (“Sigma”) до количества нейронов – $3\text{-}5 \times 10^6$ клеток/мл. Затем переносили на планшеты или для микроскопических исследований на покрывные стёкла, покрытые поли-D-лизином (10 $\mu\text{g}/\text{мл}$) (“Sigma”) или полиэтиленимином (“Aldrich”). Через 1 час осторожно отсасывали среду, добавляли свежую культуральную среду NBM с вышеописанными добавками. Клетки оставались в течение 7-10 дней в инкубаторе (37°C, 95% воздуха + 5% CO_2 , относительная влажность 98%) в среде NBM. На 3-4 сутки культивирования в среду инкубации добавляли арабинозинмоноцитозид (5 μM) для предупреждения пролиферации

ненейрональных клеток. Для выращивания смешанной ко-культуры нейронов и глиии арабинозинмоноцитозид не добавляли.

Постановку экспериментов с моделями нейротоксичности проводили на 8-10 дни культивирования нейрональных культур.

3.5.2. *Дизайн моделей нейродегенерации*

3.5.2.1. Эксайтотоксичность.

Среду, в которой выращивались гранулярные нейроны мозжечка или нейроны коры мозга крыс, аккуратно удаляли и сохраняли в стерильной баночке. Нейроны промывали 2-3 раза буфером следующего состава: 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 10 мМ глицин, 2 мМ CaCl₂, 5 мМ глюкоза, 20 мМ HEPES, pH 7.4. Все эксперименты проводили при комнатной температуре. В этот буфер добавляли тестируемые соединения и 100 – 300 мМ глутамата. Клетки с буфером на час оставляли в ламинаре или в термостате при 37°C.

После инкубации с глутаматом (100-300мМ) клетки дважды промывали буфером с 2мМ MgCl₂, без глицина и возвращали ту же самую среду, в которой они выращивались.

Выживаемость нейронов оценивали через 24 часа после воздействия.

3.5.2.2. Fe³⁺ - вызванная токсичность

Для изучения влияния веществ на Fe³⁺-индуцированную токсичность первичную культуру нейронов коры мозга крыс инкубировали в течении 2 часов при 37°C с 0,1 мМ FeNH₄(SO₄)₂·12H₂O в новой клеточной среде. Затем клеточная среда заменялась (после двукратного промывания) на исходную с добавлением исследуемого вещества и через 24 часа после воздействия оценивали выживаемость клеток.

3.5.2.3. β-Амилоидная токсичность

Для изучения влияния веществ на βА -индуцированную токсичность к нейронам культуры коры мозга крыс добавляли исследуемое вещество и

преагрегированный 24 часа при комнатной температуре β A(25-35) или β A(1-42). Выживаемость нейронов оценивали через 24 часа.

3.5.2.4. Иономицин-вызванная токсичность (перенагрузка клеток кальцием)

Для изучения потенциального нейропротекторного эффекта соединений в условиях кальциевого стресса использовали ионофор кальция иономицин, вызывающий неконтролируемый вход ионов кальция в клетки. К гранулярным нейронам мозжечка, нейронам коры мозга крыс или клеткам нейробластомы SH-SY5Y добавляли исследуемое вещество и 1,5 - 4 μ M иономицина. Предварительно подбирали концентрацию иономицина, вызывающую гибель не более 30-50% нейронов. Выживаемость нейронов оценивали через 24 часа.

3.5.2.5. Оценка выживаемости клеточной культуры

МТТ-тест используется для анализа выживаемости различных клеток по способности дегидрогеназ восстанавливать неокрашенные формы 3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразола (МТТ-реактанта) до голубого кристаллического формазана.

МТТ-тест проводили по методике, описанной Niks M. И Otto M. [194] с небольшими модификациями. В каждую лунку планшета с первичной культурой клеток вносили по 20 мкл раствора МТТ (5 мг/мл) (Sigma-Aldrich) и инкубировали на протяжении 2 ч при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Осадок образовавшегося формазана растворяли в 200 мкл ДМСО и измеряли фотометрически на планшетном ридере Victor 3 или EnVision (PerkinElmer) по разнице светопоглощения пробы при длинах волн 570 – 620 нм.

3.5.3. Визуализация цитозольного и митохондриального кальция и митохондриального мембранного потенциала в нейронах.

Нагрузка клеток ко-культуры гиппокампа или коры мозга крыс флюоресцентными маркерами кальция в цитозоле (5 μ M Fura-FF AM или 5 μ M Fura-2 AM) или в митохондриях (Rhod-5N) проводилась в течение 30 минут при комнатной температуре с добавлением 0,005% плюроники F-127 (Invitrogen Molecular Probes) в HEPES-буферном солевом растворе (HBSS), состоящем из (mM): 156 NaCl, 3 KCl, 2MgSO₄, 1,25 KH₂PO₄, 2 CaCl₂, 10 глюкозы и 10 HEPES, pH= 7,35. Для одновременного измерения цитозольного кальция [Ca²⁺] и потенциала митохондриальной мембраны ($\Delta\psi$ m) в культуры добавляли 1 M Rh123 (Molecular Probes) через 15 минут после добавления маркеров кальция. Затем клетки промывали HBSS 3-5 раз перед экспериментом.

Получение изображений проводилось с помощью инвертированного эпифлюоресцентного микроскопа Olympus (Япония), оборудованного флюоритовым объективом 20x. Флюоресцентные маркеры возбуждались лучом от ксеноновой лампы, прошедшим через фильтры 340, 380 и 490nm Cairn Research, Kent, Великобритания), контролируемый компьютерной программой Andor IQ (Великобритания) с временными интервалами 5 или 10 с. Эмиссионные флюоресцентные изображения регистрировались с помощью CCD камеры (Retiga, QImaging, Surrey, BC, Канада) и обсчитывались при помощи программы Andor IQ. Сигналы нормализовали между уровнем покоя (0) и максимальным сигналом (100%) в ответ на добавление FCCP (1 μ M). Для измерений Rhod-5N конфокальной микроскопией на микроскопе Zeiss 710 CLSM с 40x масляным иммерсионным объективом, $\lambda_{ex/em}$ = 563/580-630 нм. Все представленные данные были получены как минимум из 5 покровных стекол и 2-3 различных клеточных препаратов

Все изображения обрабатывались с помощью программы с открытым исходным кодом для анализа и обработки изображений. ImageJ. Нейроны, астроциты и глиальные клетки при обработке различали морфологически.

Математическая обработка полученных флуоресцентных сигналов проводилась с помощью GraphPad Prism версии 5.01 для Windows (Сан-Диего, Калифорния, США)

3.6. Исследование *in vivo* эффектов соединений

3.6.1. *Определение просудорожной активности*

Сравнение судорожной активности секуринина и его триптаминового производного - алломаргаритарина

Работа выполнена на мышах C57Bl6j (самцы) (n=74). Мышам первой опытной группы (n=7) вводили секуринин внутрибрюшинно в дозе 20 мг/кг в ДМСО. Мышам второй опытной группы (n=7) вводили такую же дозу алломаргаритарина. Контрольным мышам вводили соответствующий объём ДМСО. Мышей помещали в прозрачные боксы для наблюдения. Оценивали наличие и тяжесть судорожного состояния мышей каждую минуту в течение 30 минут по пятибалльной шкале [195]:

0 баллов – нормальное поведение

1 балл – ненормальное поведение, затаивание

2 балла – подёргивания мышц головы и шеи

3 балла – вздрагивания всего тела, «встряхивания мокрой собаки»

4 балла – клонические судороги, поза «кенгуру»

5 баллов – тяжёлые тонико-клонические судороги с полной потерей позы.

3.6.2. *Литий-пилокарпиновая модель эпилептического статуса.*

Эпилептический статус может быть достигнут интраперитонеальным введением высоких доз пилокарпина, агониста M1 мускариновых рецепторов, обычно более 300 мг/кг. Предварительное введение хлорида лития за 24 часа до пилокарпина, потенцирует эпилептогенные свойства пилокарпина и позволяет снизить его дозировку в 5-10 раз.

Мышам вводили LiCl в дозе 3 мэкв/кг в физ. растворе внутрибрюшинно. Через 24 часа вводили пилокарпин в дозе 70 мг/кг (в физ. растворе) внутрибрюшинно [Jore, 1986].

За 15 минут до введения пилокарпина мышам опытной группы вводили внутрибрюшинно АМ в дозе 20 мг/кг в ДМСО (концентрация 10 мг/мл), а мышам контрольной группы – соответствующий объем ДМСО.

Оценивали тяжесть судорог по пятибалльной шкале каждую минуту в течение 2 часов. Через 2 часа блокировали судороги введением паральдегида внутрибрюшинно в дозе 0,6 мл/кг (в 10%-ном растворе). По результатам экспериментов строили графики зависимости средней тяжести судорог для каждой из групп от времени с момента введения пилокарпина.

3.6.3. *Оценка нейропротекторной и/или когнитивно-стимулирующей активности соединений на in vivo моделях амнезии и нейродегенерации.*

3.6.3.1. Общая схема экспериментов с соединениями, дозы и разведение

Соединения растворяли в диметилсульфоксиде и физиологическом растворе (соотношение ДМСО/NaCl = 1/20) или в физиологическом растворе и вводили внутрибрюшинно в объеме 0,1 мл раствора на 10 г массы тела. Скополамин растворяли в физиологическом растворе и вводили подкожно в объеме 0,05 мл на 10 г массы тела.

В модели скополамин-вызванной амнезии скополамин и исследуемое соединение вводили мышам в течение 5 дней, согласно схеме, представленной на Рисунок 9. На 3й день введения начинали обучение в тесте кондиционирования страха, на 5й день проводили последнее тестирование и забор образцов мозга для последующего биохимического анализа. Выбор протокола введения и используемых доз основан на пилотных экспериментах.

Учитывая, что экспериментатор представляет собой контекстуальный сигнал для животных, все эксперименты проводились одним человеком, который находился на одном месте в течение всего тестирования.

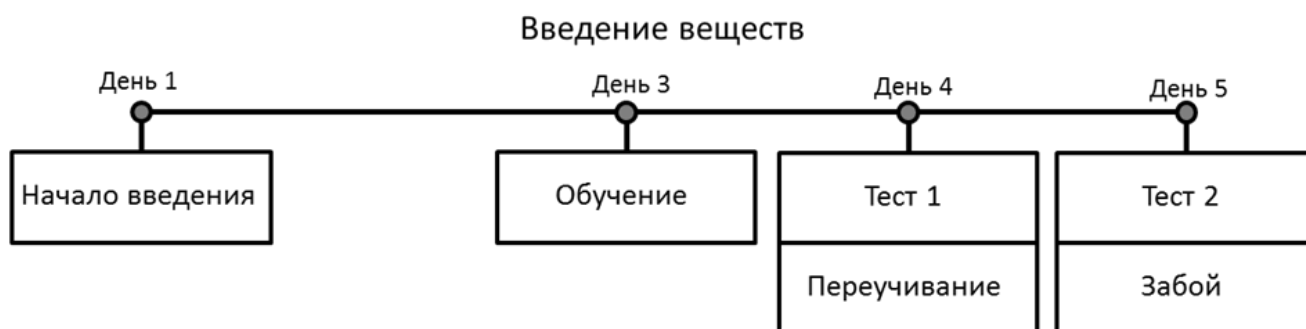


Рисунок 8 Общая схема введения веществ и проведения теста кондиционирования страха.

Для исключения ложноположительных или ложноотрицательных результатов проводили дополнительную оценку возможных эффектов соединений на двигательную, исследовательскую активность, тревожно- и депрессивно-подобное поведение мышей в тестах новая и темно-светлая клетки.

3.6.3.2. Тест кондиционирования страха

Тестирование проводили по ранее валидированному протоколу [196]. Экспериментальная установка аппаратно-программного комплекса «Шелтер» (ООО "НПК Открытая Наука", Россия) состояла из пластиковой коробки (высота - 44,5, ширина – 23,5, глубина – 24,5) и электрифицированного пола.

Интенсивность освещения установки составляла 25 Лкс. На 3й день введения исследуемого соединения проводили обучение мышей (**Ошибка! Источник ссылки не найден.**). Для этого мышь помещали в установку на 2 минуты, последние 2 секунды подавали электрический ток, после чего животное сразу возвращали в клетку домашнего содержания. После каждого животного электрифицированный пол протирали влажным полотенцем. Через 24 часа проводили оценку следа памяти об аверсивном, негативном, воздействии (Тест 1): мышь помещали на 3 мин в ту же установку, что и при обучении. Оценивали процент фризинга, т.е. времени, проведенного в неподвижном состоянии, ожидании удара током, что рассматривается как критерий успешного обучения. Сразу же следовала сессия переучивания – мышь оставляли в установке еще на 7 минут без подачи тока. Таким образом, для угашения памяти, переучивания, что обстановка больше не опасна – у мышей было 10 минут. Через 24 часа, на 5й день введения исследуемого соединения, проводили 3-минутное тестирование по вышеописанной схеме (Тест 2). Ожидаемое в норме снижение времени фризинга расценивалось как критерий удачного переучивания, т.е. угашения памяти. Сразу же после Теста 2 проводили эвтаназию мышей и извлечение мозга.

3.7. Оценка влияния соединений на агрегацию A β

3.7.1. *Регистрация фибриллизации A β с тиофлавином T*

Выбранный A β (A β ₍₁₋₄₀₎ или A β ₍₁₋₄₂₎) (Bachem, Switzerland) растворяют в ДМСО до концентрации 100 μ M. Обработывают ультразвуком с помощью дезинтегратора Bandelin Sonopuls Ultrasonic Homogenizer HD 2200 мощностью 150 Вт в течение 30 на льду в течении 1 минуты для предотвращения агрегации. Нерастворившиеся агрегаты отделяют центрифугированием при 100000g в течении 60 минут при 40°C на ультрацентрифуге Optima MAX XR (Beckman), ротор MLA-50. Аликвоты разливают в криопробирки (по 100 μ л) и помещают в морозильную камеру.

Непосредственно перед экспериментом 100 μM А β (100 % ДМСО) переводим в натрий-фосфатный буфер (PBS, состав: 10 мМ фосфатный буфер, 100 мМ NaCl, 0,5 мМ ЭДТА, pH 7,4) до концентрации 10 μM и снова центрифугируем при 100000g, 60 мин. при 40°C на ультрацентрифуге Optima MAX XR (Beckman), ротор MLA-50 для удаления нерастворившихся агрегатов.

Контрольные и опытные пробы, содержащие исследуемое вещество или растворитель, азид натрия и 10 μM А β , помещают в термостат ($t=37^\circ$). Негативный контроль представляет собой пробу, содержащую все компоненты за исключением, собственно, А β . Положительный контроль - проба с А β в присутствии только соответствующего объема растворителя тестируемого соединения. Через 5, 24, 48 и 72 часа инкубации отбираем по 200 $\mu\text{л}$ раствора для анализа образовавшихся агрегатов флуоресцентным методом, а также 10 $\mu\text{л}$ для подготовки образцов к электронномикроскопическому анализу структуры агрегатов методом негативного контрастирования.

В отобранные пробы для флуоресцентного анализа агрегатов добавляем бензотиазольный краситель тиофлавин Т ТфТ, специфически взаимодействующий с β -структурами агрегатов, до конечной концентрации 3 μM . Измерения флуоресценции проводится в 96-луночных планшетах на планшетном ридере Victor или EnVision (PerkinElmer) при $\lambda_{\text{ex/em}}=450/480\text{nm}$.

3.7.2. Электронная микроскопия А β

После проведения реакции агрегации А β 10 $\mu\text{л}$ суспензии фиксируют в течении 30 секунд в 10 $\mu\text{л}$ 0,5% глутарового альдегида. Затем фиксированные пробы с А β наносятся на медные сеточки (200-300 гексагональных ячеек), покрытые формваровой пленкой. Через 10-15 секунд капля суспензии с формваровой пленки осторожно убирается фильтровальной бумагой и на пленку наносится капля насыщенного раствора уранил ацетата. Через 30

секунд она убирается так же фильтровальной бумагой. Сеточка с образцом высушивается, на сеточку напыляется углерод и далее она используется для электронно-микроскопического исследования. Электронная микроскопия проводилась на электронном микроскопе Carl Zeiss Libra 120 (Carl Zeiss Meditec AG, Йёна, Германия).

3.8. Оценка влияния соединений на активность КГС-3β

Изучение влияния соединений на активность КГС-3β оценивалось с помощью системы ферментов: киназы АДФ-Гло + КГС-3β (Promega, США) в соответствии с инструкциями производителя (<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/киназа-энзим-appnotes/gsk3b-kinase-assay-protocol.pdf?la=en>). Люминесценцию измеряли с помощью планшетного ридера Envision (PerkinElmerWallac). Относительные единицы люминесценции прямо пропорциональны количеству АТФ, используемого во время киназной реакции. Данные нормализованы между контрольной пробой, содержащей только растворитель, и пробой отрицательного контроля без КГС-3β.

3.9. Расчёт результатов, достоверность и статистический анализ

Все данные получены как минимум в трёх повторях в рамках одного эксперимента и на трёх разных препаратах митохондрий. Представленные рисунки отражают типичные результаты эксперимента с повторяемостью на минимум трёх препаратах митохондрий. Данные в графиках и диаграммах представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. В экспериментах *in vitro* построение графиков, определение величин максимальной скорости, IC_{50} , анализ статистических характеристик проводился с помощью программы GraphPad Prism версии 5.01 для Windows (Сан-Диего, Калифорния, США). Из статистической обработки могли быть удалены данные, которые хотя бы в одном из тестирований отличались от среднего по группе плюс более, чем на два стандартных отклонения или по Q-критерию удаления выбросов. Нормальность распределения выборки определяли с

помощью теста Д'Агостино-Пирсона. При количестве данных в группе менее 7 использовали непараметрические методы анализа. Для сравнения двух групп данных использовали непараметрический тест Манна-Уитни. Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA или непараметрический критерий Краскела-Уолисса использовали для сравнения трех и более групп. Уровень достоверности был установлен на 95% ($p < 0,05$).

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Разработка стратегии использования митохондрий при скрининге цитопротекторных или цитотоксичных препаратов.

4.1.1. *Митохондрии как мишень для поиска цитопротекторных и цитотоксичных препаратов соединений.*

Митохондрии традиционно считаются прежде всего производителями основных единиц клеточной энергии, однако помимо продукции АТФ, именно в митохондриях реализуется синтез значительного числа предшественников макромолекул, таких как липиды, белки и ДНК. Митохондрии одновременно и генерируют, и участвуют в нейтрализации потенциально вредных побочных продуктов метаболизма, таких как аммиак и активные формы кислорода, поддерживают ионный гомеостаз и играют активную роль в интеграции ряда сигнальных путей.

Также важно, что именно митохондрии определяют необратимость и играют ключевую роль в клеточной гибели. Центральную роль при этом играет так называемый процесс скачка митохондриальной проницаемости, обусловленный формированием специфических мембранных пор, и высвобождением из митохондрий ряда проапоптотических факторов. Очевидно, что снижение или увеличение устойчивости митохондрий к индукции скачка митохондриальной проницаемости может обусловить, соответственно, цитотоксический или цитопротекторный эффект.

Это определяет значительный интерес к митохондриям как мишени при поиске лекарственных препаратов. Как было описано в литературном обзоре, тестирование новых соединений по их влиянию на функции митохондрий активно используется как потенциальный *in vitro* тест на токсичность, при поиске препаратов для лечения как гиперпролиферативных, так и дегенеративных заболеваний. Последнее наиболее перспективно для

возбудимых тканей и, в частности, при поиске нейропротекторных препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний.

4.1.2. Методология формирования системы скрининга потенциальных нейропротекторов, мишенью действия которых являются митохондрии.

Прежде всего, нам было необходимо определить необходимые и достаточные методы для эффективного поиска соединений, способных предотвратить развитие нейродегенеративного процесса благодаря влиянию на зависимые от митохондрий процессы.

Последствием открытия пор МП является выброс проапоптотических факторов из митохондрий и связанный с этим запуск процессов клеточной гибели. Важнейшим из этих факторов является цитохром С. Высвобождение цитохрома С в цитозоль и связывание с активирующим протеазы апоптоза фактором 1 (Araf-1) приводит к образованию апоптосомы, протеолитическому расщеплению прокаспазы-9 до активной формы, известной как инициатор апоптоза, и дальнейшему развитию цепи апоптотических событий. Поэтому измерение кальций-зависимого высвобождения цитохрома С из митохондрий является одним из эффективным методом поиска нейропротекторных соединений. Различные существующие методы определения цитохрома С, такие как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), вестерн-блоттинг, высокоэффективная жидкостная хроматография, спектрофотометрия и проточная цитометрия, имеют значительные недостатки в плане использования их для скрининговых исследований. В частности, вестерн-блоттинг, ELISA являются длительными процедурами, дорогостоящими и часто достаточно сложными для интерпретации результатов. Используются спектрофотометрические методы - измерения Υ пика Сорета при 414 нм или дифференциального поглощения при 530 нм и 550 для количественного определения высвобождения цитохрома С из изолированных митохондрий. Главный недостаток этих

методов - низкая чувствительность. Коллективом авторов [197] с нашим участием, была проведена работа по исследованию потенциальной эффективности применения термолинзовой спектроскопии как лазерного метода молекулярной абсорбционной спектроскопии, способного обеспечить значительную чувствительность определения высвобождения цитохрома С из митохондрий. Было показано, что этот метод позволяет увеличить чувствительность определения цитохрома С более чем на два порядка, позволяя определить 3×10^{-7} мол/Л (4 мг/Л) цитохрома С и может (при условии создания новых высокопроизводительных приборов) обеспечить скрининговый метод для определения выброса цитохрома С из митохондрий. В то же время, высвобождение цитохрома С из митохондрий не всегда связано с индукцией процесса МП, а запуск процессов гибели клеток может быть связан и с высвобождением из митохондрий ряда других проапоптотических факторов – апоптоз-индуцирующего фактора (AIF), фактора SMAC/DIABLO, и эндонуклеазы G. Поэтому только определение высвобождения цитохрома С из митохондрий кажется недостаточным для поиска соединений с нейропротекторным потенциалом.

В то же время, именно процесс МП является ключевым этапом каскадов клеточной гибели и этот процесс тесно связан с крайне важной для реализации функциональной активности нейрона функцией митохондрий как кальций-буферной клеточной системы. Поэтому важнейшей задачей для нас было создание методологии и методов для проведения скрининговых исследований по поиску соединений, способных увеличить устойчивость митохондрий к индукции открытия пор МП.

Первоначальное решение, которое было закреплено в патенте [198], заключалось в одновременном измерении митохондриального потенциала и процесса изменения формы митохондрий – «набухания» в присутствии потенциал-зависимого красителя сафранина О. Проводили измерение светопоглощения при двух длинах волн – 554 и 524 нм, при этом значения A_{554} характеризовали «набухание» митохондрий, а значения $A_{(554-524)}$ -

мембранный потенциал митохондрий. Это в значительной степени повышало производительность с одновременным удешевлением способа определения влияния соединений на процесс МП и потенциальную митохондриальную токсичность этих же соединений. Для соединений, представлявших интерес по данным первичного скрининга проводились дальнейшие спектрофотометрические исследования как по влиянию на кальций-индуцированное «набухание» митохондрий в отсутствие добавления красителя, так и на другие их характеристики, такие как выброс цитохрома C, определение захвата кальция и кальциевой ёмкости митохондрий, продукция свободных радикалов, перекисное окисление липидов (ПОЛ), оценка работы ДЦМ. Добавление исследуемого соединения к митохондриям, энергизованным субстратами дыхательной цепи позволяет выявить его потенциальную митохондриальную токсичность как эффект деполяризации, а влияние на кальций-вызванную деполяризацию и одновременно на «набухание» митохондрий позволяет оценить влияние на открытие пор МП.

Измерение светопоглощения суспензии изолированных митохондрий используется как оценка кальций-вызванного открытия пМП, сопровождающегося «набуханием» митохондрий. По скорости падения светопоглощения мы определяем скорость суммарного изменения формы всеми митохондриями суспензии. Каждая митохондрия при увеличении внешнего кальция захватывает его и выбрасывает, как благодаря работе NCLX, так и в результате открытия пМП в обратимом низкопроводимом состоянии. Однако в дальнейшем или при определённых условиях равновесие этих процессов нарушается, и пора переходит в необратимое высокопроводимое состояние, что и сопровождается «набуханием» митохондрии, деполяризацией и нарушением целостности мембран митохондрии. Данные электронной микроскопии показывают, что даже при максимальном падении светопропускания в суспензии митохондрий находятся как интактные, так и набухшие митохондрии. Таким образом, отдельные митохондрии вследствие диффузии внешнего раствора вовнутрь

митохондрии могут подвергаться «набуханию» в разное время после добавления индукторов МП [199]. Поэтому в значительной степени скорость падения светопропускания (даже при одинаковом латентном периоде) является не только характеристикой чувствительности митохондрий к индукторам МП, но зависит и от однородности суспензии митохондрий. Изолированные методом дифференциального центрифугирования митохондрии мозга (Р2-фракция) содержат митохондрии нейронов и глии, митохондрии из разных отделов мозга, митохондрии из функционально различающихся районов нейрона, в том числе и синапсомы с митохондриями. В то же время, основные качественные характеристики (условия индукции и фармакологический профиль) МП мозга не отличаются от характеристик митохондрий печени. Открытие поры МП является достаточно универсальной функциональной характеристикой митохондрий. В то же время функциональная количественная гетерогенность митохондрий в отношении величины мембранного потенциала, содержания кальция показаны и внутри индивидуальных клеток, что особенно характерно для нейронов. Количественные характеристики (эффективные концентрации индукторов и ингибиторов, относительная чувствительность к различным индукторам и ингибиторам) различаются и для митохондрий, выделенных из различных тканей и органов. Кроме того, измерение мембранного потенциала и "набухания" изолированных митохондрий мозга, как Р2 фракции, так и митохондрий сомы нервных клеток и митохондрий синапсомальных, сопряжено с целым рядом методических трудностей. Прежде всего, это гораздо более низкий выход митохондрий и гораздо менее щадящие методы выделения. Так, индукция кальций-вызванного «набухания» в суспензии любого типа препаратов митохондрий мозга вызывает существенно меньшее падение светопоглощения, чем наблюдаемое для митохондрий печени при индукции МП в аналогичных условиях [200]. Как показывают данные электронной микроскопии, это связано с большей гетерогенностью митохондрий мозга, часть которых не подвергается МП в

обычных условиях. Митохондрии печени являются наиболее однородным митохондриальным препаратом со значительно большим выходом при выделении и большей степенью набухания (до 60% от максимально возможного при использовании аламетицина в отличие от 30% для митохондрий мозга крыс в наших условиях), что обусловило их выбор для проведения именно первичного скрининга в ряду новых соединений. В дальнейшем, для всех отобранных соединений-хитов проводились исследования на изолированных Р2-фракциях и/или на разделённых в градиенте Перколла фракциях синапсоматальных и несинапсоматальных митохондрий мозга.

На Рисунок 9А и 9Б представлены результаты исследования влияния Димебона на кальций-индуцированное "набухание" изолированных митохондрий мозга и печени.

Видно, что для митохондрий мозга наблюдается рост максимальной скорости «набухания» до концентрации внешнего кальция 50 μM , в то время как для митохондрий печени уже при концентрации внешнего кальция 20 μM скорость «набухания» достигает максимальных значений. Нужно отметить, что максимальное падение светопоглощения для митохондрий мозга достигается приблизительно за 2 минуты и оно значительно меньше, чем для митохондрий печени. В данном случае также видно, что если для митохондрий печени наблюдается почти полное подавление кальций-индуцированного "набухания" митохондрий, то митохондрии мозга хотя и отвечают на меньшие концентрации ингибитора, но полное ингибирование "набухания" митохондрий Димебоном не достигается. Как уже отмечалось, митохондрии мозга в целом менее чувствительны к ингибиторам МП по сравнению с митохондриями, изолированными из печени крыс. Кроме того, митохондрии мозга содержат как митохондрии нейронов, так и митохондрии глиальных клеток. Тем не менее, в случае Димебона, как и для многочисленных публикаций с подобным сравнением, различия носят в основном количественный характер, не влияя на направленность действия

препаратов. Как видно из Димебон не влияет на «набухание» де-энергизованных митохондрий мозга (В) и печени (Г) крыс, вызванное 200 μM кальция, но подавляет активацию МП в условиях энергетически активных митохондрий и печени и мозга (Рисунок 9 А,Б)

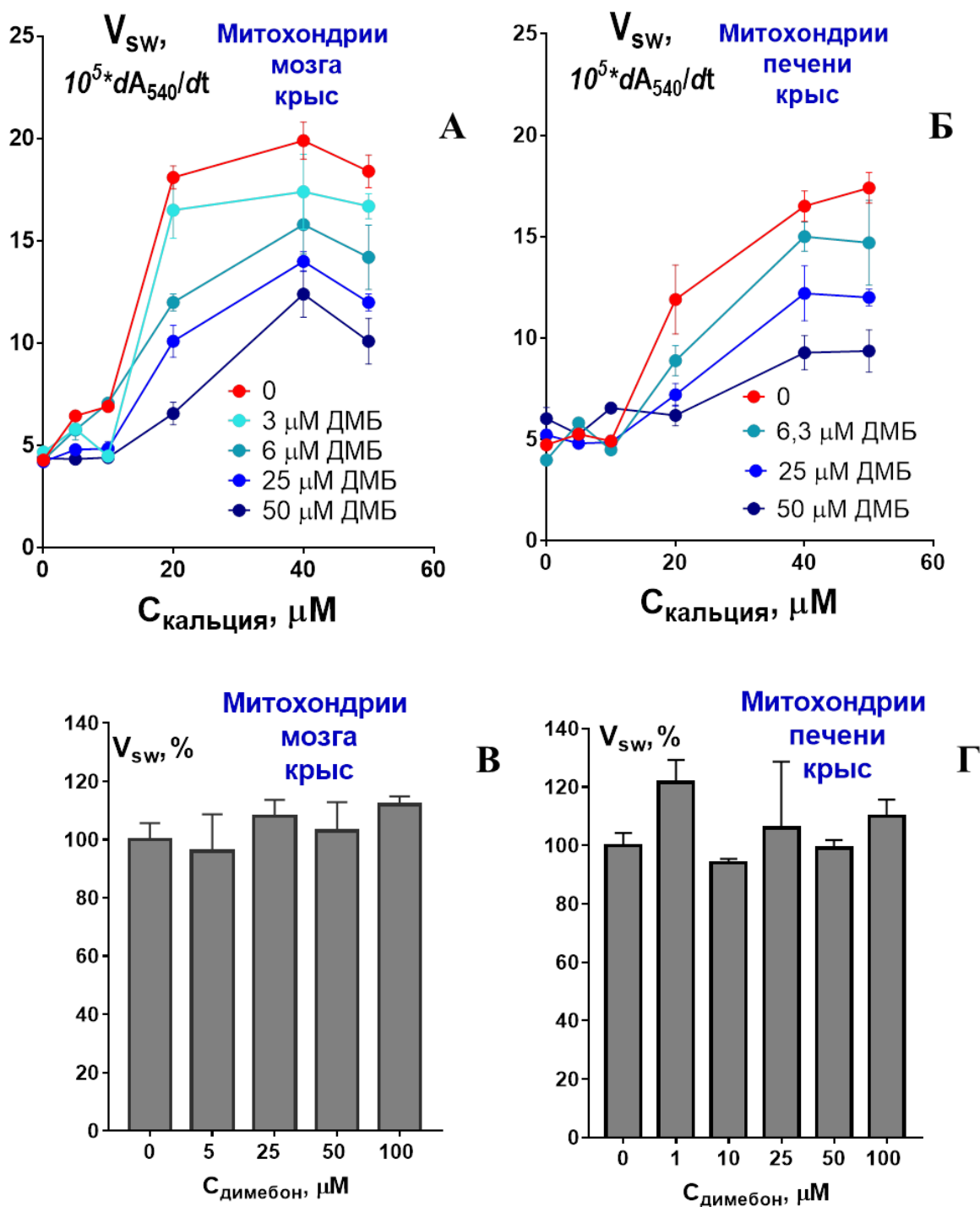


Рисунок 9 Влияние Димебона на «набухание» энергизованных субстратом комплекса II ДЦМ сукцинатом (10мМ) в присутствии ингибитора комплекса I ДЦМ ротенона (1 μM) митохондрий мозга (А) и

печени (Б) крыс, вызванное разными концентрациями кальция и де-энергизованных добавлением ингибиторов комплекса I и III ДЦМ ротенона (5 μM) и антимицина А (0.5 μM), в присутствии ионофора кальция А23187 (2 μM) митохондрий мозга (В) и печени (Г) крыс, вызванное добавлением 0,2мМ кальция.

Более того, для концентрации кальция 20 μM , вызывающей субмаксимальный уровень активации МП IC_{50} Димебона как ингибитора МП не отличается для митохондрий печени или мозга ($11,4 \pm 3,5$ и $9,2 \pm 9,1$, соответственно).

Учитывая вышесказанное, а также относительную однородность, лёгкость получения и возможность изолирования большего количества митохондрий от одного животного мы выбрали именно митохондрии печени как тест-систему для первичного скрининга мито-активных соединений.

Для того, чтобы ограничить влияние факторов, связанных с работой дыхательной цепи, митохондриального потенциала, механизмов захвата и выброса кальция и учитывая сложность вопроса о непосредственных компонентах поры МП, применяют исследование влияния потенциальных ингибиторов МП на де-энергизованные митохондрии. Эксперимент проводится в присутствии ингибиторов комплекса I, комплекса III и ионофора кальция (для обеспечения свободного входа кальция в митохондрии). Состав среды инкубации для де-энергизованных митохондрий: 225 мМ маннитол, 75 мМ сахароза, 10 мМ Hepes, 20 μM ЭГТА, 0.5 μM ротенона, 0.5 μM антимицина А, 0.5 μM А23187, 1мМ KH_2PO_4 рН 7.4. Широко известный и считающийся специфическим ингибитором поры МП циклический полипептид продуцирующийся почвенными грибами вида *Beauveria nivea* - циклоспорин А (ЦсА) - ингибирует кальций-индуцируемое открытие поры МП как в условиях энергизации, так и в деэнергизованном состоянии. Но в то же время, деэнергизованное состояние является искусственным и не отражает реальные условия в клетке. А

принимая во внимание данные о возможной вовлечённости как субъединиц комплекса 1, так и АТФ-синтазы в процесс формирования поры, этот подход значительно ограничивает круг потенциальных выявляемых соединений, способных оказывать искомый эффект на МПТ.

Очевидным примером может явиться Димебон. Как было показано выше, он эффективно подавляет кальций-вызванное «набухание» митохондрий и печени, и мозга в условиях энергизованных митохондрий. Но исследование влияния Димебона на процесс МП в условиях деэнергизации показало отсутствие эффекта подавления МП (Рисунок 9В, Г).

В отличие от ЦсА, подавляющего открытие пор МП как в условиях энергизации, так и в де-энергизованных митохондриях, димебон не только не снижает скорость набухания де-энергизованных митохондрий, вызванное добавлением 200 μM кальция, но наоборот, способствует ее незначительному увеличению как для митохондрий мозга, так и для митохондрий печени. Не оказывают влияние на набухание деэнергизованных митохондрий также и два других соединения, описанных ниже и проявивших свойства ингибиторов МП в энергизованных митохондриях и нейропротекторов на клеточных моделях нейродегенерации – алломаргаритарин (АМ) и производное тиадиазола IP-9311.

Таким образом, Димебон снижает восприимчивость митохондрий к кальций-индуцированному открытию пМП независимо от типа используемых субстратов дыхания, но не ингибирует МП де-энергизованных митохондрий мозга. Подпороговые концентрации АДФ усиливают эффективность димебона как блокатора пор МП [130]. Учитывая, что одним из компонентов пор МП может быть переносчик адениновых нуклеотидов (ANT), мы проанализировали влияние Димебона на конформационные перестройки ANT и открытие пМП, вызванное лигандами ANT. Атрактилозид в низкой концентрации усиливает Ca^{2+} -вызванное открытие пМП, связываясь с ANT и вызывая его конформационное изменение – переход в ц-конформацию и стабилизируя в этой конформации. Димебон

полностью устранил потенцирующее действие низких концентраций атрактилоида (0,005 мМ) на Са-индуцированное набухание митохондрий. «Набухание» митохондрий, вызванное более высокими концентрациями атрактилозида (0,2 мМ) связано как со стабилизацией ANT в с-конформации, так может быть связано и с другими, неспецифическими механизмами. В этом случае Димебон не подавлял набухание митохондрий, вызванное атрактилозидом [135]. Можно предположить, что Димебон снижает восприимчивость митохондрий к ионам Ca^{2+} и его эффект не связан с непосредственным влиянием на ANT как потенциальный структурный элемент пМП.

Необходимым фактором для открытия поры МП является не только увеличение концентрации свободного кальция в матриксе митохондрий, но и наличие неорганического фосфата в среде инкубации. Было проведено изучение необходимой (оптимальной) концентрации фосфата для индукции МП как в деэнергизованном состоянии, так и для энергизованных митохондрий (в присутствии субстрата комплекса II сукцината (5мМ) и ингибитора комплекса I ротенона (1 μM)). Показано, что в условиях деэнергизации скорость набухания митохондрий достоверно не отличается при разных концентрациях фосфата в среде, включая и его полное отсутствие. Для энергизованных митохондрий наблюдается достоверная концентрационно-зависимая потенциация набухания митохондрий. Для методики скрининга была выбрана концентрация фосфата 1мМ, как вызывающая субмаксимальный уровень потенциации. Таким образом, для первичного скрининга были выбраны условия с поддержкой работы ДЦМ (в присутствии субстратов дыхательной цепи) и в присутствии 1мМ фосфат-ионов.

Помимо непосредственного подавления формирования поры МП, благодаря взаимодействию соединений и компонентов поры, можно предположить и другие – косвенные пути предотвращения открытия пМП:

ингибирование захвата ионов кальция митохондриями; использование деполяризующих (в том числе разобщающих окислительное фосфорилирование) агентов, что в конечном счёте также приводит к предотвращению входа кальция в митохондрии. Дополнительные исследования необходимы для определения механизмов влияния соединений на функциональные характеристики митохондрий: ингибирование или разобщение дыхательной цепи митохондрий, влияние на кальциевый гомеостаз митохондрий и их кальциевую ёмкость, возможную вовлечённость различных митохондриальных белков, предположительно участвующих в формировании поры МП.

Нужно учитывать, что полная или значительная блокада открытия пор МП может иметь отрицательные последствия для нормального функционирования нервных клеток. Не только способность митохондрий мозга регулировать цитозольную концентрацию кальция, но и кальций-индуцированный феномен МП в митохондриях мозга играют значительную роль в процессах синаптической активации, долговременной потенциации и, следовательно, в процессах формирования памяти [201].

Поэтому обязательным этапом исследования соединений-хитов, не влияющих на потенциал митохондрий, но подавляющих кальций-индуцированную деполяризацию и набухание митохондрий, была оценка их влияния на захват кальция митохондриями и кальциевую ёмкость митохондрий.

Для измерения способности митохондрий захватывать и удерживать кальций используют кальций-связывающие индикаторы, не проникающие в митохондрии.

Таким образом, увеличение светопоглощения или флуоресценции пробы связано с появлением в среде ионов кальция, т.е. в случае среды с митохондриями - с неспособностью митохондрий удерживать кальций внутри. В нашей работе такими индикаторами являлись арсеназо и флуоресцентный зонд Ca GreenTM 5N (CaG5N).

При оценке захвата ионов кальция митохондриями и их кальциевой ёмкости могут быть использованы различные способы добавления кальция в среду с митохондриями: режим единичного болюса (Рисунок 10), режим "насоса" (Рисунок 11А), ограниченного числа болюсов с последующим выбросом кальция (Рисунок 11Б) и режим болюсов (Рисунок 11В).

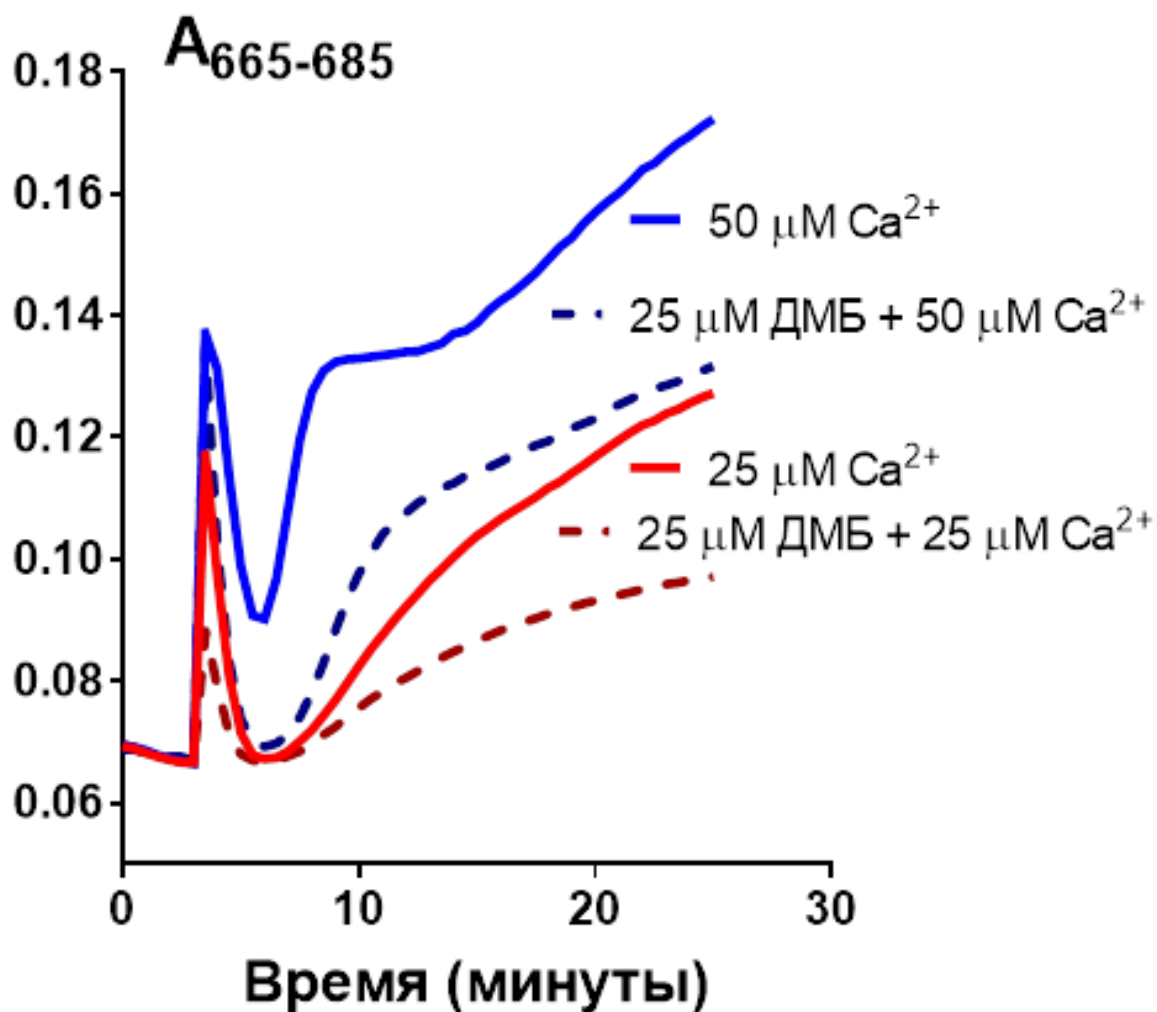


Рисунок 10 Действие димебона (ДМБ) на захват и выброс кальция митохондриями мозга крыс в присутствии 5мМ пирувата/малата

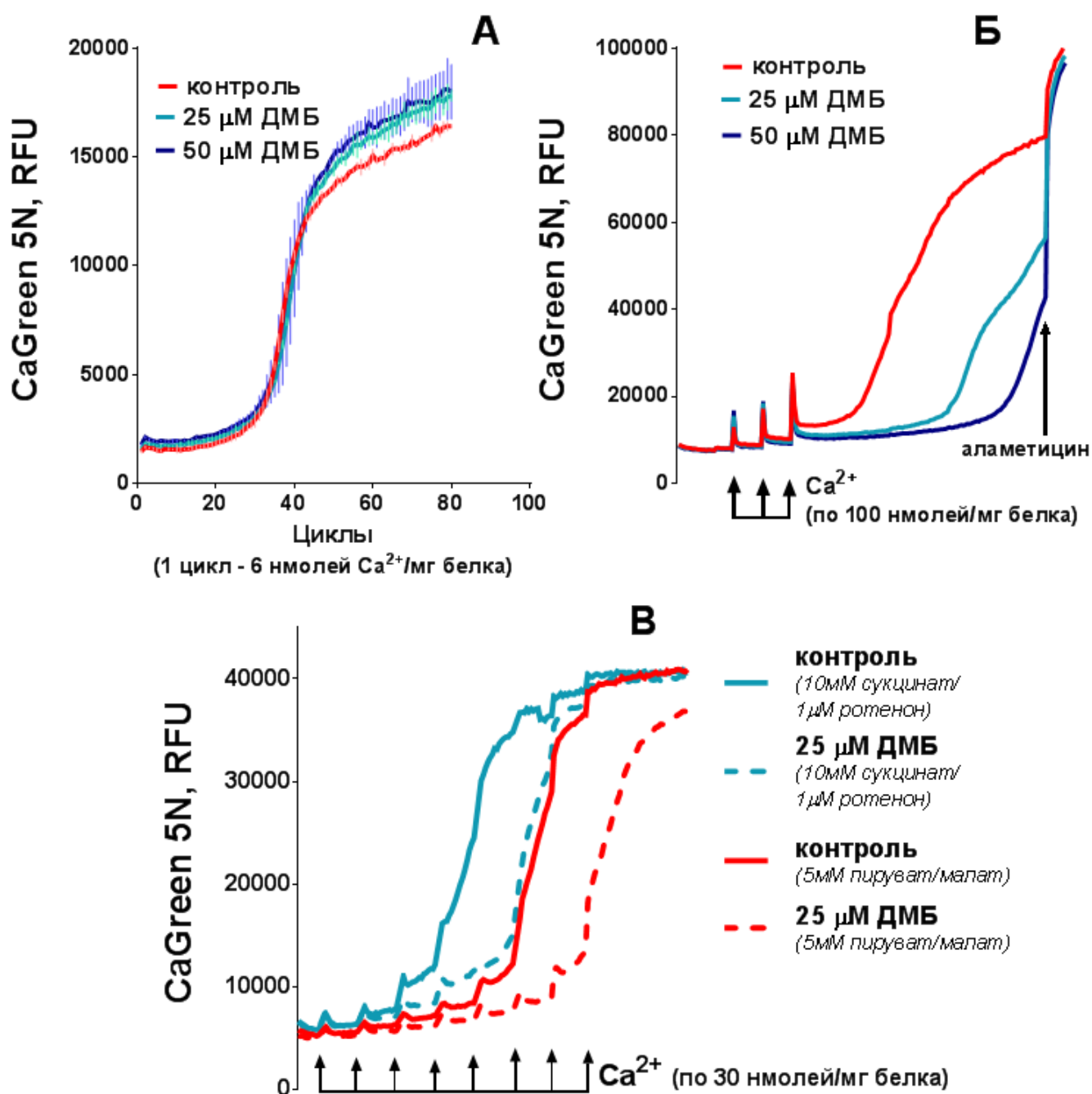


Рисунок 11 Действие димебона (ДМБ) на кальцевую емкость митохондрий мозга крыс при различных способах добавок кальция в присутствии 5мМ пирувата/малата: А - в режиме насоса; Б – в режиме единичных добавок; В – в режиме добавок (также в присутствии 10мМ сукцината)

Способность изолированных митохондрий мозга и печени крыс накапливать ионы Ca^{2+} зависит от режима добавления кальция [202]. Единовременное добавление кальция к суспензии митохондрий требует значительно меньшей концентрации для индукции открытия пор МП, чем при дробном добавлении (болюсном) кальция. «Режим насоса», т.е. равномерное добавление кальция либо с использованием перистальтического насоса, либо максимально частое добавление мелких порций кальция увеличивает общее количество кальция, которое способна поглотить суспензия митохондрий до индукции открытия пМП ещё больше. В «режиме насоса» сначала наблюдается кратковременное небольшое увеличение концентрации цитозольного кальция до момента активации кальциевого унипорта, через который митохондрии начинают захватывать кальций со скоростью, близкой к скорости поступления кальция в среду. В режиме «насоса» митохондрии непрерывно накапливают Ca^{2+} , с постоянным образованием кальций-фосфатных комплексов в матриксе. В режиме «болюсов» изменение концентрации свободного кальция, митохондриального потенциала, транспорта фосфата происходит быстрее и образование кальций-фосфатных комплексов может быть замедлено, что обуславливает повышение концентрации свободного митохондриального кальция и, соответственно, снижение кальциевой ёмкости митохондрий.

Режим «болюсов» может соответствовать физиологической ситуации, когда митохондрии мозга быстро нагружаются кальцием в ответ на резкое увеличение концентрации свободного кальция в цитоплазме, например при повторяющихся сигналах потенциал- или нейротрансмиттер-активируемых кальциевых каналов. В то же время, режим «насоса» скорее соответствует ситуации, когда митохондрии медленно накапливают кальций в ответ на постепенное некомпенсированное увеличение свободной цитозольной концентрации катиона, т.е. в ситуации системного нарушения механизмов клеточной регуляции кальциевого гомеостаза. В связи с этим, при поиске нейропротекторов для оценки кальциевой ёмкости митохондрий нам кажется

более полезным использование именно режима «болюсов» как наиболее соответствующего условиям повышения устойчивости митохондрий к индукторам МП в условиях нормального функционирования нейрона.

Оценку наиболее соответствующего нашим задачам способа измерения кальциевой ёмкости митохондрий проводили также с помощью нейропротектора Димебона, влияние которого как на открытие пор МП, так и на защиту митохондрий в условиях нейротоксического нарушения их функций достаточно убедительно показано как в наших работах, так и в работах коллег.

Димебон по сравнению с контролем не оказывает существенного влияния на кальциевую ёмкость в «режиме насоса» (Рисунок 11А), что согласуется и с данными Нага с соавторами [203]. В то же время, Димебон увеличивал время до начала выброса кальция и снижал скорость выброса кальция митохондриями после предварительного захвата в режиме единичной (Рисунок 10) или трёх добавок кальция (Рисунок 11Б) и также увеличивал кальциевую ёмкость митохондрий при использовании «режима болюсов» (Рисунок 11В) для добавления кальция к суспензии митохондрий. На несинапсомальных митохондриях мозга крыс и на митохондриях печени крыс были получены качественно одинаковые результаты.

Эти данные дали нам дополнительную уверенность в том, что при оценке кальциевой ёмкости митохондрий необходимо использовать именно «режим болюсов» как наиболее соответствующий целям повышения устойчивости митохондрий к индукторам МП в условиях нормального функционирования нейрона.

Учитывая вышесказанное, наиболее перспективным направлением поиска нейропротекторов является поиск веществ, увеличивающих устойчивость митохондрий к индукторам МП в условиях нормального функционирования нейрона, в том числе при нормальном функционировании

дыхательной цепи митохондрий и не блокирующих в целом процессы активного транспорта кальция в митохондриях [204].

Основные этапы первичных этапов такого поиска включает анализ влияния на митохондриальный потенциал и кальций-индуцированное «набухание митохондрий, исследование влияния новых соединений на захват кальция митохондриями и их кальциевую ёмкость. Используя этот подход нами было проведено исследование множества новых соединений различных структурных классов. Соединения, способные индуцировать открытие пор пМП могут рассматриваться как потенциальные цитотоксические препараты, в том числе и предлагаться для дальнейшей разработки как противораковые препараты [205]. Но основным направлением работы является поиск соединений, обладающих нейропротекторным потенциалом благодаря увеличению устойчивости митохондрий к индукции открытия пМП, как благодаря подавлению именно формирования этой поры и увеличению кальциевой ёмкости митохондрий, так и благодаря снижению захвата кальция митохондриями либо в результате временной деполяризации митохондрий, либо в результате ингибирования специфических кальций-транспортных систем.

Так, для эфирных производных докозагексаеновой кислоты - докозагексаеноилэтиленгликоля и его нитроаналога - докозагексаеноилнитроэтиленгликоля, а также докозагексаеноилдофамина, являющегося аналогом природного нейроактивного липида лиганда ванилоидного и каннабиноидного рецепторов – арахидоноилдофамина, была показана способность предотвращать захват кальция митохондриями и, соответственно, снижать кальций-индуцированное «набухание» митохондрий, что связано с вызываемой этими производными деполяризацией митохондрий. Влияние на мембранный потенциал митохондрий и кальций-индуцированное открытие пМП зависит от структуры исследуемых соединений и, очевидно, реализуется разными механизмами [206].

Достаточно интересные и требующие дальнейшего развития результаты были получены и для производных 5-(гидроксиамино)изоксазолов [207].

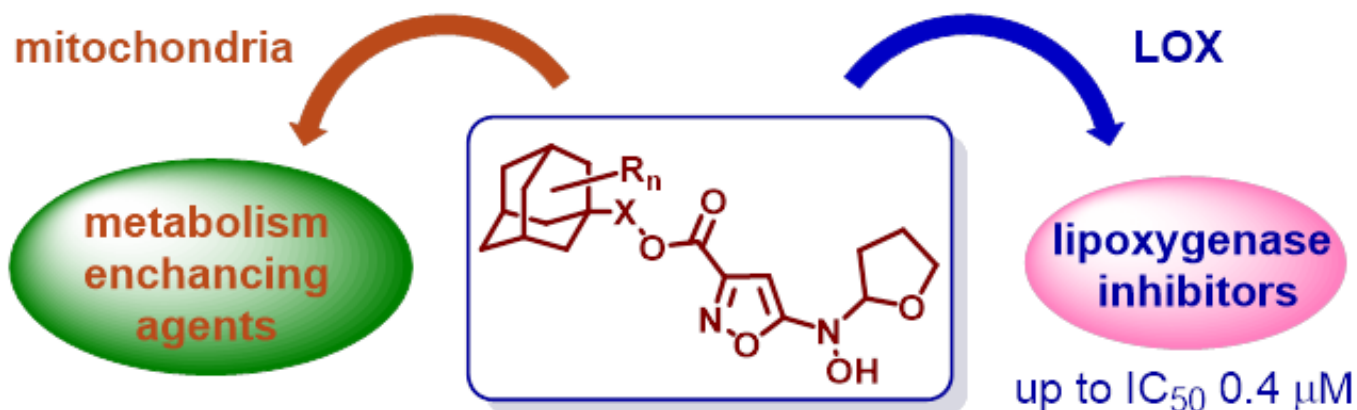


Рисунок 12 [207] Производные 5-[гидрокси(тетрагидрофуран-2-ил)амино]изоксазолов как стимуляторы митохондриального дыхания и ингибиторы липоксигеназы.

Для этого ряда соединений была показана характерная способность ингибировать активность липоксигеназы, высокая антиоксидантная активность и способность стимулировать работу дыхательной цепи митохондрий (Рисунок 12). Ни одно из исследованных соединений не влияло на митохондриальный потенциал и кальций-индуцированную деполяризацию митохондрий. Важно отметить, что при исследовании потенциальной цитотоксичности было показано, что соединения снижают выживаемость клеток нейробластомы SH-SY5Y, энергетика которых практически не зависит от митохондриального дыхания, но в то же время, для первичной нейрональной культуры (гранулярные нейроны мозжечка) стандартным МТТ-методом оценки выживаемости мы не только не обнаружили снижения активности клеточных дегидрогеназ, но в присутствии значительного числа соединений наблюдалась стимуляция этой активности. Таким образом, эти

соединения могут представлять интерес для дальнейшего исследования, но не являются модуляторами пМП.

4.2. Оптимизация структуры производных γ -карболинов - димебона как митопротекторов для создания потенциальных лекарственных препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний.

Модельным соединением, нейропротекторное действие которого связано со стабилизацией функции митохондрий, является препарат Димебон [208]. В середине 90х годов было установлено, что Димебон способен оказывать терапевтическое действие на пациентах с БА [130]. Результаты 2й фазы клинических испытаний на больных с БА, проведенные американской компанией Медивейшн однозначно показали его клиническую эффективность [209]. К сожалению, результаты 3й фазы клинических испытаний, проведенный компанией Файзер не смогли подтвердить эффективность Димебона вследствие аномально высокого положительного эффекта плацебо, на фоне которого действие Димебона нивелировалось [210]. Тем не менее, интерес к возможности использования митохондриального механизма нейропротекторного действия, реализованного Димебоном, продолжает оставаться крайне актуальным, что стимулировало поиск путей оптимизации структуры Димебона и созданию широкого спектра возможных биоизостерных аналогов этого препарата [155, 181, 211].

4.2.1. *Скрининговые исследования различных классов аналогов Димебона.*

В ИФАВ РАН были синтезированы разные классы производных димебона, включая модификации собственно тетрагидро-гамма карболиновой части молекулы, замену или модификации пиридинного остатка и спейсера между этими фармакофорами. Проведено исследование

биологической активности конъюгатов тетрагидро-γ-карболинов с пептидами, синтезированных в лаборатории гетероатомных соединений химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова [212]. Показано, что эти соединения обладают слабой антиоксидантной активностью, способностью снижать (не более чем на 25%) кальций-индуцированное «набухание» митохондрий печени крыс в концентрации 30 μM, но в концентрации 100 μM вызывают значительную деполяризацию митохондрий.

4.2.1.1. Производные пиридоиндолов.

Для различных производных пиридоиндолов (Рисунок 14) – аналогов известного антиоксиданта стобадина, гидрированных пиридоиндолов- γ-карболинов - аналогов димебона, был проведен первичный скрининг их биологической активности, в том числе и по оценке влияния на функциональные характеристики и способности подавлять трет-бутилгидроксипероксид (тБГП) индуцированное перекисное окисление липидов (ПОЛ) митохондрий печени крыс (табл.1).

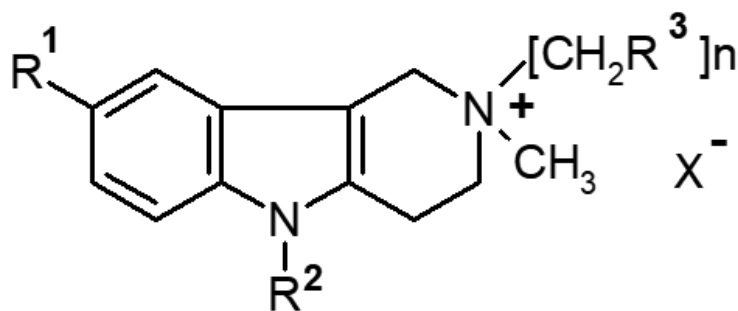


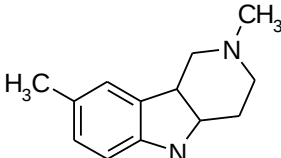
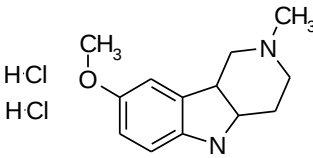
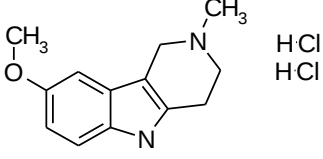
Рисунок 13 Общая формула производных пиридоиндолов

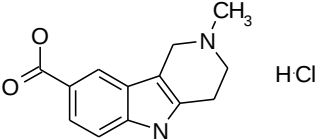
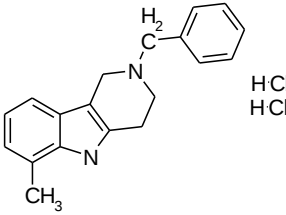
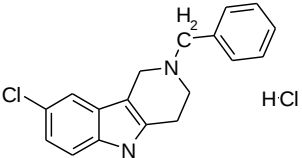
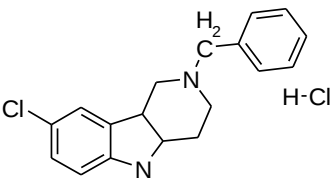
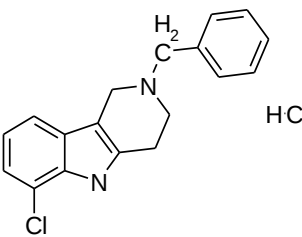
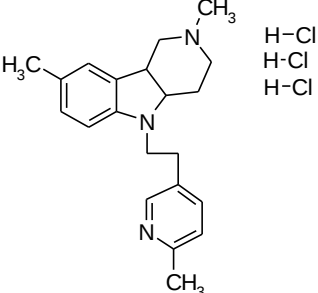
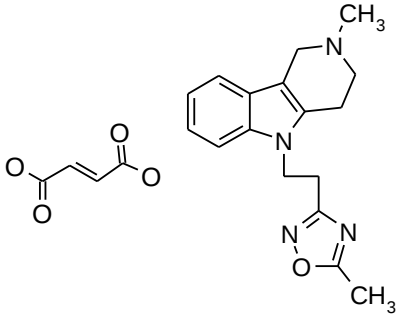
[Russian Patent № 2140417 (Application RU 95117589, priority of October 17, 1995 Derivatives of hydrogenated pyrido[4,3-b]indoles, methods of their preparation, pharmaceutical compositions and application N.S.Zefirov, et. al.)]

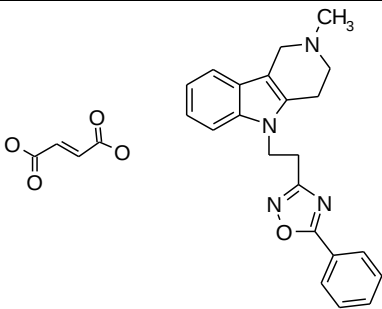
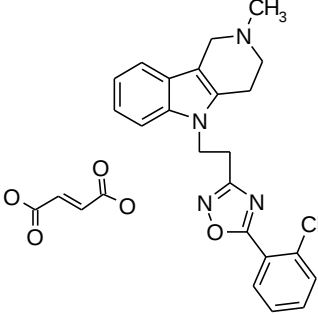
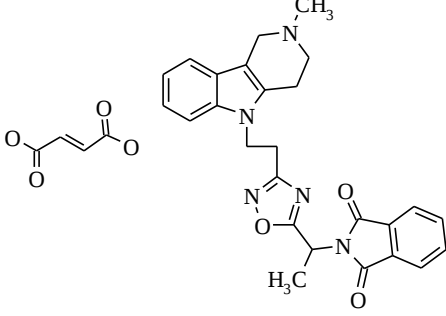
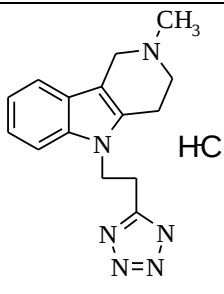
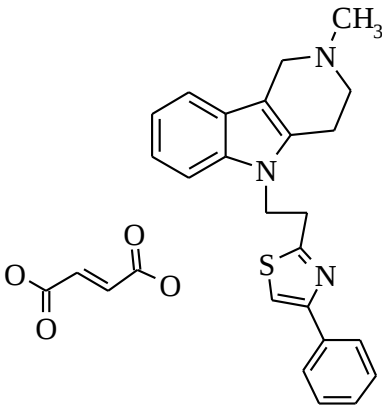
Пиридоиндолы и, в частности, стобадин обладают значительной антиоксидантной активностью. Стобадин, является радикал-связывающим, цепь-прерывающим антиоксидантом [213], но не проявляет способности

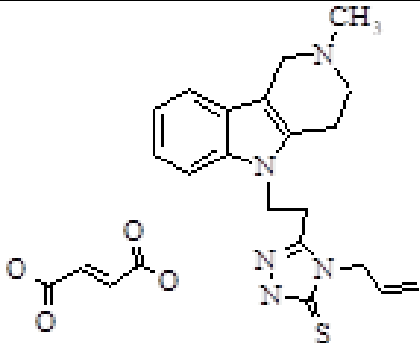
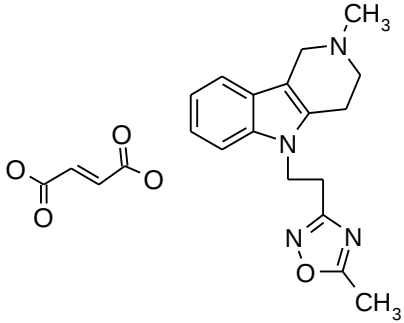
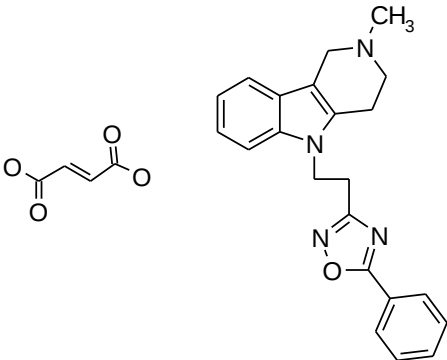
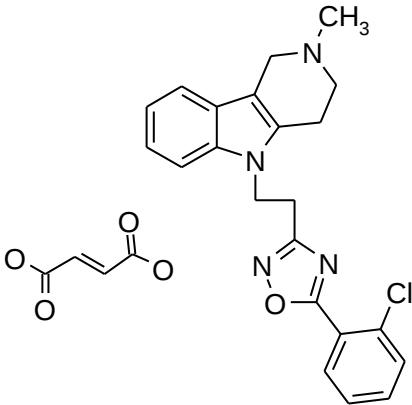
увеличивать устойчивость митохондрий к индукции МП (Таблица 1). В отличие от него, гидрированное производное пиридоиндола – димебон обладает свойствами ингибитора МП, но незначительной антиоксидантной активностью. В то же время, дегидрированный аналог димебона – соединение IP9209 показывает антиоксидантную активность, сравнимую с активностью стобадина, но значительно менее активен как ингибитор МП. Все N-пиридо-метилбензолные производные стобадина (как гидрированные, так и негидрированные) обладают антиоксидантной активностью. но снижение скорости кальций-индуцированного «набухания» в их присутствии связано со значительной деполяризацией митохондрий и, соответственно, с утратой способности аккумулировать ионы кальция. В целом, в исследованном ряду нам не удалось выявить соединений, в значительной степени превосходящих димебон по терапевтическому потенциалу.

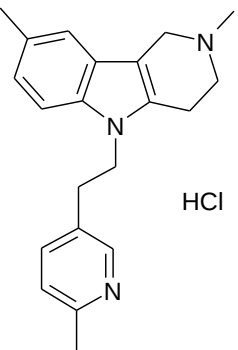
Таблица 1 Результаты первичного скрининга производных пиридоиндолов.

№ п/п	Шифр	Формула	IC ₅₀ , μМ «набухание» митохондрий	IC ₅₀ , μМ, ПОЛ (индуктор - 1.6мМ тБГП)*	Деполяризация митохондрий, в присутствии 30μМ соединений **
1	Стобадин		н.э.	32,6±1,8	—
2	IP9208		н.э.	34±13	—
3	IP9140		н.э.	≥100	—

4	IP9207		H.Э.	H.Э.	—
5	IP9141		1±0,8	15,5±0,7	+
6	IP9206		15±10	6±1,5	+
7	IP9210		25±10	40±14	+
8	IP9205		35±17	13,6±0,9	+
9	IP9209		62±22	35±15	—
10	IP9226		H.Э.	H.О.	—

11	IP9227		35 ± 17	$31,2 \pm 3,5$	—
12	IP9228		15 ± 10	$20,9 \pm 4,4$	—
13	IP9416		≥ 100	H.O.	H.Э.
14	IP9417	 HCl	≥ 100	H.O.	+
15	IP9419		≥ 100	H.O.	+

16	IP9420		Н.Э.	Н.О.	Н.Э.
17	IP9226		Н.Э.	Н.О.	Н.Э.
18	IP9227		35±17	31,2±3,5	Н.Э.
19	IP9228		15±10	20,9±4,4	Н.Э.

	Димебон		11,4±3,5	≥100	н.э.
--	---------	---	----------	------	------

* - Митохондрии печени крыс

** - Митохондрии печени крыс в присутствии 10мМ сукцината и 1μМ ротенона, – - нет деполяризации, + - соединение вызывает деполяризацию

4.2.1.2. γ-Карболины, модифицированные N-замещенными пропионамидными фрагментами

Следующим синтезированным с целью оптимизации структуры димебона является класс производных γ-карболинов - гидрохлориды N-замещенных 3-(1,2,3,4-тетрагидропиридо[4,3-b]индол-5-ил)пропионамидов **4a-h** (Рисунок 14А) [214].

4a	R=H, R ₁ =Me, R ₂ =4-Me-C ₆ H ₄	4e	R=H, R ₁ =Et, R ₂ =5-Cl-Pyridin-2-yl
4b	R = Me, R ₁ = Me R ₂ =4-MeO-C ₆ H ₄	4f	R=Me, R ₁ =Me, R ₂ =4-Me-C ₆ H ₄
4c	R=H, R ₁ =Et, R ₂ =4-Cl-C ₆ H ₄	4g	R=Me, R ₁ =Me, R ₂ =4-Cl-C ₆ H ₄
4d	R=H, R ₁ =Et, R ₂ =4-MeO-C ₆ H ₄	4h	R=Me, R ₁ =Me, R ₂ =5-Cl-Pyridin-2-y

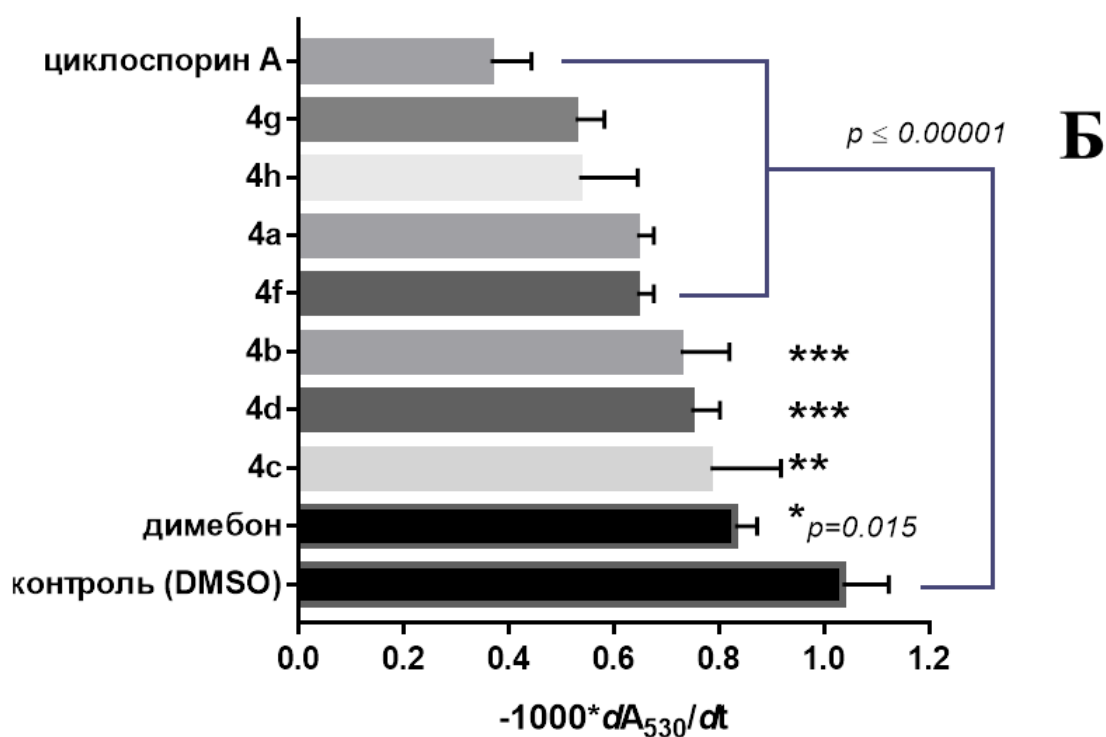
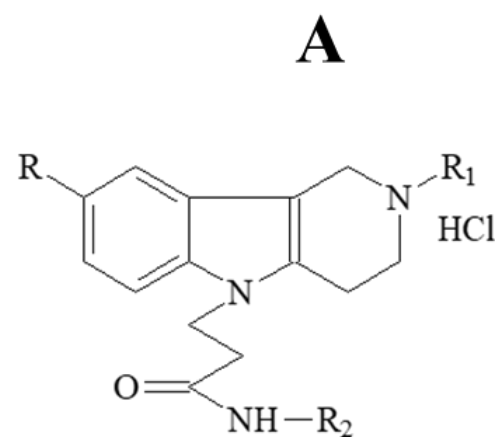


Рисунок 14 Производные гидрохлоридов N-замещенных 3-(1,2,3,4-тетрагидропиридо[4,3-*b*]индол-5-ил)пропионамидов: А – формулы соединений; Б – подавление кальций-индуцированного «набухания» энергизованных 10мМ сукцинатом в присутствии 1 μ М ротенона митохондрий мозга

Добавление соединения **4e** к суспензии митохондрий печени крыс приводило к нарастающей во времени деполяризации митохондрий, через 12,5 минут достигающей практически 100%, что обусловило и снижение кальций-индуцированного «набухания» митохондрий крыс. Это соединение было исключено из дальнейших исследований на митохондриях мозга крыс. Также деполяризацию, но гораздо более слабую, до постоянного уровня (не более 30%) при 30 μ M соединения вызывают **4d** и **4b** соединения. Остальные производные гидрохлоридов N-замещенных 3-(1,2,3,4-тетрагидропиридо[4,3-b]индол-5-ил)пропионамидов не оказывали влияния на митохондриальный трансмембранный потенциал и в большей степени, чем Димебон предотвращали индукцию МП (Рисунок 14Б). Скорость "набухания" митохондрий уменьшается в ряду димебон-**4c**-**4d**- **4b**- **4f**- **4a**- **4h**- **4g** и зависит от природы заместителей карболинового цикла. Так, соединения, содержащие в положении 8 метильный заместитель проявили большую степень ингибирования по сравнению с остальными веществами (Рисунок 15Б).

Вызывающее значительную деполяризацию митохондрий мозга крыс соединение **4e** концентрационно-зависимо снижает способность митохондрий накапливать ионы кальция (Рисунок 15А и Д), соединение **4a**, показавшее значительное ингибирование кальций-индуцированного «набухания» митохондрий, тем не менее практически не влияет на кальциевую ёмкость митохондрий (Рисунок 15А и Г), а соединение **4d** – слабо и на постоянную величину снижающий потенциал митохондрий увеличивает кальциевую ёмкость митохондрий мозга крыс (Рисунок 15А и В). Значительная активность по подавлению кальций-вызванного открытия пор МП для соединения **4h** сопровождается и значительным концентрационно-зависимым увеличением кальциевой ёмкости митохондрий мозга крыс (Рисунок 15А и Б).

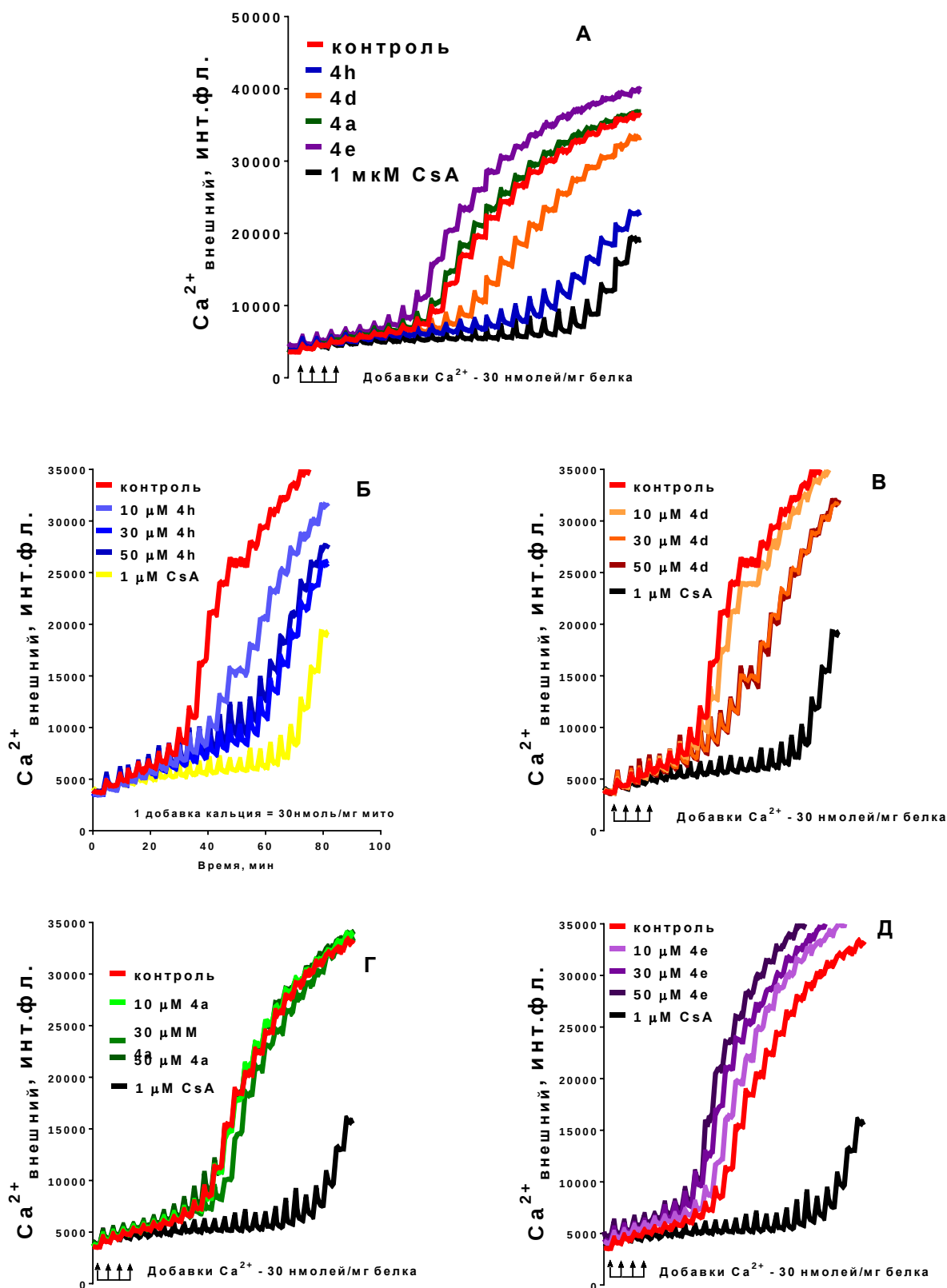


Рисунок 15 Влияние на кальциевую ёмкость (CRC) митохондрий мозга крыс гидрохлоридов N-замещенных 3-(1,2,3,4-тетрагидропиrido[4,3-b]индол-5-ил)пропионамидов: А – концентрации соединений 4a, 4d, 4e, 4h - 30 μM

(150 нмоль/мг белка, 0.3% DMSO); Б-Д - концентрационные зависимости CRC для соединений 4h, 4d, 4a и 4e, соответственно
Буфер: 120 mM KCl, 20 mM Hepes, 100 mM сахараза, 0.2 mM фосфат, 0.45 mM MgCl₂, 0.15 mM АДФ, 1 мкг/мл олигомицина, 100 nM CaG5N. 1 добавка кальция = 30 нмоль/мг белка. На рисунке представлены данные одного эксперимента, каждая кривая представляет среднее из трёх повторов. Такие же данные получены дополнительно на трёх разных препаратах митохондрий.

Все производные гидрохлоридов N-замещенных 3-(1,2,3,4-тетрагидропиридо[4,3-b]индол-5-ил)пропионамидов до концентрации 400 μM не оказывали достоверного ($p < 0.05$, t-test) на ПОЛ в гомогенатах мозга при индукции с помощью т-БГП и в концентрации 30 мкM не оказывали достоверного влияния ($p < 0.05$, t-test) на образование активных форм кислорода (АФК) митохондриями мозга в присутствии субстратов как комплекса I ДЦ, так и комплекса II (в присутствии ротенона). Однако на митохондриях печени соединения достоверно снижали образование АФК в присутствии субстрата комплекса II, как в случае ингибирования комплекса I ротеноном, так и в присутствии избытка субстратов обоих комплексов дыхательной цепи митохондрий. Все исследованные соединения до концентрации 30 μM не обладают цитотоксичностью, что показано на первичной культуре нейронов коры мозга крыс, выживаемость нейронов оценивали стандартным МТТ тестом. И хотя на клеточной модели нейродегенерации – эксайтотоксичности - соединение с наибольшей митопротекторной активностью - **4h** не проявило нейропротекторных свойств, предварительные данные *in vivo* исследований влияния соединения **4h** на исследовательское поведение и формирование памяти у крыс в тесте узнавания нового положения объекта показали наличие когнитивно-стимулирующего действия у соединения 4h в дозах 0,5 и 0,1 мг/кг при пероральном введении мышам C57bl.

Таким образом, гамма-карболины, модифицированные N-замещенными пропионамидными фрагментами, могут представлять интерес

как потенциальные модуляторы митохондриальной поры высокой проницаемости и когнитивные стимуляторы

4.2.1.3. Монофтор- и трифторметил-содержащие структурные аналоги димебона – как ингибиторы МП и стимуляторы нейрогенеза

Монофтор- и трифторметил-содержащие структурные аналоги димебона (Рисунок 16А и Рисунок 17А) проявили значительную активность и как митопротекторы и в целом - это наиболее интересный класс производных димебона [215]. Как известно, введение фтора, а особенно трифторметильной группы, позволяет повысить метаболическую устойчивость соединений и проницаемость через клеточные мембраны, а также потенциально способно увеличивать эффективность препарата, повышая его электростатическое взаимодействие с мишенями [216-218].

Все монофтор- и трифторметил-содержащие структурные аналоги димебона в концентрациях до 30 μM (150 нмоль/мг белка митохондрий) не оказывают существенного влияния на митохондриальный трансмембранный потенциал как при энергизации митохондрий субстратами как комплекса I, так и комплекса II. На основании этих данных можно сделать вывод, что вещества не являются митотоксичными, т.е. не ингибируют работу ДЦМ, и не оказывают разобщающего действия на ДЦМ.

код	R1	R2
DF-302	-CH ₃	-CH ₃
DF-315	-C ₂ H ₅	-Cl
DF-304	-CH ₃	-Cl
DF-312	-C ₂ H ₅	-CH ₃
DF-320	-CH ₃	-CH(CH ₃) ₂
DF-317	-CH ₃	-C ₂ H ₅
DF-316	-C ₂ H ₅	-C ₂ H ₅
DF-303	-CH ₃	-F
DF-311	-C ₂ H ₅	-H
DF-301	-CH ₃	-H
DF-318	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₃
DF-319	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	-CH ₃

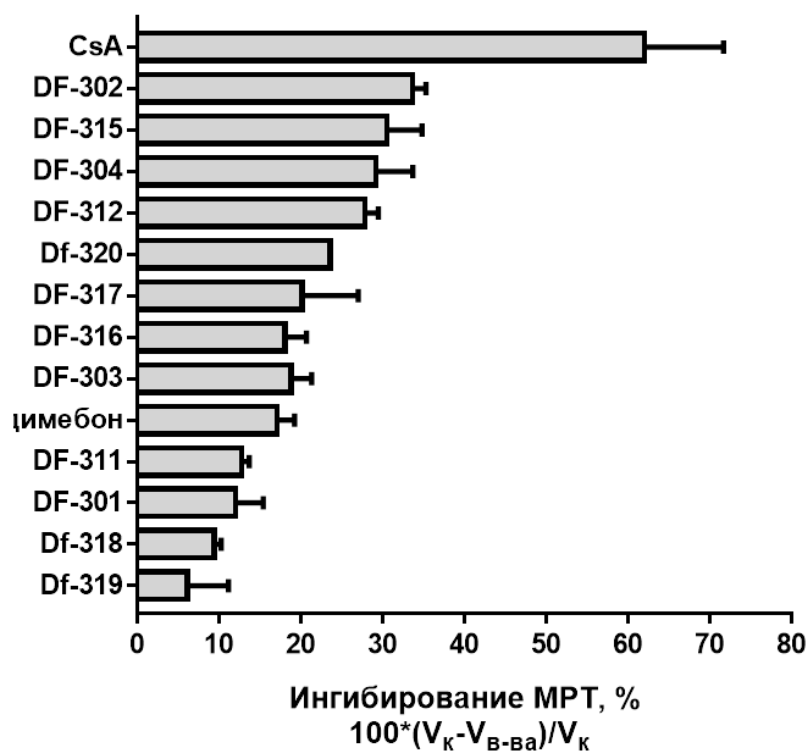
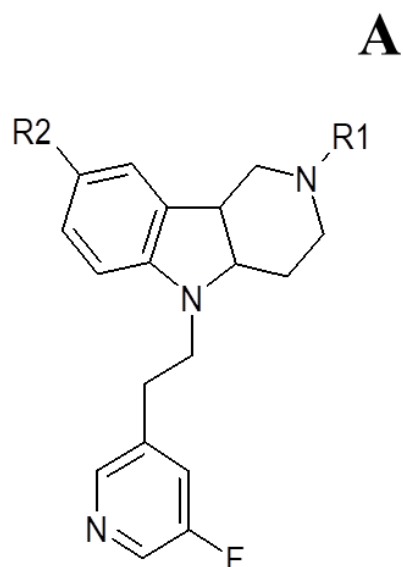


Рисунок 16 Производные гидрохлоридов монофторсодержащих-γ-карболинов: А - формулы соединений; Б - ингибирование кальций-индуцированного «набухания» энергизованных 10мМ сукцинатом в присутствии 1 μМ ротенона митохондрий мозга крыс, вызванное 30 μМ производных гидрохлоридов монофторсодержащих-γ-карболинов

КОД	R1	R2	R3
DF-401	-CH ₃	-H	-H
DF-402	-CH ₃	-CH ₃	-H
DF-403	-CH ₃	-F	-H
DF-404	-C ₂ H ₅	-Cl	-H
DF-406	-CH ₃	-OCH ₃	-H
DF-407	-CH ₃	-F	-F
DF-408	-C ₂ H ₅	-Cl	-H

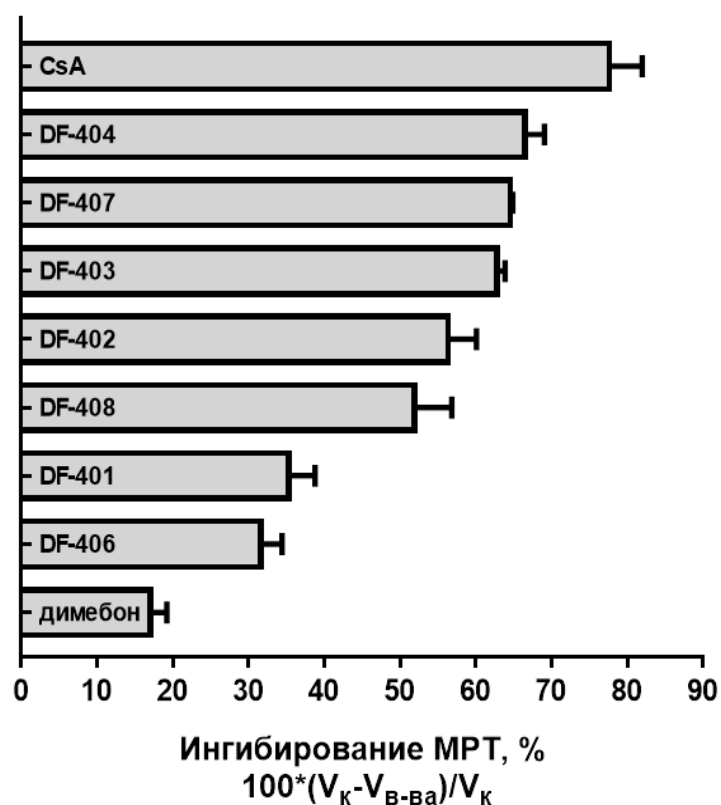
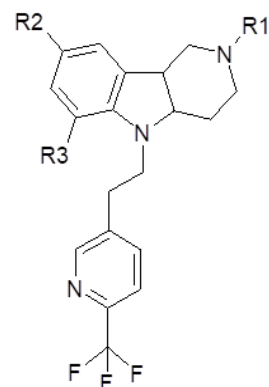


Рисунок 17 Производные гидрохлоридов трифторметил-содержащих-γ-карболинов: А - формулы соединений; Б -ингибирование кальций-индуцированного «набухания» энергизованных 10мМ сукцинатом в присутствии 1 μМ ротенона митохондрий мозга крыс, вызванное 30 μМ производных гидрохлоридов трифторметил-содержащих-γ-карболинов

В то же время, ряд монофтор-содержащих структурных аналогов Димебона (Рисунок 16Б), как и трифторметил-содержащие структурные аналоги Димебона (Рисунок 17Б) проявили активность по отношению к кальций-индуцированному открытию пор МП, превосходящую активность димебона. Также все представленные на Рисунок 16Б и Рисунок 17Б соединения увеличивают кальциевую ёмкость митохондрий мозга крыс.

4.2.1.4. DF-302 как ингибитор МП

Более детально было исследовано выделенное по совокупности тестов, включая не только влияние на митохондрии, но также и на ряд рецепторов соединение-лидер DF-302 (гидрохлорид 2,8-диметил-5-[2-(5-фторпиридин-3-ил)этил-2,3,4,5-тетрагидро-1H-пиридо[4,3-b]индола). DF-302 является водорастворимым соединением, которое стабильно в водных растворах, может проникать через гематоэнцефалический барьер. Кроме того, было показано, что оно нетоксично и обладает высокой биодоступностью для мозга и улучшенной фармакокинетикой по сравнению с димебоном: период его полувыведения составляет 15,26 часов, а для димебона - 2,59 часа. Кроме того, DF-302, как и димебон способен одновременно потенцировать токи АМРА-рецепторов, ингибировать NMDA-рецепторы и блокировать 5HT₆-рецепторы, что обуславливает наличие когнитивно-стимулирующих свойств [219].

Это соединение не только эффективно снижает уязвимость митохондрий мозга к индукции МП, но и увеличивает их кальциевую ёмкость (Рисунок 18А и Б, соответственно).

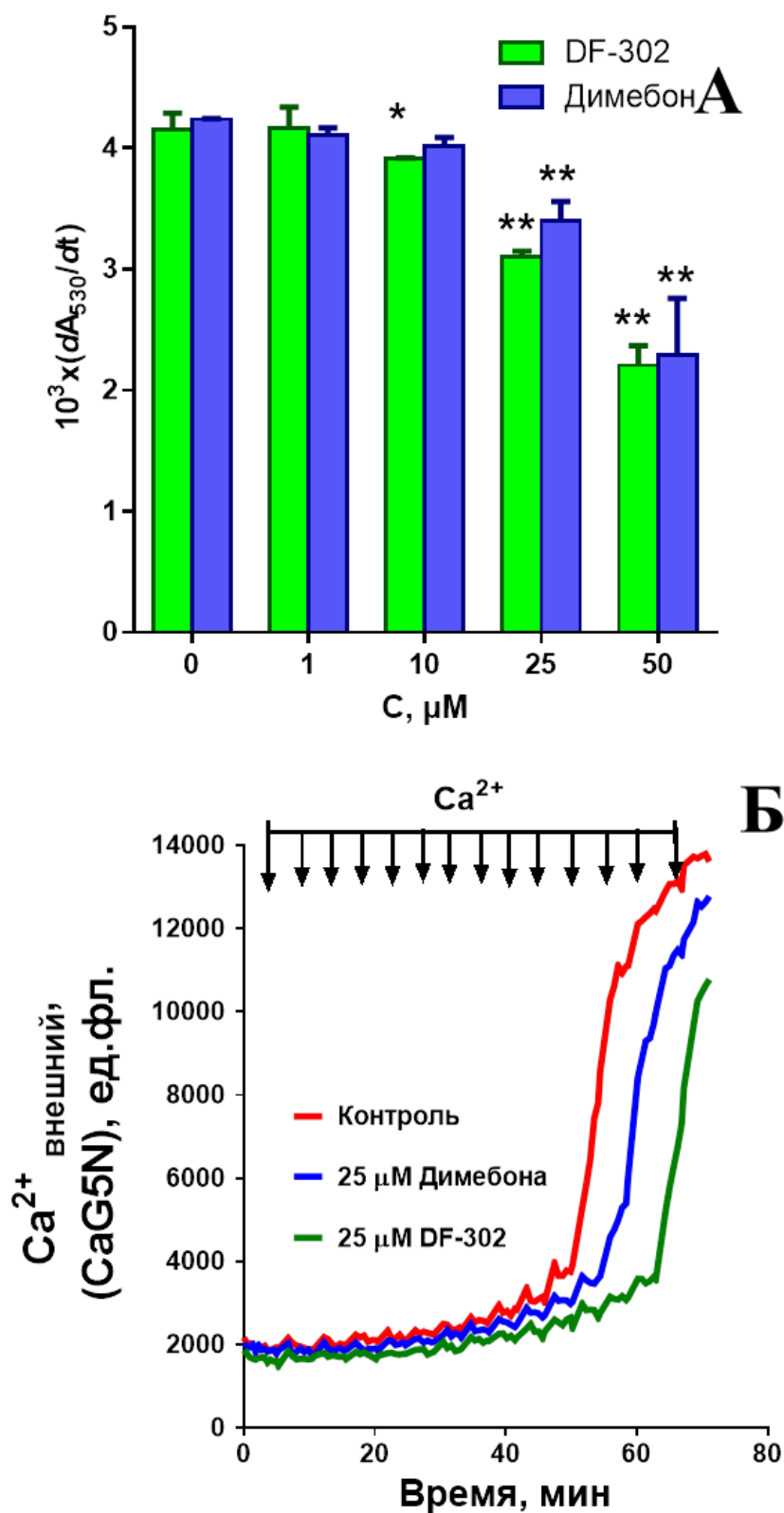


Рисунок 18 Влияние димебона и DF-302 на: А - кальций-индуцированное «набухание»; Б - кальциевую ёмкость митохондрий мозга крыс. Достоверность отличий оценивали одномерным дисперсионным анализом ANOVA с апостериорным тестом Даннетта (* - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$)

На клеточных моделях нейродегенерации – модели эксайтотоксичности и модели окислительного стресса DF-302 достоверно защищает нейроны от гибели (Рисунок 19).

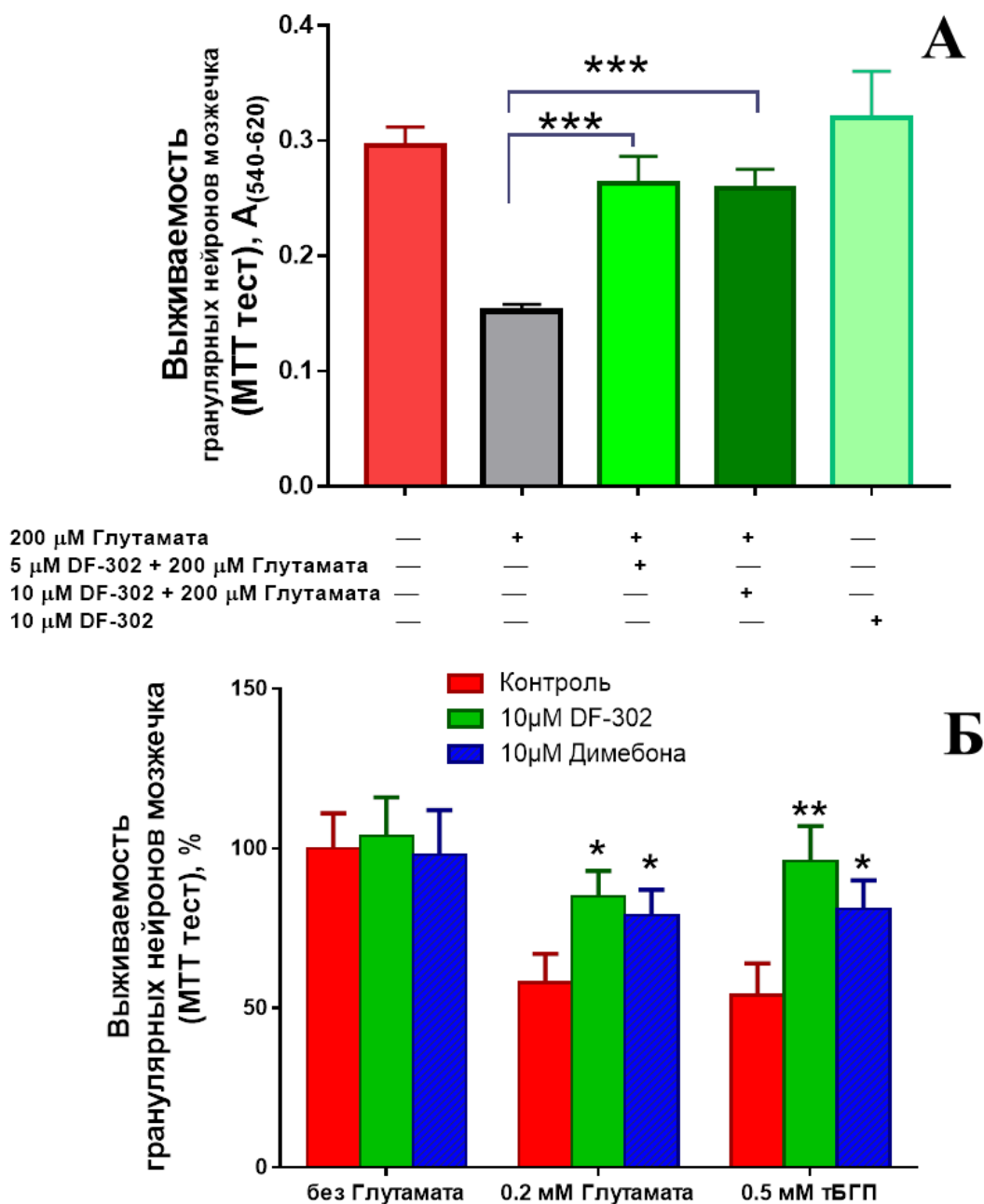


Рисунок 19 Влияние соединения-лидера из класса фтор-содержащих производных γ -карболинов – DF-302 на: А - выживаемость гранулярных нейронов мозжечка в условиях эксайтотоксичности (200 μ M глутамата). Б – выживаемость гранулярных нейронов мозжечка в условиях эксайтотоксичности (200 μ M глутамата) и окислительного стресса,

вызванного 0,5 мМ трет-бутилгидроксипероксида (тБГП) в сравнении с димебоном.

Выживаемость нейронов оценивали стандартным МТТ тестом. Достоверность отличий оценивали одномерным дисперсионным анализом ANOVA с апостериорным тестом Даннетта (* - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$ и ***- $p < 0.001$).

Также было показано, что *in vivo* хроническое введение соединений DF-302, как и его предшественника Димебона способно привести к снижению прогрессирования моторных и когнитивных дисфункций у трансгенных мышей с моделью амилоидоза (линия 5xFAD) [220].

4.2.1.5. DF-302 как стимулятор нейрогенеза

В совместной работе [221] было показано в тестах пассивного избегания и кондиционирования страхом, что только DF-302, но не димебон (после однократного перорального введения в дозах 40 мг/кг за 15 минут до начала обучения), улучшает долговременную память у самцов мышей CD1.

Ранее было показано, что как ряд производных карбазолов, так и димебон увеличивают гипокампальный нейрогенез, который оценивали по включению 5-бром-2'-дезоксидеоксиуридин-5'-монофосфата, маркера делящихся клеток, который вводили интраперитонеально и затем регистрировали иммуноцитохимическим методом с антителами к 5-бром-2'-дезоксидеоксиуридин-5'-монофосфату [155]. Авторами было показано, что основным механизмом стимуляции нейрогенеза является не увеличение скорости пролиферации, а именно увеличение выживаемости новых дифференцированных нейронов, что непосредственно связано со способностью соединений увеличивать устойчивость митохондрий к индукции МП.

Наличие нейропротекторной активности, связанной с подавлением процесса МП, данные о более пролонгированной фармакокинетике и лучшей, по сравнению с димебоном, биодоступности DF-302, а также данные о потенцировании гипокамп-зависимой долговременной памяти позволили нам

предположить возможность выраженного эффекта потенцирования нейрогенеза.

Сравнительная оценка влияния димебона и DF-302 на процессы нейрогенеза была проведена нашими соавторами после двухнедельного введения димебона или DF302 в дозах 10 и 40 мг/кг как у наивных мышей, так и у мышей подвергнутых предаторному стрессу (экспозиция крысы). Двухнедельное введение димебона или DF302 в дозах 10 и 40 мг/кг привело к достоверному снижению депрессивного поведения (тест вынужденного плавания), пятидневный предаторный стресс на фоне введения соединений привёл к достоверному противострессовому эффекту DF302 в дозе 40 мг/кг (тест тёмная/светлая камера и пассивное избегание) [221].

После введения димебона или DF302 в группах мышей, не подвергавшихся стрессу, достоверное стимулирование нейрогенеза, который оценивали по экспрессии маркера нейрогенеза Ki-67 с помощью иммуногистохимической микроскопии, было показано только для наибольшей (40 мг/кг) дозы DF-302, но не димебона (Рисунок 20В). Для животных, подвергнутых стрессу также была выявлена достоверная дозозависимая стимуляция нейрогенеза соединением DF-302 (Рисунок 20Б), но не удалось выявить подобный эффект для димебона в условиях нашего эксперимента (Рисунок 20А), хотя стимулирование нейрогенеза димебоном было показано в работе [155].

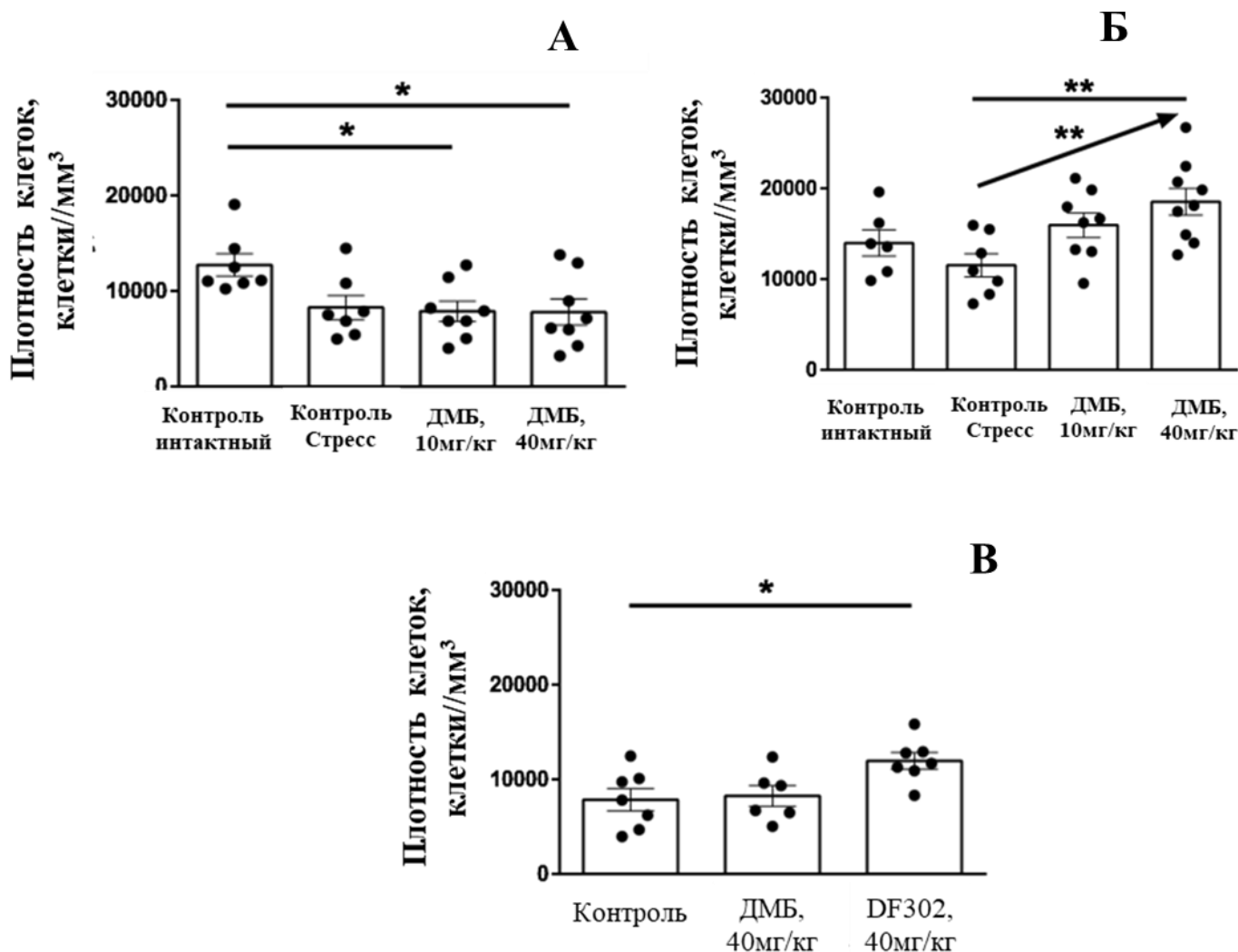


Рисунок 20 Влияние на плотность Ki67+ в зубчатой фасции гиппокампа стрессированных крыс: А - димебона, Б – DF302; В - влияние димебона и DF-302 на плотность Ki67+ в зубчатой фасции гиппокампа не стрессированных крыс

Во время нейрогенеза в субвентрикулярной зоне 60% клеток новорожденных подвергаются клеточной гибели в течение 6-дневного периода [151], а в зубчатой фасции гиппокампа 50% нейронов новорожденного умирают в базовых условиях [152]. Существует множество данных о том, что запрограммированная гибель клеток является одним из важнейших регуляторов нейрогенеза у взрослых [153]. Поэтому стратегии выживания клеток для усиления нейрогенеза *in vivo* могут быть очень перспективным направлением. А процесс МП как ключевой этап апоптоза

может быть важным регулятором нейрогенеза у взрослых. Выявленная нами способность DF-302 ингибировать МП и защищать нейроны от смерти, вызванной эксайтотоксическим и окислительным стрессом (tBHP), может быть механизмом стимуляции нейрогенеза этим соединением.

Таким образом, результаты скрининговых исследований новых оптимизированных аналогов Димебона, включающие как один из основных этапов исследования влияния на митохондриальные характеристики, связанные с индукцией процессов клеточной гибели, позволили выделить ряд соединений, перспективных для дальнейшей разработки в качестве лекарственных препаратов. Кроме того, эти исследования позволили убедиться в эффективности выбранной методологии скрининга новых цитопротекторных препаратов, основанной на оценке митохондриальных характеристик и привели нас к выводу о необходимости этого направления при развитии поиска лекарственных препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний нового типа – мультитаргетных препаратов.

4.3. Стабилизация функций митохондрий как необходимый этап в создании мультитаргетных препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний

Имеющиеся в настоящее время данные по изучению патогенеза большей части возраст-зависимых нейродегенеративных заболеваний (НЗ), в частности, болезни Альцгеймера, дают основание утверждать, что их патогенез характеризуется мультифакторностью, комплексной зависимостью как от факторов генетической предрасположенности, так и от множества внешних факторов риска, истории заболеваний и травм в течении жизни. Более того, сформировалась точка зрения о том, что не только васкулярная деменция, но и альцгеймеровская деменция строго говоря не является «болезнью», а скорее сочетанием клинических и патологических синдромов

[222]. В течении долгого времени БА, как и другие возраст-зависимые НЗ развиваются бессимптомно и диагностируются уже при высоком уровне нейродегенеративных повреждений в мозге и связанных с этим нарушений когнитивных функций. Увеличение устойчивости митохондрий к индукции открытия пор МП может быть основой нейропротекторного эффекта соединений и, в определённой степени, может обеспечить снижение скорости нейродегенерации. Но необходимо применение и препаратов, способных компенсировать нарушенные или утраченные когнитивные функции. Для лечения болезни Альцгеймера в настоящее время одобрены именно препараты, направленные на преодоление нейротрансмиттерного дефицита (компенсаторная или заместительная терапия). Это ингибиторы АХЭ и низкоаффинный ингибитор ионного канала NMDA-подтипа глутаматного рецептора – мемантин. Неоднозначность патогенеза и поздняя диагностика НЗ приводит к необходимости применения комплексной терапии при этих заболеваниях и делает маловероятным поиск эффективного лекарства в ряду монотаргетных препаратов. Необходимость наличия у лекарственных препаратов для лечения болезни Альцгеймера компенсаторного, когнитивно-стимулирующего и нейропротекторного эффектов обусловила интерес к поиску мультитаргетных сочетающих эти активности и при этом обладающих низкой токсичностью и поэтому доступных для хронического применения [223, 224]. В то же время, исследования механизмов действия уже применяемых и новых препаратов с потенциалом использования для лечения болезни Альцгеймера, а также данные о возможной общности элементов нейротрансмиттерных рецепторов и митохондриальных структур вселяют надежду на успешную реализацию такого подхода.

4.3.1. Мемантин как ингибитор МП

Мемантин – низкоаффинный неконкурентный блокатор NMDA-рецептора – является одобренным FDA, OECD и регуляторными органами

других стран лекарственным препаратом для лечения болезни Альцгеймера и именно с блокадой кальциевого ионного канала NMDA-подтипа глутаматных рецепторов клеточной мембраны (как экстра-синаптических, так и постсинаптических) связывают его положительный терапевтический эффект: когнитивно-стимулирующие свойства и нейропротекторный эффект.

В последние годы получен ряд данных о существовании и в мембране митохондрий кальциевых каналов, подобных рецептор-связанным ионным каналам плазматической мембраны. Показано, что ND2-субъединица комплекса I дыхательной цепи митохондрий (ДЦМ) которая кодируется митохондриальным ДНК, одновременно является адапторным белком, обеспечивающим связывание Src киназы с NMDA-рецепторным комплексом [176].

Косвенные подтверждения наличия структур, подобных ионному каналу NMDA-рецептора были получены и в наших экспериментах с оценкой влияния лигандов этих рецепторов на митохондриальные процессы, связанные с кальциевым гомеостазом. Было показано, что специфические лиганды NMDA рецептора МК801 (Рисунок 21) в миллимолярных концентрациях и мемантин в микромолярных концентрациях (Рисунок 22, Рисунок 23) увеличивают кальциевую ёмкость митохондрий и подавляют кальций-индуцированное МП [225]. Этот эффект обнаружен как для митохондрий печени (Рисунок 22), так и для митохондрий мозга крыс (Рисунок 23).

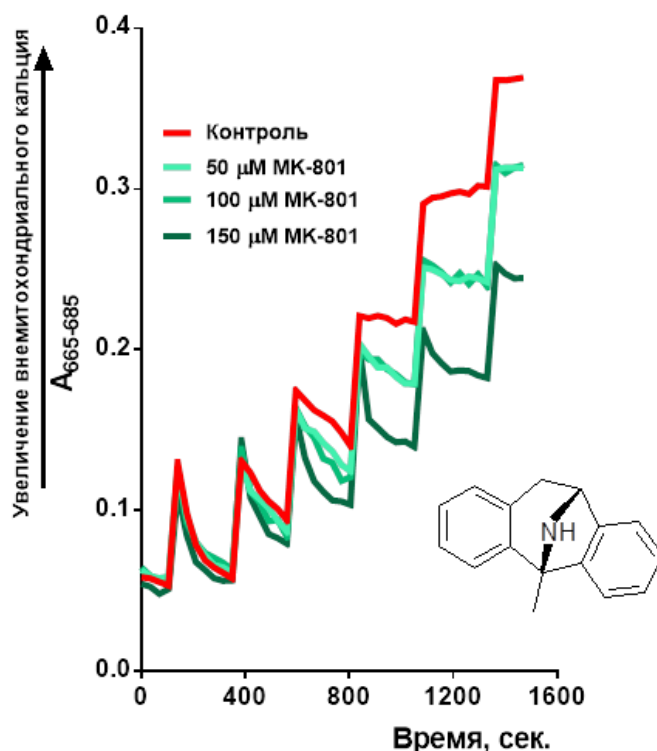


Рисунок 21 Лиганд NMDA-подтипа глутаматных рецепторов МК-801 увеличивает кальцевую ёмкость изолированных митохондрий печени крыс, измеренную в присутствии кальций-чувствительной красителя Арсеназо III

Мемантин не влияет на мембранный потенциал митохондрий вне зависимости от используемого субстрата энергизации митохондрий (Рисунок 22А,Б) снижает скорость изменения формы митохондрий в тесте кальций-индуцированного «набухания» (Рисунок 22В-Г, Рисунок 23А) и кальций-вызванную деполяризацию митохондрий (Рисунок 22А,Б), а в присутствии АДФ (Рисунок 23Б) способствует увеличению реполяризации митохондрий после болюсных добавок кальция. Кроме того, степень увеличения устойчивости митохондрий к индукции МП в присутствии мемантина зависит от субстратов ДЦМ, используемых в эксперименте со значительно более выраженным ингибированием в присутствии именно субстратов комплекса I ДЦМ (Рисунок 22Д).

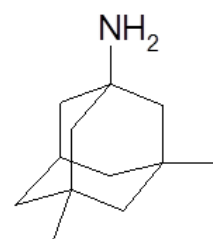
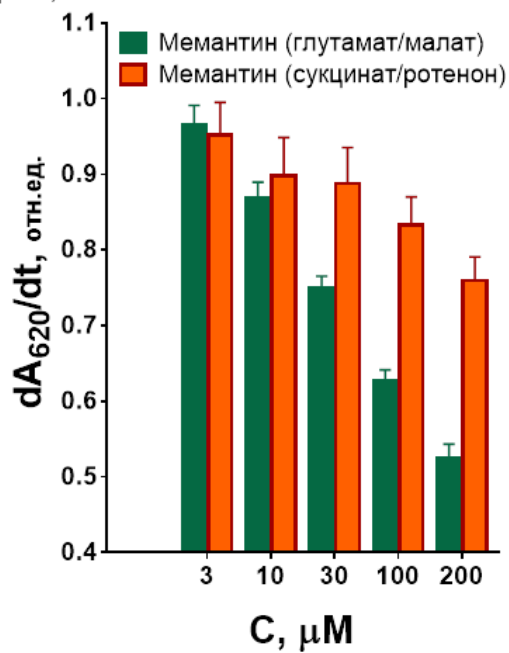
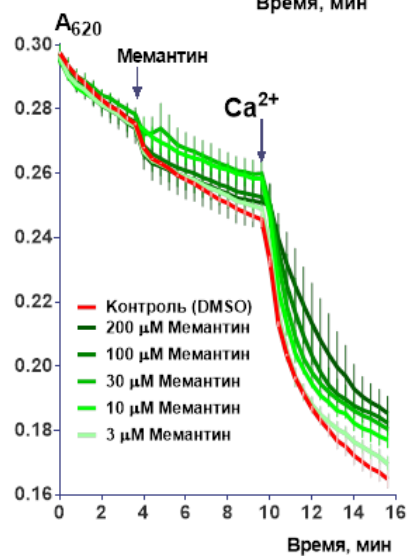
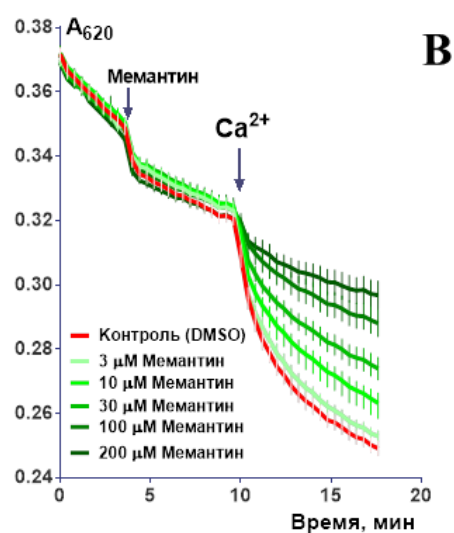
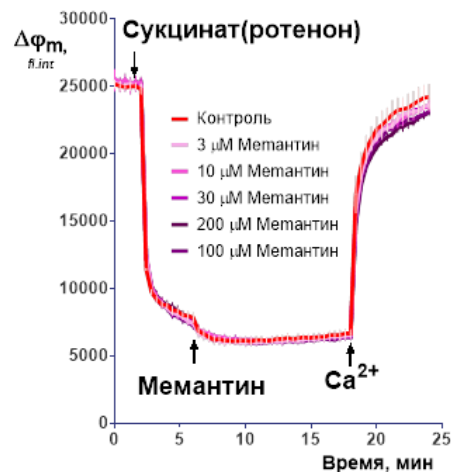
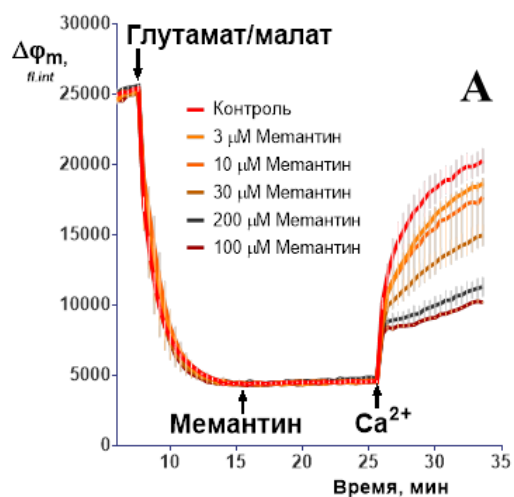


Рисунок 22 Мемантин повышает устойчивость митохондрий печени крыс к индукции открытия пор МП : кальций индуцированной деполяризации (А,

Б), «набухания» митохондрий (В, Г, Д) в зависимости от используемых субстратов дыхательной цепи митохондрий – А, В - комплекса I (глутамата/малата); Б, Г - комплекса II (сукцината в присутствии ингибитора комплекса I ротенона).

Исследования кальциевой ёмкости и захвата кальция изолированными митохондриями в присутствии ингибиторов ионных каналов глутаматных рецепторов МК-801 и мемантина не выявили не только снижения скорости и количества захватываемого митохондриями кальция, но более того, показали способность более длительного удерживания потенциала митохондриями после добавок кальция, т.е. увеличение кальциевой ёмкости митохондрий (Рисунок 23А-В). Учитывая колокализацию митохондрий и глутаматных рецепторов, нельзя отрицать, что этот эффект увеличения кальциевой ёмкости и устойчивости к МП митохондрий в присутствии мемантина может играть существенную роль в его нейропротекторном и когнитивно-стимулирующем эффекте. В то же время, в исследованных концентрациях мемантин не влияет ни на активность дыхательной цепи митохондрий, что было показано с использованием респирометрии высокого разрешения (оксиграф Оxygraph-2k, Oroboros), ни на пероксидное окисление липидов митохондрий.

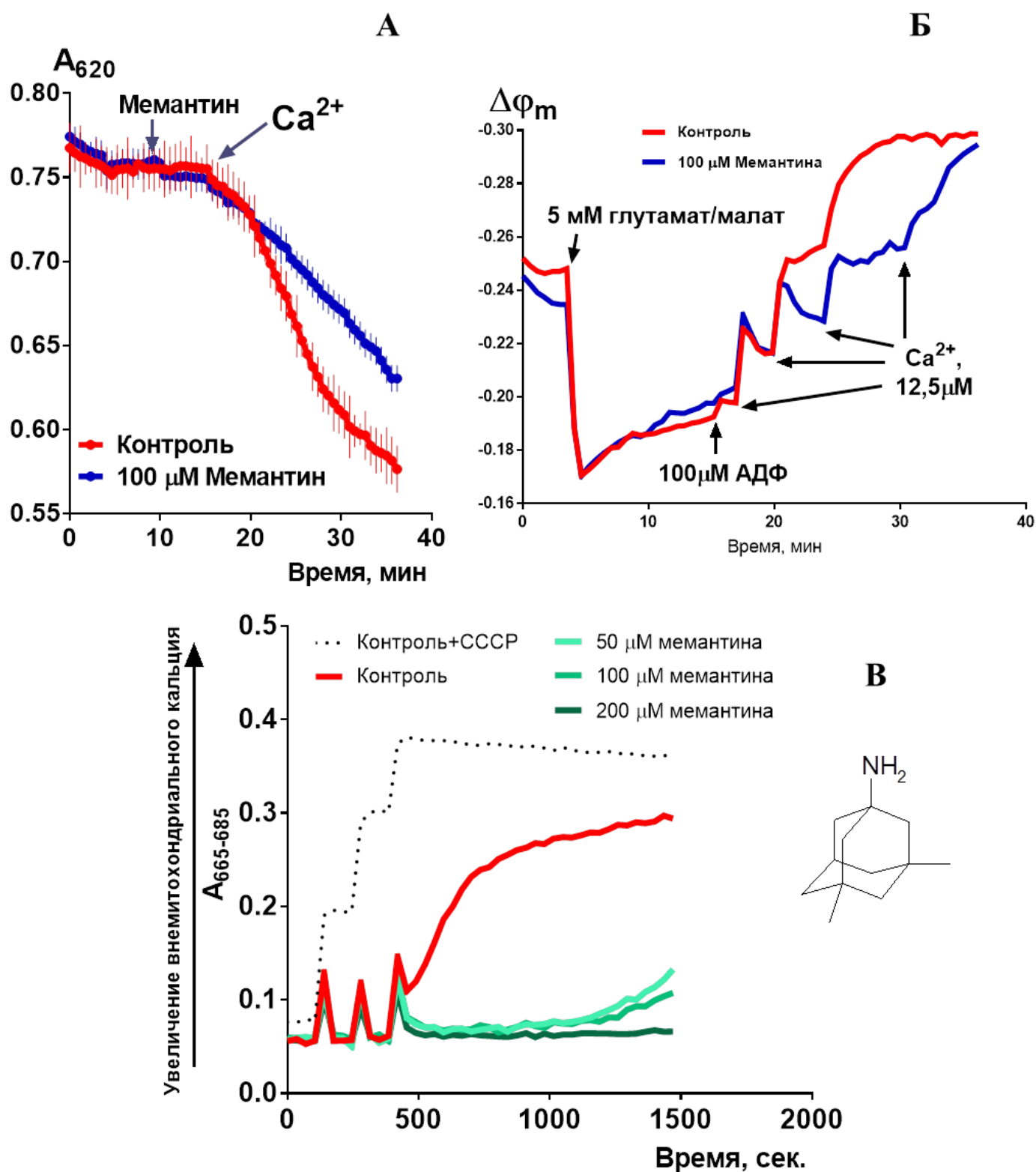


Рисунок 23 Мемантин повышает устойчивость митохондрий мозга крыс к индукции открытия пор МП: снижает кальций индуцированное «набухание» митохондрий (А), кальций-индуцированную деполяризацию митохондрий (Б) и увеличивает удержание кальция митохондриями.

Позже было показано, что митохондрии экспрессируют белки комплекса кальциевого канала NMDA рецептора, и формируют рецепторно-канальный комплекс, функционально ему идентичный. Причём, направленная экспрессия NR1-NR2a субъединиц NMDA-рецепторного комплекса увеличивает внутримитохондриальный кальций и защищает нейрональные клетки от глутаматной токсичности [178].

Эти данные могут быть теоретическим обоснованием перспективности и реализуемости направления поиска мультитаргетных лекарственных препаратов, механизм действия которых связан одновременно с воздействием на митохондриальные кальций-зависимые функции и глутаматные рецепторы нейронов и обеспечивает улучшение когнитивных функций и нейропротекторный эффект, соответственно. Эти предположения были далее исследованы при создании новых когнитивных стимуляторов в ряду лигандов NMDA- и AMPA-глутаматных рецепторов.

4.3.2. Митохондрии как мишень нейропротекторного эффекта в ряду биоизостерных аналогов МК801.

Значительное количество производных 1,2,4-тиадиазолов и изотиомочевин со свойствами лигандов как NMDA так и AMPA-глутаматных рецепторов было синтезировано в ИФАВ РАН. Это соединения, содержащие функциональную группировку модельного AMPАкина циклотиазида и, соответственно, потенциально способные проявить свойства активатора AMPA-подтипа глутаматных рецепторов и «прямые раскрытые» аналоги МК-801 и, соответственно, потенциальные ингибиторы ионных каналов NMDA-подтипа глутаматных рецепторов. С целью поиска мультитаргетных препаратов, обладающих когнитивно-стимулирующими свойствами благодаря взаимодействию с глутаматными рецепторами, и нейропротекторными свойствами не только как ингибиторы NMDA-подтипа глутаматных рецепторов, способные предотвращать эксайтотоксичность, но

и благодаря предотвращению митохондриального этапа каскада клеточной гибели, эти производные также исследовались в тестах для выявления потенциальных ингибиторов МП.

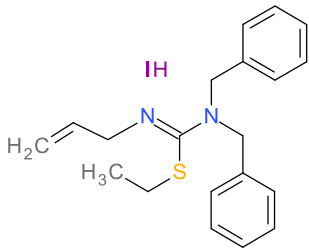
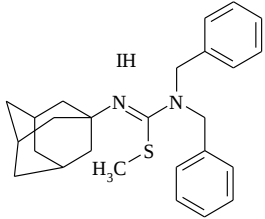
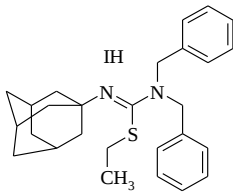
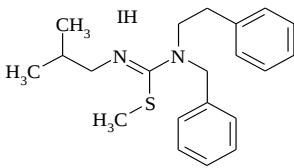
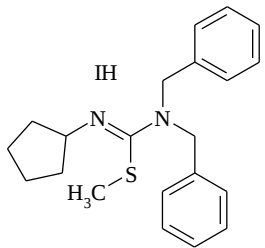
Первичный скрининг этих соединений проводился, прежде всего, по их способности влиять на глутамат-индуцированный захват кальция препаратами синапсомальных P2 фракций мышей. В дальнейшем оценивали влияние соединений-лидеров на активность двух типов глутаматных рецепторов (AMPA и NMDA), поведенческие характеристики. Параллельно нами проводилась оценка влияния этих соединений на характеристики митохондрий: митохондриальный потенциал, кальций-индуцированное «набухание» митохондрий как показатель открытия пор МП (табл.2).

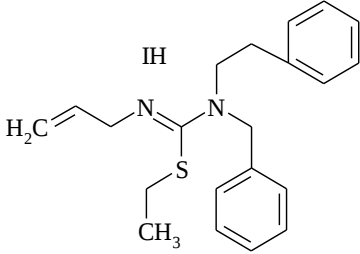
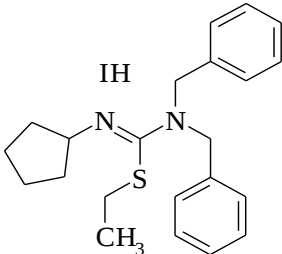
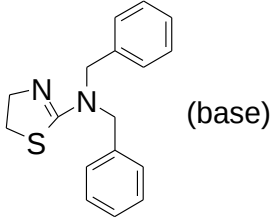
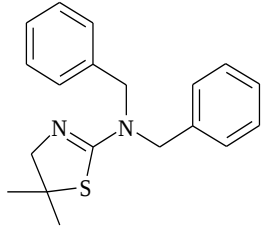
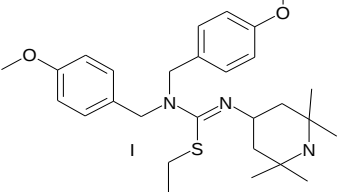
4.3.3. Изотиомочевины

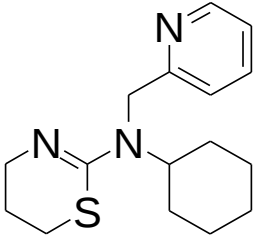
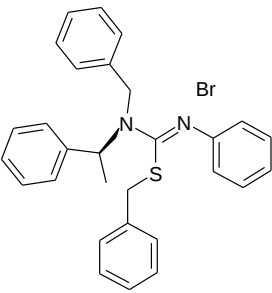
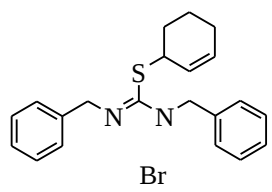
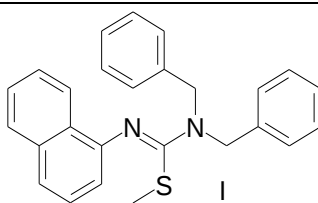
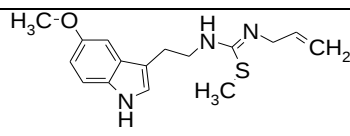
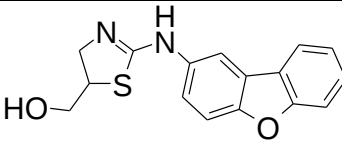
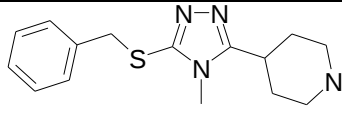
В ряду синтезированных в ИФАВ РАН производных изотиомочевин практически все соединения, проявившие способность снижать кальций-вызванное «набухание» митохондрий, вызывают деполяризацию митохондрий (Таблица 2).

Деполяризация может быть связана с потенциальной токсичностью соединения в связи с ингибированием комплексов дыхательной цепи митохондрий или значительным разобщающим эффектом, но с другой стороны, слабый разобщающий эффект и связанное с этим снижение захвата кальция митохондриями может быть и основой нейропротекторного эффекта [226]. Для соединений, выделенных нашим коллективом исследователей в качестве лидеров по результатам *in vitro* и *in vivo* исследований, была проведена более детальная оценка взаимодействия с митохондриями

Таблица 2 Результаты первичного скрининга производных изотиомочевин

№	Код, IP	Структура	Глутамат-стимулированный захват Ca^{2+} P2 фракцией мозга мышей, IC_{50} , μM	Деполаризация митохондрий EC_{50} , μM	Ca^{2+} -индуцированное «набухание» митохондрий IC_{50} , μM
1	5051	 3-allyl-1,1-dibenzyl-2-ethyl-isothioureahydroiodide	37,2	30 μM	10 $\pm$ 4
2	9242*		19,1	7,5 μM	7,5 $\pm$ 2,8
3	9243*		74,1	7,5 μM	7,8 $\pm$ 1,6
4	9261		30,2	$\geq 100\mu\text{M}$	$\geq 100\mu\text{M}$
5	9267*		24,0	$\geq 100\mu\text{M}$	$\geq 100\mu\text{M}$

№	Код, IP	Структура	Глутамат-стимулированный захват Ca^{2+} P2 фракцией мозга мышей, IC_{50} , μM	Деполаризация митохондрий EC_{50} , μM	Ca^{2+} -индуцированное «набухание» митохондрий IC_{50} , μM
6	9268*		19,1	$\approx 35\mu\text{M}$ вызывает "набухание»	$\geq 50\mu\text{M}$
7	9269*		22,4	$\approx 35\mu\text{M}$ вызывает "набухание»	$\geq 50\mu\text{M}$
8	9276	 (base)	Не влияет	Не влияет	Не влияет
9	9306		Не влияет	$\geq 75\mu\text{M}$	$\geq 100\mu\text{M}$
10	9304		Не влияет	$\geq 75\mu\text{M}$	вызывает слабое "набухание»

№	Код, IP	Структура	Глутамат-стимулированный захват Ca^{2+} P2 фракцией мозга мышей, IC_{50} , μM	Деполаризация митохондрий EC_{50} , μM	Ca^{2+} -индуцированное «набухание» митохондрий IC_{50} , μM
11	9281		Не влияет	Не влияет	Не влияет
12	9111 + SAFR		Не влияет	$\geq 100 \mu\text{M}$	$\approx 25 \pm 8$
13	9040		Не влияет	Не влияет	Не влияет
14	5096		Не влияет	$\geq 100 \mu\text{M}$	$\geq 100 \mu\text{M}$
15	9260		Не влияет	Не влияет	$\geq 100 \mu\text{M}$
16	9249		Не влияет	Не влияет	$\geq 100 \mu\text{M}$
17	9305		Не влияет	Не влияет	Не влияет

NT-1505 проявил когнитивно-стимулирующие свойства, благодаря наличию как NMDA-рецептор блокирующего, так и AMPA-активирующего влияния, был лишён побочного психогенического эффекта, характерного для МК801, и проявляющегося в стереотипичном поведении, атаксии и гиперактивности [196, 227, 228]:

- Анти-NMDA активность *in vivo* ($ED_{50} \approx 10 \text{ мг/кг}$)
- Стимуляция КК(AMPA)–вызванных токов ($ED_{300} \approx 20 \text{ }\mu\text{M}$)
- Когнитивно-стимулирующая активность в модели холиэргической (AF64A) амнезии ($ED_{50} \approx 0.5 \text{ мг/кг}$)
- Отсутствие характерных для МК-801 психотомиметических эффектов
- Низкая острая токсичность ($LD_{50} \approx 1100 \text{ мг/кг}$)
- Высокий “теоретический” терапевтический индекс ($K > 2000$)

Кроме того, соединение обладало низкой острой токсичностью ($LD_{50} > 1 \text{ мг/кг}$). В скрининговых тестах на митохондриях печени по влиянию веществ на МП (набухание митохондрий) это вещество проявляет значительный протекторный эффект (более 50% ингибирования) в концентрациях выше $10 \text{ }\mu\text{M}$, однако также это вещество вызывает деполяризацию митохондрий, не развивающуюся во времени и концентрационно-зависимо снижает способность митохондрий накапливать ионы кальция (Рисунок 25А,Б,В), а при оценке влияния на активность дыхательной цепи митохондрий обнаружено почти двухкратное увеличение скорости дыхания в отсутствии АДФ (в состоянии 4) и снижение дыхательного контроля в присутствии субстратов комплекса 1 (с $5,38 \pm 0,23$ в контрольных пробах, до $1,25 \pm 0,19$ в пробах с $30 \text{ }\mu\text{M}$ NT-1505).

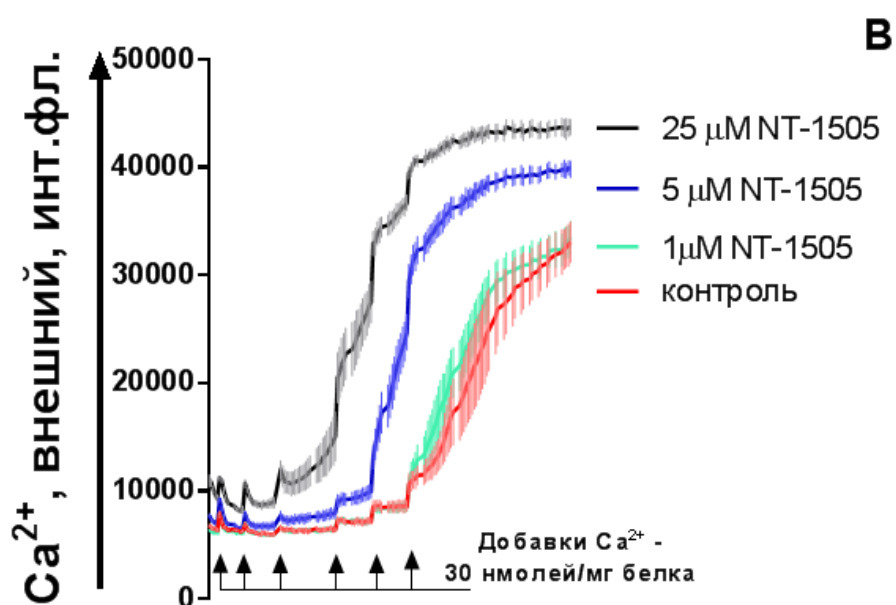
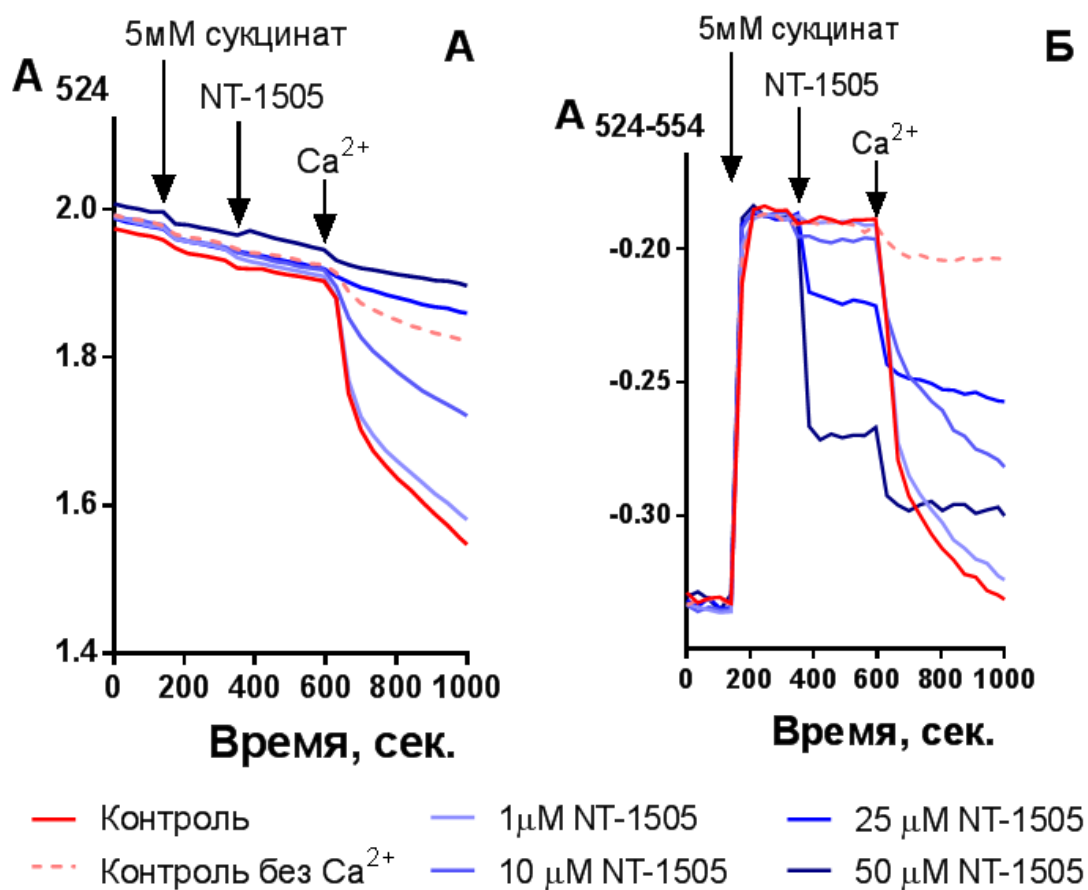


Рисунок 25 Влияние NT-1505 на кальций-индуцированное «набухание» (А) и сукцинат-поддерживаемый потенциал (Б) митохондрий печени крыс и на кальциевую ёмкость (В) митохондрий мозга крыс

Это позволяет предполагать разобщающий эффект соединения. Нужно отметить, что при исследовании влияния NT-1505 на микровязкость мембран синапсом мышей после его *in vivo* введения в течении 15 дней наблюдается изменение структуры, перестройка прибелковых областей мембран без изменения липидной фазы [229]. В то же время, коллегами было показано, что соединение NT-1505 не влияет на состояние липидов мембран эндоплазматического ретикулума после *in vivo* введения препарата [230]. Поэтому можно предположить, что разобщающий эффект NT-1505 не связан с нарушениями (изменениями) текучести липидной фазы мембран, и является результатом взаимодействия с белками митохондриальной мембраны, возможно с разобщающими белками или с митохондриальными аналогами субъединиц NMDA-подтипа глутаматных рецепторов. Таким образом, соединение не является ингибитором поры МП, но предотвращает открытие пор МП благодаря снижению митохондриального потенциала и соответствующего захвата кальция митохондриями. Вопрос о конкретных молекулярных мишенях и механизмах взаимодействия этого вещества с митохондриями остаётся открытым.

Таким образом, соединение-лидер, обладающее как когнитивно-стимулирующим, так и нейропротекторным эффектами способно повышать устойчивость митохондрий к индукции процесса МП, предотвращая вход кальция в митохондрии, что может быть одним из механизмов его нейропротекторного эффекта.

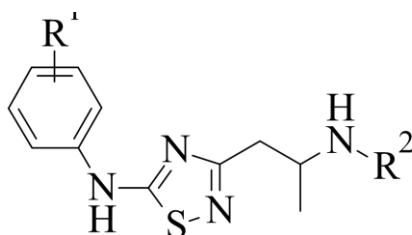
4.3.4. *Производные [1,2,4]-тиадиазола*

С целью поиска эффективных стимуляторов когнитивных функций в ИФАВ РАН была разработана стратегия направленного синтеза принципиально новой группы соединений в ряду производных [1,2,4]-тиадиазола, которые, являясь биоизостерными аналогами модельного

«ампакина» циклотиазида могут являться позитивными модуляторами АМРА-рецепторов [231].

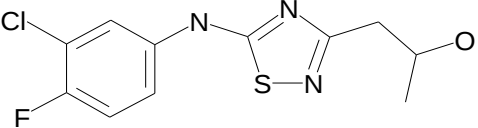
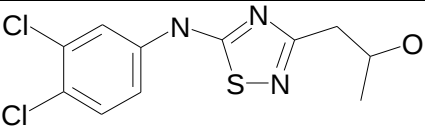
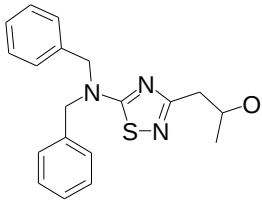
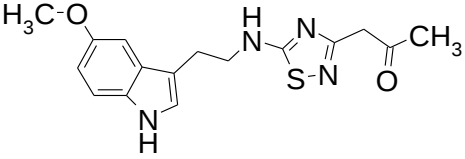
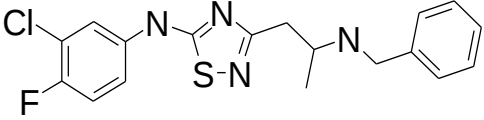
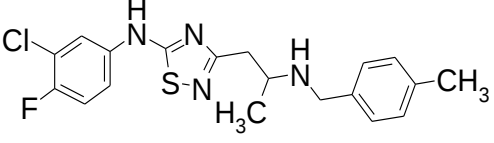
В последнее время показана значительная перспективность производных 1,2,4-тиадиазола в качестве возможных препаратов для предупреждения и лечения нейродегенеративных заболеваний, например, болезни Альцгеймера [232] благодаря взаимодействию и с другими, важными для патогенеза НЗ мишенями. Так, описана способность этих соединений модулировать активность гамма-секретазы - основного фермента, продуцирующего токсическую форму β -амилоида, препятствовать агрегации β -амилоида и образованию сенильных бляшек, , ингибировать накопление синуклеина. В ряду производных 1,2,4-тиадиазола выявлены эффективные ингибиторы киназы гликоген-синтазы 3 β (КГС-3 β), препарат тидеглусиб (Tideglusib) исследовался на II стадии клинических испытаний для лечения болезни Альцгеймера и сейчас проходит испытания как препарат для лечения миотонической дистонии (ЕР 2609918 А1 20130703). КГС-3 β вовлечена в патогенез целого ряда заболеваний, в том числе и нейродегенеративных. Именно она обуславливает появление гиперфосфорилированных форм тау-белка и нарушение функционирования системы микротрубочек, участвует в регуляции глутаматных рецепторов и митохондриальных функций, в частности процесса МП, в нейроне [233]. Таким образом, производные 1,2,4-тиадиазола, несомненно, являются перспективными для создания новых инновационных мультитаргетных препаратов для коррекции широкого спектра когнитивных расстройств нейродегенеративного типа.

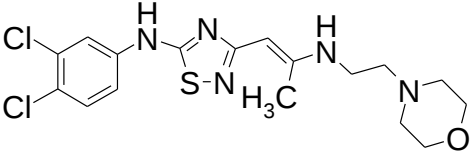
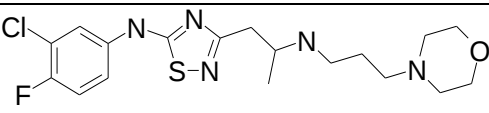
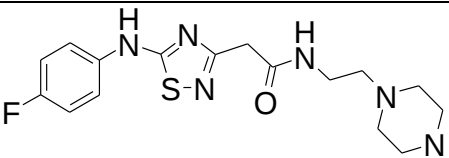
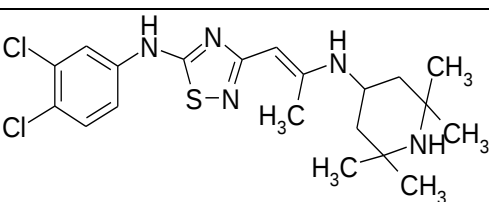
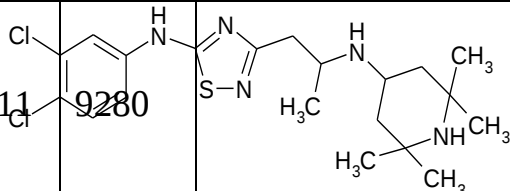
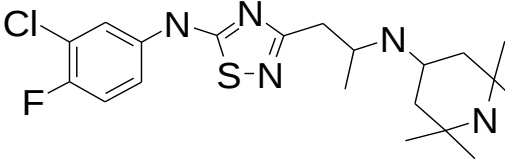
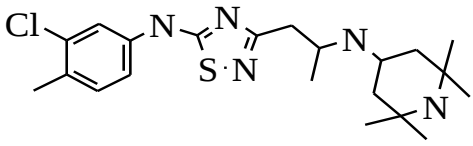
Был синтезирован ряд тиadiaзолов общей формулы

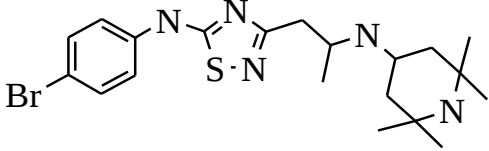


и проведен первичный скрининг как на модели глутамат-зависимого захвата кальция синапсом, так и на митохондриальных тестах: оценка митохондриальной токсичности соединений и способности увеличивать устойчивость митохондрий к кальций-индуцированному открытию пор МП (табл.3).

Таблица 3 Результаты первичного скрининга производных тиадиазолов

№	Код, IP	Структура	$\Delta\varphi_{\text{mito}}$ EC ₅₀ , μM	Ca ²⁺ - вызванное «набухание» митохондрий IC ₅₀ , μM
1	9302		Не влияет	Не влияет
2	9303	 MW = 304,20	$\geq 50, \mu\text{M}$	Не влияет
3	9314		Не влияет	Не влияет
4	9255		Не влияет	Не влияет
5	9191		$\geq 75\mu\text{M}$	вызывает набухание
6	9223		≥ 100 μM	вызывает набухание

№	Код, IP	Структура	$\Delta\Phi_{\text{mito}}$ $EC_{50}, \mu\text{M}$	Ca^{2+} - вызванное «набухание» митохондрий $IC_{50}, \mu\text{M}$
7	9279		$\geq 50 \mu\text{M}$	вызывает набухание
8	9307		Не влияет	$\geq 100 \mu\text{M}$
9	9300		Не влияет	23 ± 8
10	9278		$\geq 50 \mu\text{M}$	вызывает набухание
9280	11 9280		$\geq 100 \mu\text{M}$	51 $\pm$ 304,6+17,7
12	9287		$\geq 75 \mu\text{M}$	вызывает набухание
13	9311		Не влияет	14 ± 7
14	9298		Не влияет	13 ± 5

№	Код, IP	Структура	$\Delta\Phi_{\text{mito}}$ EC ₅₀ , μM	Ca ²⁺ - вызванное «набухание» митохондрий IC ₅₀ , μM
				

В экспериментах по определению влияния этих соединений на Fe³⁺-индуцированное перекисное окисление липидов в гомогенате мозга крыс не выявлено значительной антиоксидантной активности – при 30 мкМ ингибирование не превышает 20%.

Соединения-лидеры по митохондриальным тестам, которые можно охарактеризовать как ингибиторы МП, не вызывающие деполяризации митохондрий – IP-9298, IP-9311 и IP-9300.

Учитывая также влияние на активность NMDA-подтипа глутаматных рецепторов для дальнейшей разработки было выбрано соединение IP-9311. Показано, что до 80 мкМ концентрации соединение IP-9311 как в присутствии субстратов комплекса I (глутамат-малат), так и в присутствии ингибитора комплекса I ротенона и субстрата комплекса II сукцината не вызывает деполяризации митохондрий (Рисунок 26А и Б). В то же время, это соединение эффективно подавляет кальций-вызванное открытие пор МП, снижая степень и скорость «набухания» митохондрий, причём этот эффект наблюдается как для митохондрий печени крыс (Рисунок 26Б), так и для митохондрий мозга крыс (Рисунок 27А) и сопровождается увеличением кальциевой ёмкости митохондрий (Рисунок 26В и Рисунок 27Б), что позволяет предположить вклад мито-направленного эффекта как в

нейропротекторный эффект соединения, так и в его когнитивно-стимулирующий эффект.

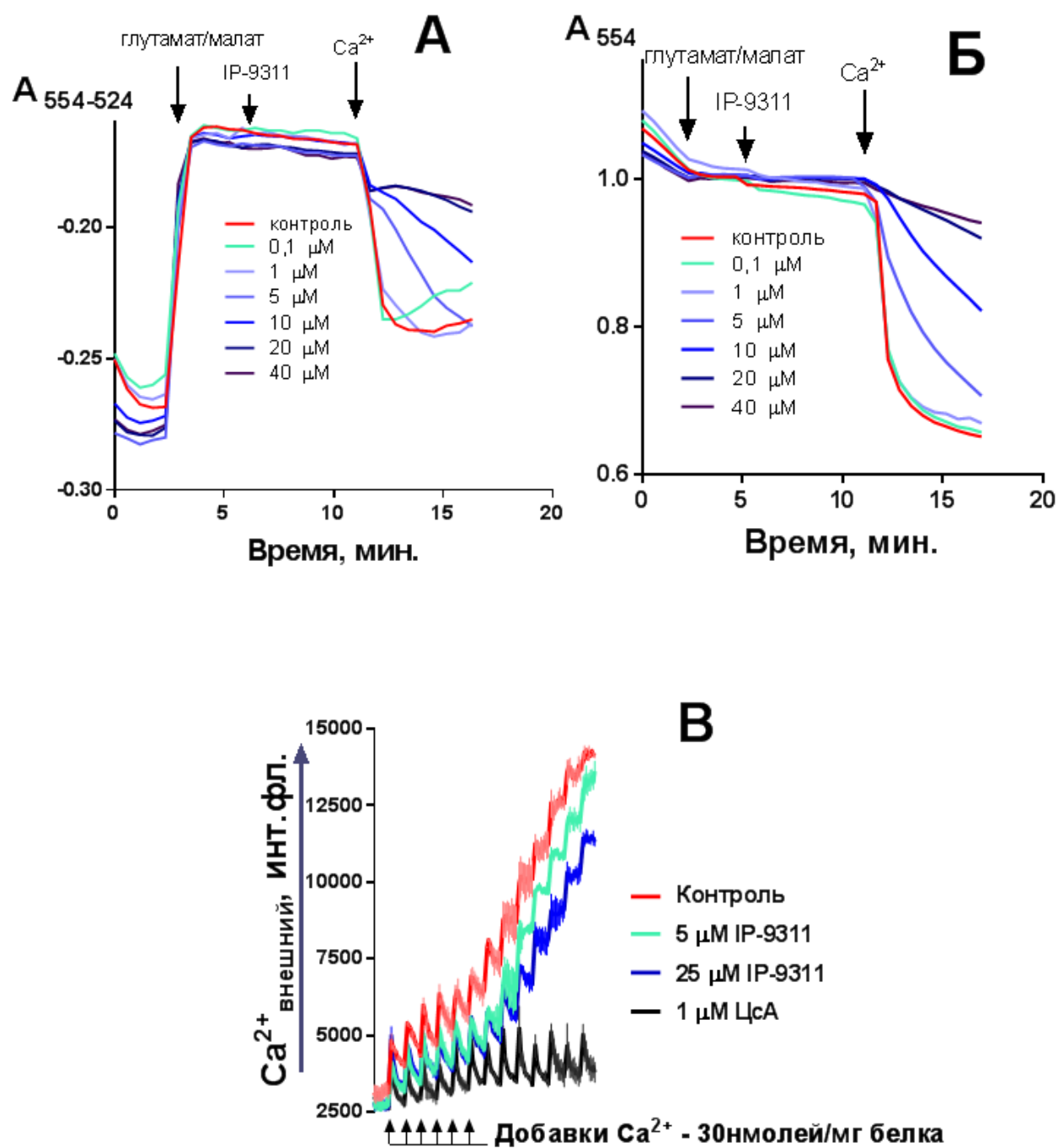


Рисунок 26 Влияние IP-9311 на глутамат/малат-поддерживаемый потенциал (А), кальций-индуцированное «набухание» (Б) и кальцевую ёмкость (В) митохондрий печени крыс

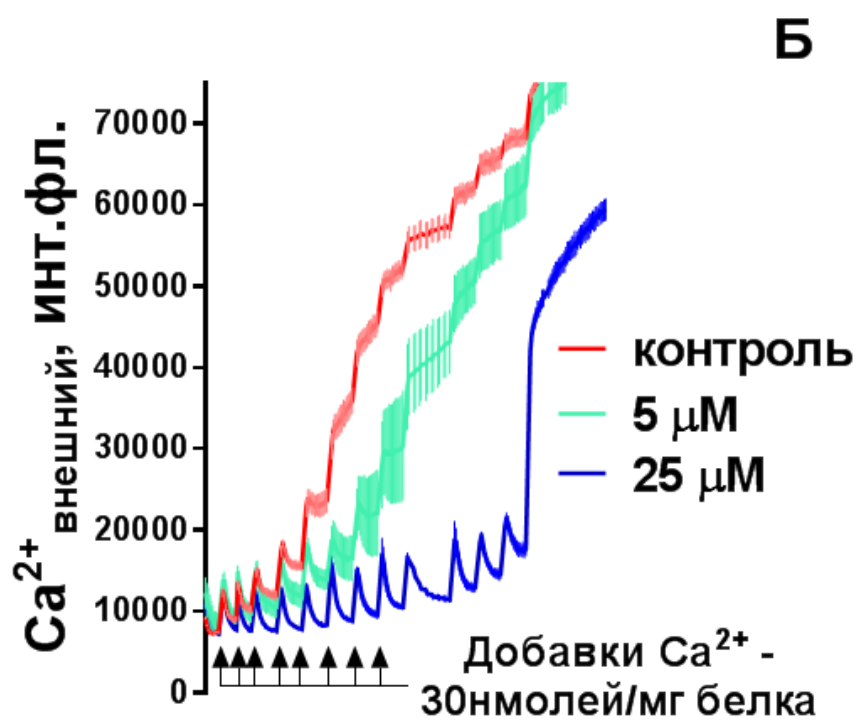
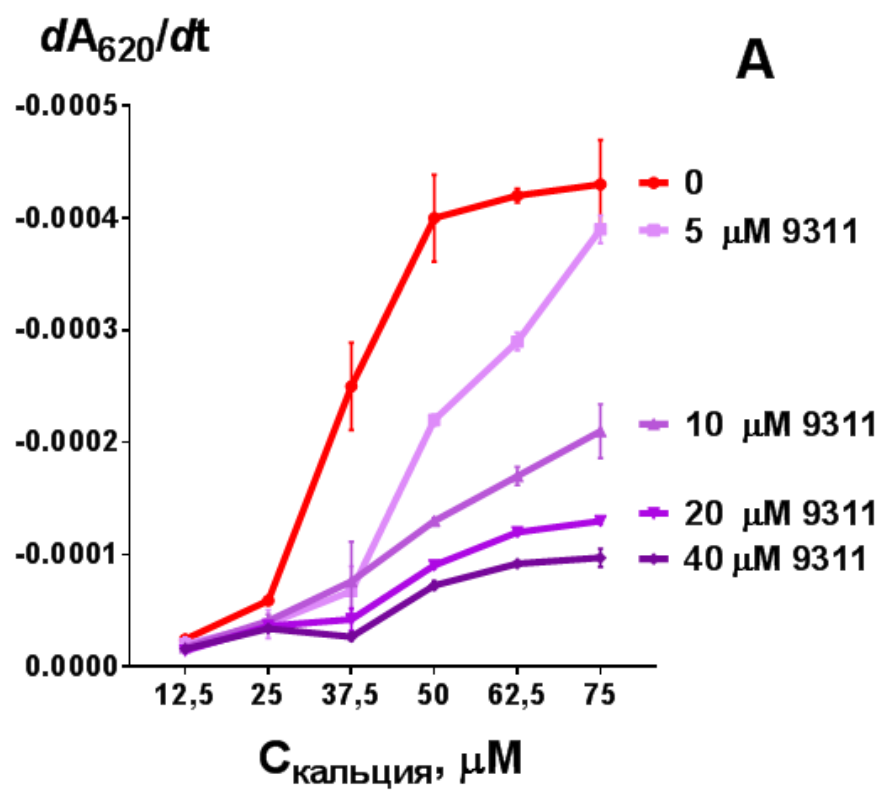


Рисунок 27 Влияние IP-9311 на кальций-индуцированное «набухание» (А) и кальцевую ёмкость (Б) митохондрий мозга крыс

4.4. Алломаргаритарин – триптаминовое производное секуринина как потенциальный нейропротектор.

Одним из наиболее привлекательных направлений создания лекарственных средств является разработка аналогов эндогенных регуляторов мишени. Для МП в настоящее время известен ряд эндогенных соединений и условий как потенцирующих открытие поры, так и способных снизить вероятность её открытия. И в этом плане значительный интерес представляют производные биогенных индолов – триптамина, мелатонина, N-ацетилсеротонина, серотонина и т.д. большая часть этих соединений обладает нейротропной активностью и поэтому представляет интерес при создании новых лекарственных препаратов, в том числе и обладающих нейропротекторной активностью.

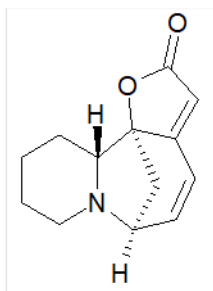
Гормон эпифиза мелатонин и его предшественник N-ацетилсеротонин (NAS), помимо рецептор-обусловленного гормонального эффекта, являются антиоксидантами и, специфически накапливаясь в митохондриях, действуют как стимуляторы активности дыхательной цепи митохондрий, ингибируют процесс МП и обладают значительным нейропротекторным потенциалом. Но в некоторых условиях, и в зависимости от локализации и концентраций могут проявлять прооксидантную активность, а концентрационная зависимость подавления открытия пор МП имеет колоколообразную форму [130, 234-236]. Такая неоднозначность действия мелатонина и в большей степени NAS, немонотонная зависимость от концентрации и условий индукции МП связана и достаточно хорошо согласуется с гипотезой о том, что эти соединения обладают мультимодальными возможностями [237] и играют особую роль как эндогенные и локальные регуляторы процесса МП и, соответственно, жизнеспособности нейронов.

Именно это обусловило наш особый интерес к синтезированному в лаборатории природных соединений ИФАВ РАН конъюгату природного алкалоида секуринина (СКР) с триптамином. - алломаргаритарину (АМ), эписмеру минорного природного алкалоида маргаритарина (Рисунок 28)

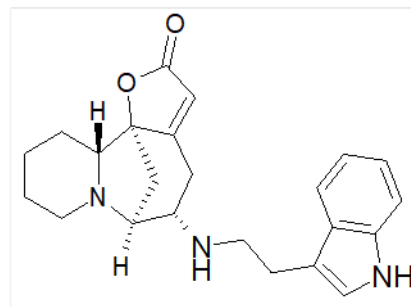


Securinega suffruticosa (Pall.) Rehd

(Pall.) Rehd



Секуринин



Алломаргаритарин

Рисунок 28 Общая формула алкалоида секуринина, использованного для создания конъюгата и его триптаминового производного алломаргаритарина.

Секурининовые алкалоиды, выделенные из растений близких родов *Securinega*, *Margaritaria*, *Phyllanthus*, представляют собой группу гетероциклических соединений с широким спектром биологической активности. Наиболее известен алкалоид секуринин, представляющий собой молекулу с жестко закрепленной структурой. В 1953 году секуринин был выделен из *Securinega suffruticosa* В. И. Муравьевой и А. И. Баньковским как первый представитель этого семейства алкалоидов. Секуринин применялся в России и Китае как analeptическое лекарственное средство по характеру действия близкое к стрихнину, менее активное, но и менее токсичное (в 8—10 раз) и, таким образом обладающее большей терапевтической широтой. В то же время, как и стрихнин, секуринин способен вызывать судорожную активность. В электрофизиологических экспериментах было показано, что секуринин блокирует эффект ГАМК. Секуринин, ингибируя связывание ^3H -ГАМК с мембранами нейронов крыс, не влияет на бикукулин-нечувствительное связывание ГАМК с ГАМК_B-рецепторами, связывание

лигандов с бензодиазепиновыми рецепторами, М-холинорецепторами, β -адренорецепторами. Это позволило предположить, что секуринин является селективным антагонистом ГАМК_A рецепторов [238]. В клинике секуринин применялся при астенических состояниях, парезах и параличах, возникших после перенесённых инфекционных и других заболеваний, при гипо- и астенической форме неврастении. Есть клинические данные о перспективности использования секуринина при лечении бокового амиотрофического склероза [239]. Кроме того, есть данные, что секуринин проявляет нейропротекторный эффект при хроническом введении β A (25-35) и усиливает обучаемость и память, потенцируя долговременную потенциацию [240, 241]. Также показан его нейропротекторный эффект на клеточной модели хореи Гентингтона, что связано с ингибированием дисульфидизомеразы [242], и противовоспалительный и нейропротекторный эффекты на клеточной модели болезни Паркинсона [243].

В совместной работе в рамках скрининга антиоксидантной активности конъюгатов СКР с биогенными аминами, такая активность выявлена для АМ [244]. Это соединение обладает, в отличие от секуринина, способностью снижать Fe^{3+} - и тБГП-вызванное перекисное окисление липидов в гомогенатах мозга крыс, показана его восстановительная или электрон-донорная активность (с помощью CUPRAC-теста), способность хелатировать ионы Fe^{2+} .

Важно, что АМ также способен ингибировать активность 1-липоксигеназы – фермента синтеза оксилипинов, относящегося к классу железосодержащих оксигеназ и катализирующих окисление полиненасыщенных жирных кислот с образованием гидроперекисей, что также может вносить свой вклад в антиоксидантный потенциал АМ. 1-липоксигеназа широко используется как биохимическая *in vitro* модель при поиске фармакологически активных соединений в связи со значительным сходством с липоксигеназами человека по субстратной специфичности и характеристикам ингибирования [245]. Постмортем в мозге больных

болезнью Альцгеймера найдено повышенное содержание 5-липоксигеназы. Оверэкспрессия этого фермента ведёт к повышению генной и белковой экспрессии γ -секретазы и повышенному уровню β -амилоидного пептида, а также повышению образования нейрофибриллярных пучков, в то время как ингибиторы 5-липоксигеназы вызывают снижение гиперфосфорилирования тау-белка [246]. Первичный скрининг по поиску потенциальных нейропротекторов в ряду конъюгатов СКР с биогенными аминами на основе способности подавлять кальций-вызванное открытие пор МП проводился в соответствии с методикой, описанной в патенте [198].

Алломаргаритарин, не влияя на мембранный потенциал митохондрий, активность и состояние дыхательной цепи митохондрий, снижает кальций-вызванную деполяризацию (Рисунок 29А), и кальций-вызванное «набухание» как изолированных митохондрий печени крыс (Рисунок 29Б), так и изолированных митохондрий мозга крыс (Рисунок 29В), причём IC_{50} не отличается значительно для митохондрий из этих двух органов. Таким образом, можно утверждать, что это соединение обладает способностью увеличивать устойчивость митохондрий к индукции процесса МП [247]. В то же время, секуринин не проявляет антиоксидантной активности и способности подавлять кальций-индуцированное открытие пор МП, а триптамин обладает незначительной антиоксидантной активностью ($IC_{50} = 0,84$ мМ) и также не проявляет свойств ингибитора МП [248].

Ранее нами было впервые показано, что β -амилоид способен вызывать индукцию МП [10] и позже наши данные были подтверждены значительным количеством исследований, выявлен ряд митохондриальных мишеней, показано, что наиболее токсичны для клеток именно внутриклеточные олигомерные формы β -амилоида, а митохондриальная мембрана может быть местом образования нейротоксичных форм этого пептида [249].

Алломаргаритарин эффективно снижает развитие «набухания» митохондрий в суспензии изолированных митохондрий мозга крыс,

потенцированное также и β -амилоидом (25-35), в том числе и в присутствии подпороговых концентраций кальция (Рисунок 29Г).

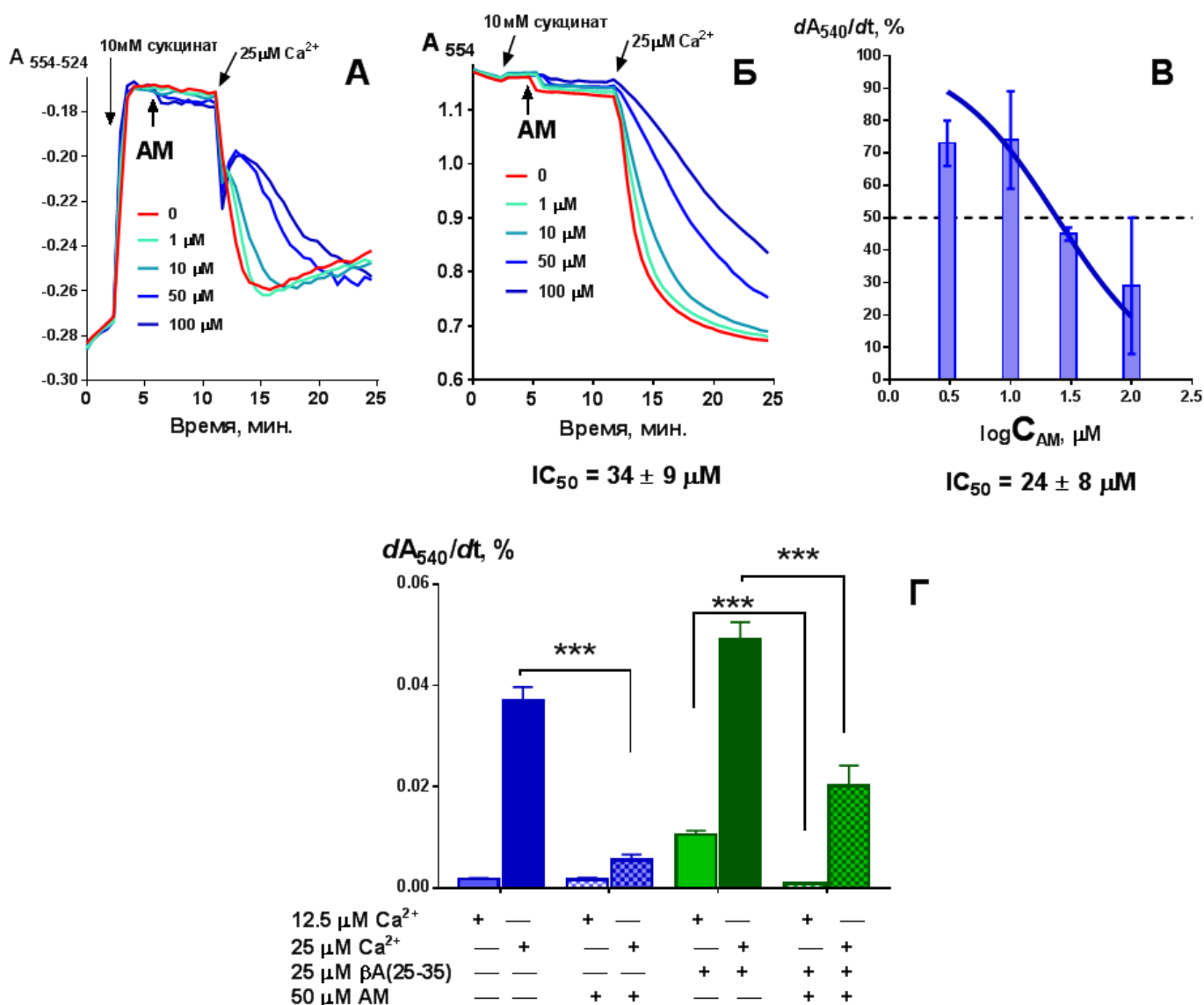


Рисунок 29 Влияние Алломаргаритарина на: А - мембранный потенциал митохондрий печени крыс, Б - «набухание» митохондрий печени крыс, вызванное 25 μM Ca^{2+} , В - максимальную скорость вызванного 25 μM Ca^{2+} «набухания» митохондрий мозга крыс, Г - «набухание» митохондрий мозга крыс, вызванное $\beta\text{A}(25-35)$. Достоверность отличий оценивали по критерию Манна-Уитни, *** - $p < 0.0001$

Нейропротекторный потенциал Алломаргаритарина (но не СКР) был подтверждён и на клеточных моделях нейродегенерации. Прежде всего,

учитывая не только способность АМ подавлять открытие пор МП, но и антиоксидантный потенциал, это вызванная Fe^{3+} гибель нейронов первичной культуры коры мозга крыс, связанная с окислительным стрессом и ферроптозом. Также исследовали способность алломаргаритарина защищать нейроны первичной культуры коры мозга крыс от β -амилоидной токсичности и гранулярные нейроны первичной культуры мозжечка от эксайтотоксичности, в механизмах гибели нейронов при которой ключевую роль играют митохондрии. На всех вышеперечисленных клеточных моделях нейродегенерации алломаргаритарин проявил нейропротекторные свойства (Рисунок 30), практически полностью подавляя цитотоксичный эффект соответствующего нейротоксина.

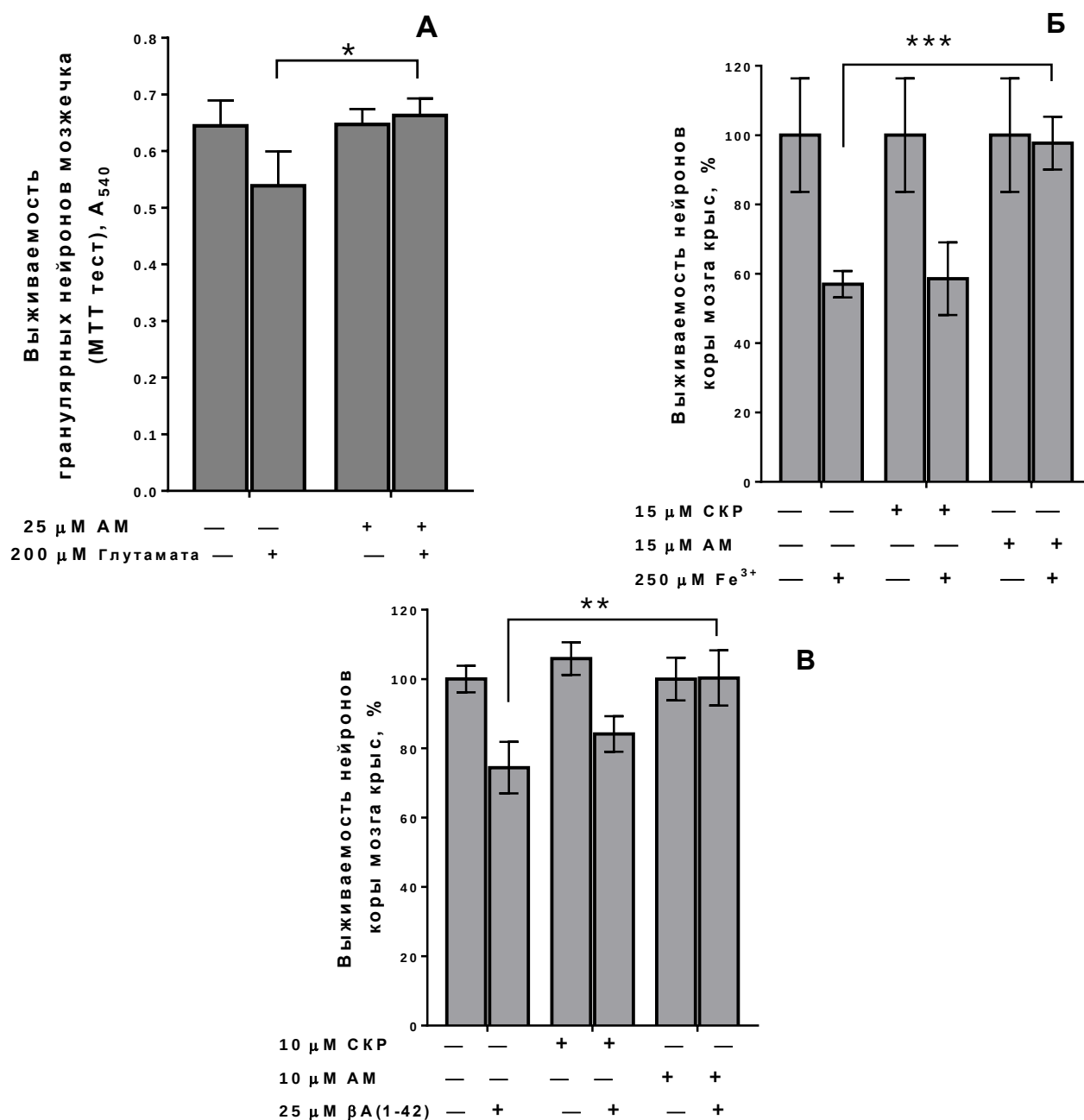
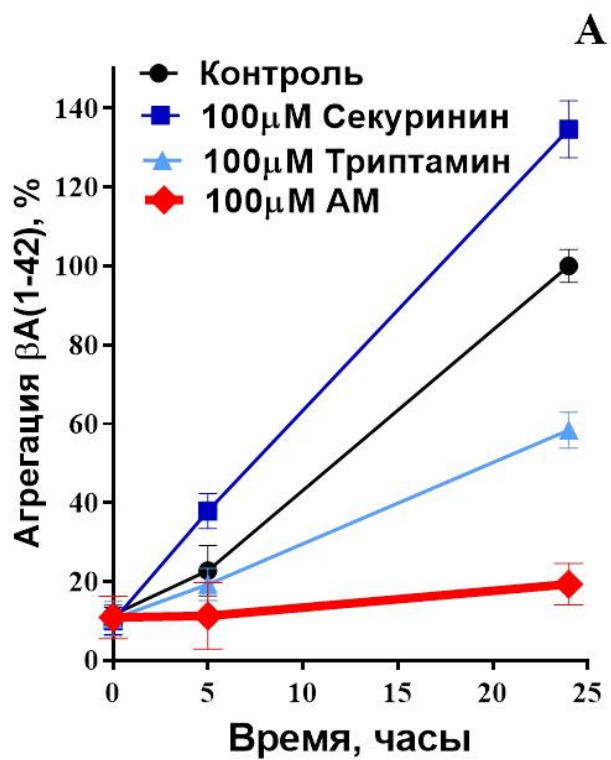
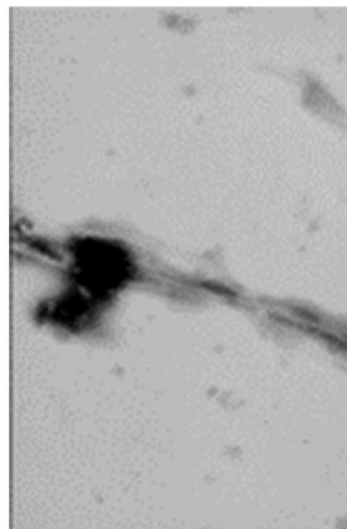


Рисунок 30 Нейро(cito)протекторная активность Алломаргаритарина в условиях клеточных моделей нейродегенерации: А – эксайтотоксичность на первичной культуре гранулярных нейронов мозжечка крыс; Б – окислительный стресс, ферроптоз на первичной культуре нейронов коры мозга крыс; В – β -амилоидная токсичность на первичной культуре нейронов коры мозга крыс. Достоверность отличий оценивали по критерию Манна-Уитни, * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.001$, *** - $p < 0.0001$

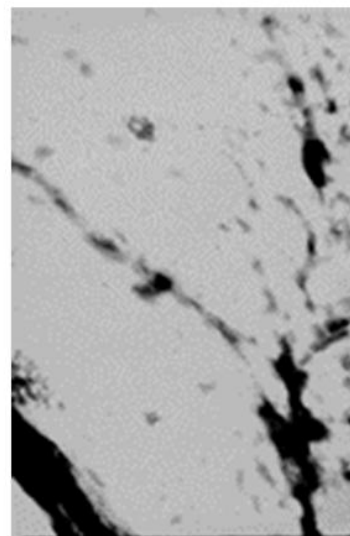
Индольные производные, такие как мелатонин, N-ацетилсеротонин, триптофол, серотонин, ингибируют фибрилlogenез и дестабилизируют агрегаты β -амилоида [250]. Отчасти, этот эффект, как и дестабилизация агрегатов могут быть связаны с их антиоксидантной активностью [251]. Исходя из этого, можно предполагать наличие антиагрегационных свойств и у триптаминового производного секуринина - алломаргаритарина. Для исследования влияния алломаргаритарина на агрегацию β -амилоида (1-42) был использован флуоресцентный зонд тиофлавин Т, который избирательно взаимодействует с амилоидными фибриллами, образуя при этом интенсивно флуоресцирующий комплекс, с последующим контролем образующихся структур электронной микроскопией. В контрольных пробах с β -амилоидом (1-42) наблюдается рост флуоресценции ТфТ и образование в условиях нашего эксперимента амилоидных фибрилл подтверждается электронной микроскопией (Рисунок 31А-В). Как и ожидалось, сам триптамиин снижает ТфТ-зависимую флуоресценцию, а секуринин даже проявляет тенденцию к усилению ТфТ-зависимой флуоресценции (Рисунок 31А). В то же время, алломаргаритарин значительно эффективнее по сравнению с триптамиином и концентрационно-зависимо подавляет нарастание флуоресценции ТфТ (Рисунок 31Б), что свидетельствует о снижении образования амилоидных фибрилл но не предотвращает образование олигомерных и/или аморфных форм агрегатов β -амилоида, что выявляется данными электронной микроскопии (Рисунок 31Г).



В



Д



Г

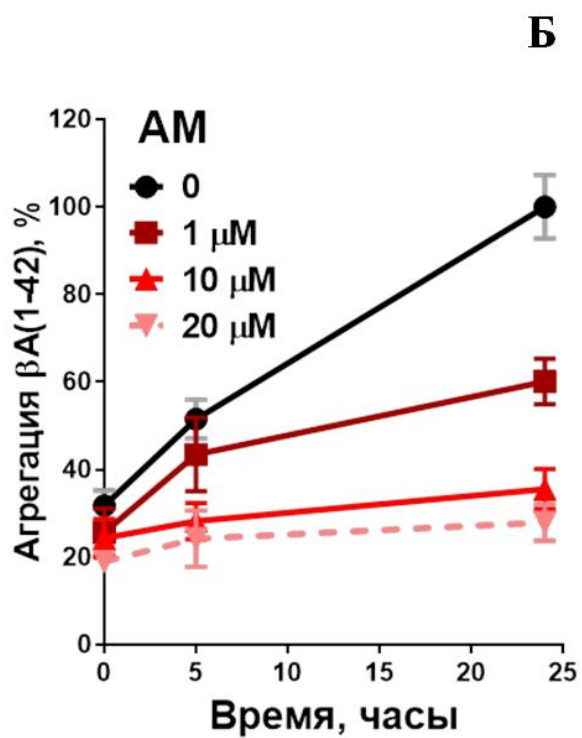
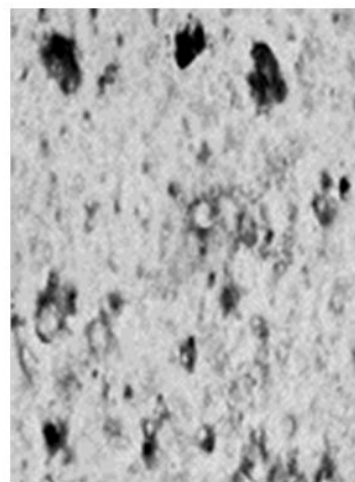


Рисунок 31 Влияние на агрегацию β -амилоидного пептида (1-42): А – секуринина, триптамина и алломаргаритарина в концентрациях 100 μ M, Б – разных концентраций алломаргаритарина. За 100% принимали

флуоресценцию ТфТ в контрольной пробе после 24 часов инкубации, 0% - флуоресценция проб без β -амилоидного пептида (1-42). Электронная микроскопия проб после 24-часовой инкубации (метод негативного контрастирования, $\times 10000$): В и Д – контрольные пробы β -амилоидного пептида (1-42), Г – пробы в присутствии 20 μ M алломаргаритарина.

Нежелательный побочный эффект секуринина – его значительная просудорожная активность, что связано со способностью ингибировать ГАМКА-рецептор. Ранее было показано, что секуринин в малых концентрациях (10-100 нМ) увеличивает вызванные ГАМК токи в клетках Пуркинье мозжечка, а в больших (1-10 мкМ) – блокирует их. Алломаргаритарин, в отличие от секуринина, снижает амплитуду ГАМК-вызванных токов даже в более широком диапазоне концентраций 0,1 - 10 мкМ [252]. Поэтому мы прежде всего проверили возможность просудорожной активности алломаргаритарина.

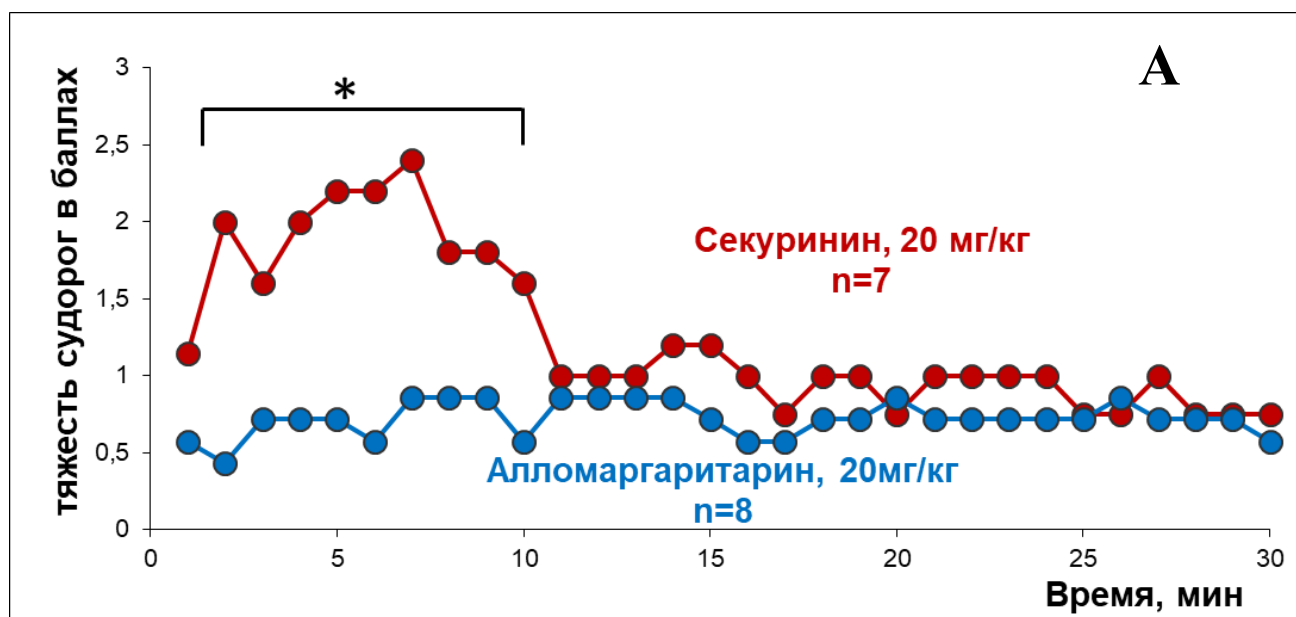
Секуринин при введении в дозах 20 мг/кг и 30 мг/кг вызывал развитие судорог вплоть до 4 - 5 стадиям по 5-балльной шкале Мареша (ко 2 минуте после введения – у 5 мышей из 7 при 20 мг/кг и у 7 из 7 при 30 мг/кг). В то же время, алломаргаритарин в этих же дозах не вызвал судорог ни у одного животного (Рисунок 32А). Не было зафиксировано не только судорожного эффекта, но даже каких-либо изменений в состоянии и поведении животных и в день введения, и в последующие две недели наблюдения.

Следующий поставленный вопрос был: может ли алломаргаритарин предотвращать или ослаблять развитие судорог? Изменение энергетических процессов в митохондриях нейронов является одной из причин инициации и самоподдержания эпилептического статуса, при судорожных припадках стремительно возрастает скорость окислительного метаболизма [253, 254]. В работе Zhang Y [255] показано увеличение содержания и окисления сукцината в мозге крыс после вызванного литий-пилокарпином или каиновой кислотой эписатуса. Это коррелирует с интенсивностью окислительного стресса, увеличенной продукцией супероксидрадикала, митофагией и нейрональной дегенерацией. Ингибитор сукцинатдегидрогеназы

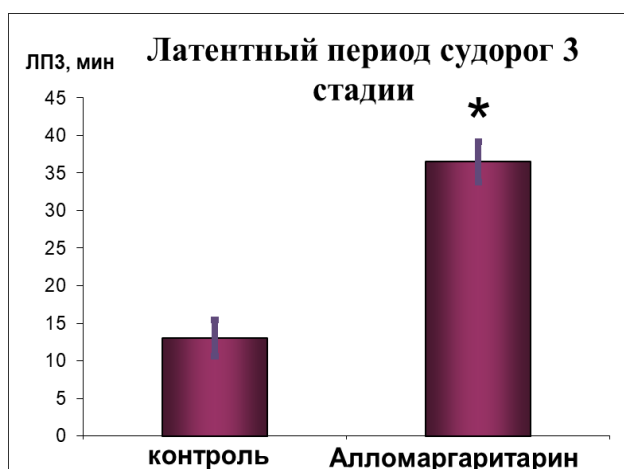
способствовал снижению окислительного стресса и ослаблению судорожной активности. Нами также было показано ранее [256], что у крыс при значительной судорожной активности в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии (более 3 стадии) достоверно повышена уязвимость митохондрий мозга к индукции МП: снижена пороговая концентрация кальция, вызывающая деполяризацию митохондрий и Ca^{2+} -ёмкость митохондрий. В свою очередь это может быть не только причиной нейродегенеративных последствий, но и обуславливать нарастающую частоту, длительность и тяжесть судорог в связи с неконтролируемым ростом цитозольной концентрации кальция в нейронах. И в этих условиях, ингибиторы пор МП могут ослабить судорожную активность – снизить скорость их нарастания и предотвратить нейродегенеративные последствия. Именно со способностью увеличивать устойчивость митохондрий к индукции открытия пор МП связывают и противосудорожную активность кетоновых тел и специфического лиганда циклофилина Д – аналога циклоспорина А NIM811 [257]. Кроме того, для используемых в настоящее время противосудорожных препаратов важной проблемой является их митохондриальная токсичность [258]. Поэтому поиск соединений, обладающих способностью снижать судорожную активность и одновременно обладать мито- и нейропротекторной активностью – крайне привлекательная задача.

Алломаргаритарин в наших экспериментах [259] снижал тяжесть эпилептического статуса в литий-пилокарпиновой модели, достоверно и почти втрое увеличивая латентный период развития судорожной активности при однократном внутрибрюшинном введении в дозе 20 мг/кг за 15 минут до введения пилокарпина (Рисунок 32Б). У контрольной группы латентный период 3 стадии составил $13,0 \pm 2,4$ мин, то у группы с введением алломаргаритарина - $34,8 \pm 3,3$ мин ($267,9 \pm 25,5$ % от контроля, Mann-Whitney U Test, $p < 0,05$). Центральное внутривенное введение АМ при индукции судорожной активности пилокарпином, достоверно снизило

длительность судорог 3 стадии у мышей опытной группы по сравнению с животными контрольной группы (Рисунок 32 В).



Б



В

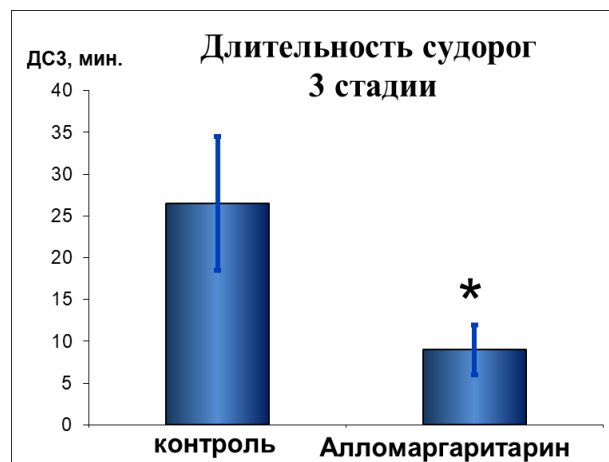


Рисунок 32 Влияние секуринина и алломаргаритарина на спонтанный эпилептогенез (А) и ослабление тяжести судорожного состояния алломаргаритаринном в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии: Б - АМ увеличивает латентный период судорог 3 стадии (ЛПЗ); В – АМ снижает длительность судорог 3 стадии. Секуринин и алломаргаритарин вводили однократно, внутривенно в дозе 20мг/кг, контрольным животным вводили тот же объем растворителя (физиологический раствор-ДМСО)

Полученные данные на клеточных моделях нейродегенерации и в экспериментах *in vivo* показывают перспективность дальнейшего развития направления по созданию новых производных секурининовых алкалоидов с модификацией присоединением производных индола (триптамина и его производных) как мультитаргетных препаратов для лечения заболеваний, связанных с развитием судорожного синдрома и нейродегенеративных заболеваний.

4.5.Бифармакофорные мультитаргетные препараты

Небольшое число имеющихся в настоящее время лекарств для лечения БА оказывает влияние на смягчение последствий дегенеративных изменений в мозге, а именно, снижение памяти и угасание когнитивных (познавательных) функций, но не на сам процесс нейродегенерации. Однако кроме задачи компенсации снижения памяти и когнитивных функций необходимо решить и задачу прерывания или хотя бы замедления процессов нейродегенерации - нарастающей гибели нейронов и утраты ими функциональной активности. Одним из наиболее перспективных путей решения этой проблемы является создание новых лекарственных мультитаргетных препаратов, сочетающих в своей структуре различные фармакофоры и способных оказывать комплексное воздействие на направленный выбор биомолекул, способных обеспечить когнитивно-стимулирующий (симптоматический), нейропротекторный и молекулно-модифицирующий эффекты [260]. Создание единой химической молекулы, способной одновременно влиять на множественные патогенетические звенья заболевания, имеет дополнительные преимущества по сравнению с комбинациями лекарственных средств как с точки зрения оптимального ADMEТ-профиля, так и в плане снижения риска нежелательных эффектов от взаимодействий отдельных лекарственных компонентов.

В ИФАВ РАН был разработан синтетический алгоритм конъюгирования нескольких фармакофорных лигандов, синтезированы гибридные структуры и проведен масштабный скрининг по предложенной актуальной для лечения НЗ системе скрининга, основанной на направленном выборе биомишеней. Это мишени, связанные с компенсацией когнитивных функций – холинэстеразы и подтипы глутаматных рецепторов, с нейропротекторным эффектом – митохондрии, особенно процесс МП, болезнь-модифицирующим действием – тау-заместительный эффект стабилизации микротрубочек и АХЭ-обусловленное потенцирование агрегации амилоида [261]. Работа увенчалась успехом - были выделены несколько рядов гибридных соединений, представители которых обладали различным набором положительных для потенциальных лекарственных препаратов активностей [262].

Среди синтезированных гибридных соединений были как гетеробивалентные, так и гомобивалентные. Гетеробивалентные препараты, где предположительно каждый фармакофор связывается с различными клинически значимыми мишенями, с высокой степенью вероятности будет, по меньшей мере, бифункциональным. Можно предположить, что такая комбинированная терапия с одной молекулой вызывает аддитивные или синергетические эффекты, которые улучшают терапевтическую эффективность. Примером может быть и представленный ранее конъюгат секуринина и триптамина.

Но и использование гомобивалентных молекул, в которых каждая половина гибрида имеет идентичные свойства связывания, также является очень полезным и многообещающим подходом к повышению эффективности лекарственных средств: посредством оптимизации битопического взаимодействия аллостерического и ортостерического связывания с мишенями [263]; как благодаря возможности более эффективно взаимодействовать с димерными формами рецепторов, ферментов или с различными подтипами таких мишеней [264-266]. Удвоение фармакофоров

может также и расширить спектр фармакологической активности за пределы суммы активностей фармакофора, что, впрочем, справедливо и для гетеробивалентных соединений.

Кроме того, особенно перспективно может быть создание гомобивалентных потенциальных лекарственных препаратов на основе мультитаргетного лиганда, что позволяет помимо перечисленных выше механизмов увеличения эффективности воздействия на индивидуальную мишень воздействовать на комплекс мишеней с уже доказанной терапевтической пользой.

Такая работа по синтезу и скринингу биологической активности бинарных соединений аминоадамантанов и бинарных соединений γ -карболинов была проведена (Рисунок 33).

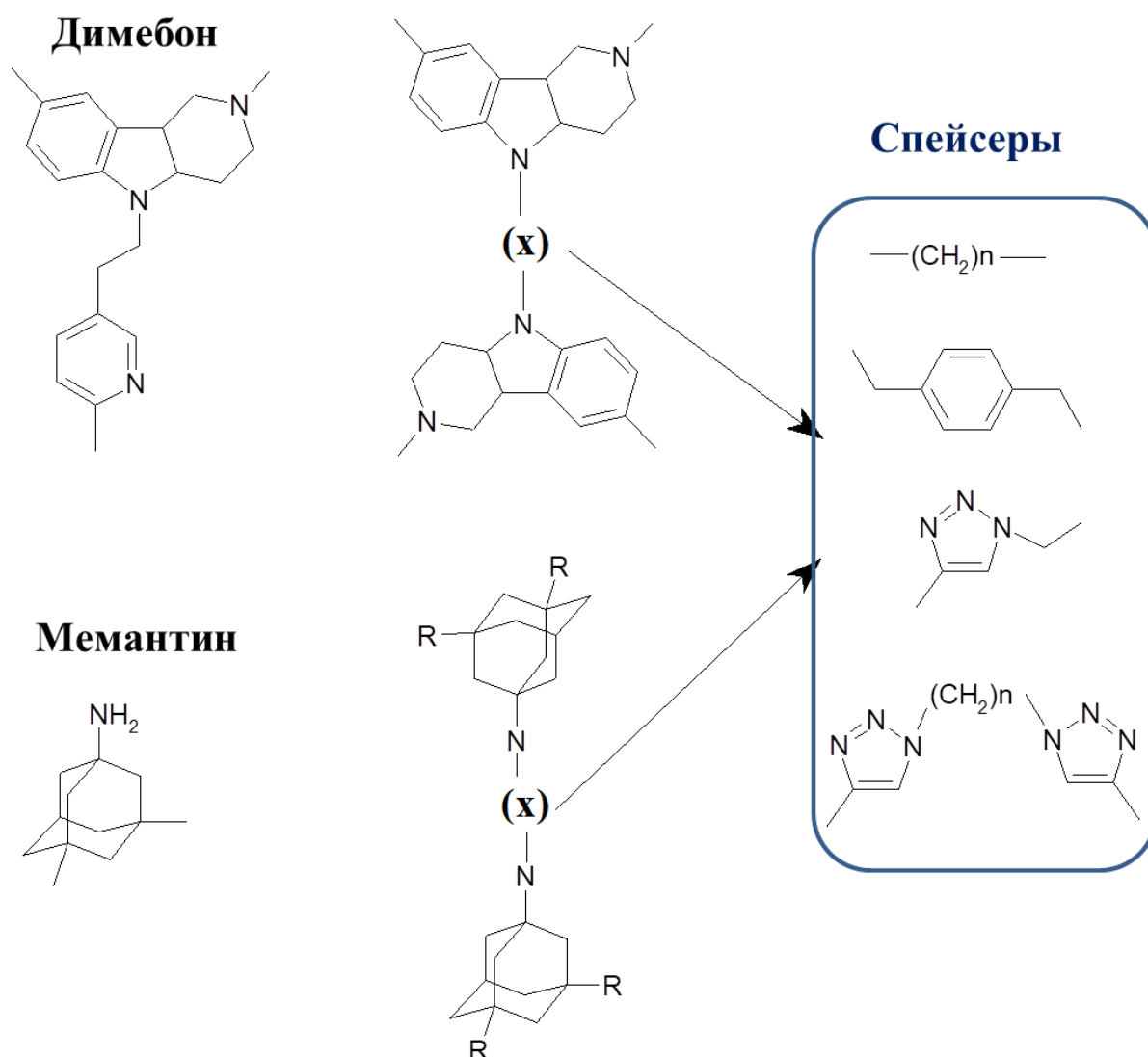


Рисунок 33 Создание гомобивалентных конъюгатов гамма-карболинов и аминоксадамантанов.

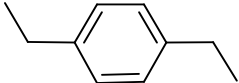
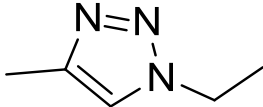
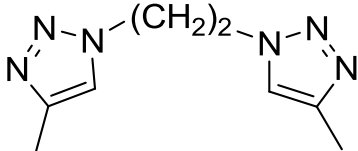
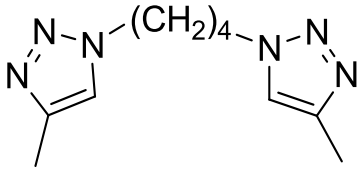
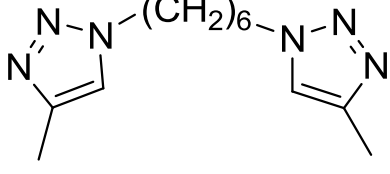
4.5.1. Бис-гамма-карболины

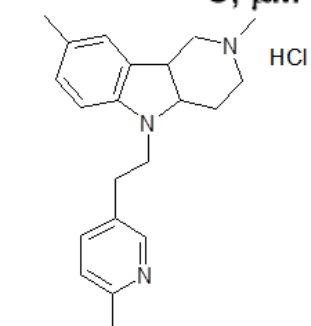
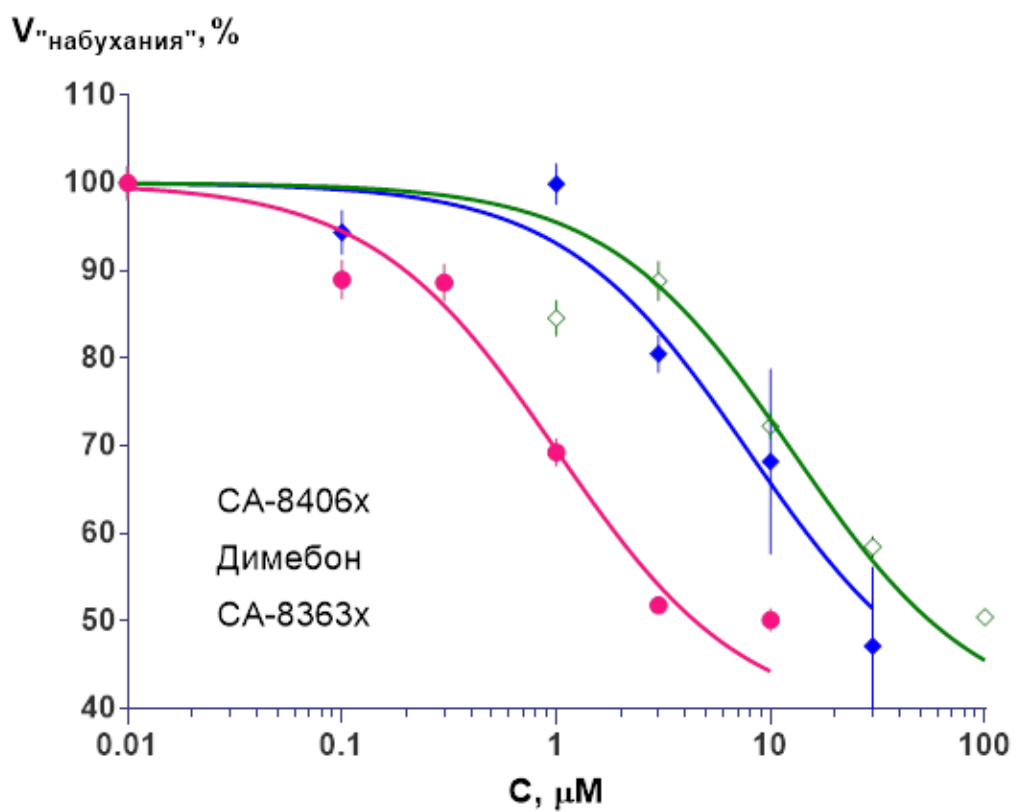
Прежде всего было проведено исследование новых аналогов димебона - бис-гамма-карболинов со спейсерами различного строения (табл. 4) как новых потенциальных препаратов для лечения БА с целью расширения спектра биологической активности и улучшения фармакологических свойств исходного прототипа - Димебона. [267, 268], Результаты первичного скрининга показали наличие зависящей от структуры спейсера равной или большей по сравнению с Димебоном ингибирующей активности по отношению к ацетил- и бутирилхолинэстеразам при отсутствии влияния на активность карбоксилэстеразы, что было показано коллегами из лаборатории молекулярной токсикологии ИФАВ РАН. Кроме того, мы показали, что эти соединения проявили антиоксидантную активность – предотвращая Fe^{2+} -вызванное ПОЛ в гомогенате мозга крыс. Способность предотвращать ПОЛ наиболее выражена у конъюгатов с триазольным и бистриазольным спейсером (табл. 4), которые, в отличие от Димебона, и конъюгатов с алкиленовым и фенилендиалкиленовым спейсерами обладают выраженными радикал-связывающими свойствами [269].

Конъюгаты с алкиленовым и фенилендиалкиленовым спейсерами, практически не проявляющие радикал-связывающей активности, всё же в значительно большей степени по сравнению с Димебоном предотвращают как Fe^{2+} -вызванное, так и спонтанное ПОЛ.

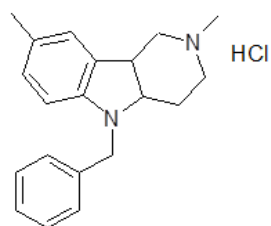
В то же время, именно эти производные обладают способностью ингибировать Ca^{2+} -вызванное «набухание» митохондрий печени (табл. 4) и мозга (Рисунок 34) крыс, но не влияют на мембранный потенциал митохондрий печени и мозга крыс.

Таблица 4 Результаты первичного скрининга бис-У-карболинов

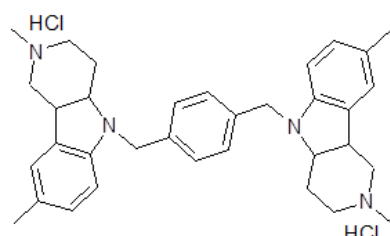
Спейсер	Ингибирование Fe ²⁺ -вызванного ПОЛ в гомогенате мозга крыс IC ₅₀ , μM	Ингибирование Ca ²⁺ -вызванного «набухания» митохондрий печени крыс IC ₅₀ , μM
-(CH ₂) ₃ -	25.9 ± 8.4	24.3 ± 7.6
-(CH ₂) ₄ -	≥30	5.8 ± 1.2
-(CH ₂) ₅ -	9.9 ± 2.0	23.5 ± 8.1
-(CH ₂) ₆ -	14.3 ± 4.8	15.9 ± 5.5
	23.1 ± 11.1	2.4 ± 0.9
	13.0 ± 3.1	8.9 ± 2.2
	3.0 ± 0.5 ^a	Не ингибирует
	3.1 ± 0.6 ^a	Не ингибирует
	2.8 ± 0.6 ^a	Не ингибирует
Димебон	>100	37 ± 17.5



Димебон



CA-8363x



CA-8406x

Рисунок 34 Влияние Димебона и его гомобивалентных аналогов на кальций-индуцированное «набухание» митохондрий мозга крыс

Для соединений-лидеров этой группы по результатам первичного скрининга показано также, что их МП подавляющая способность связана с увеличением кальцевой ёмкости митохондрий (Рисунок 35А и Б). Нейропротекторный эффект был подтверждён на клеточной модели кальцевого стресса в присутствии кальцевого ионофора иономицина (Рисунок 35В).

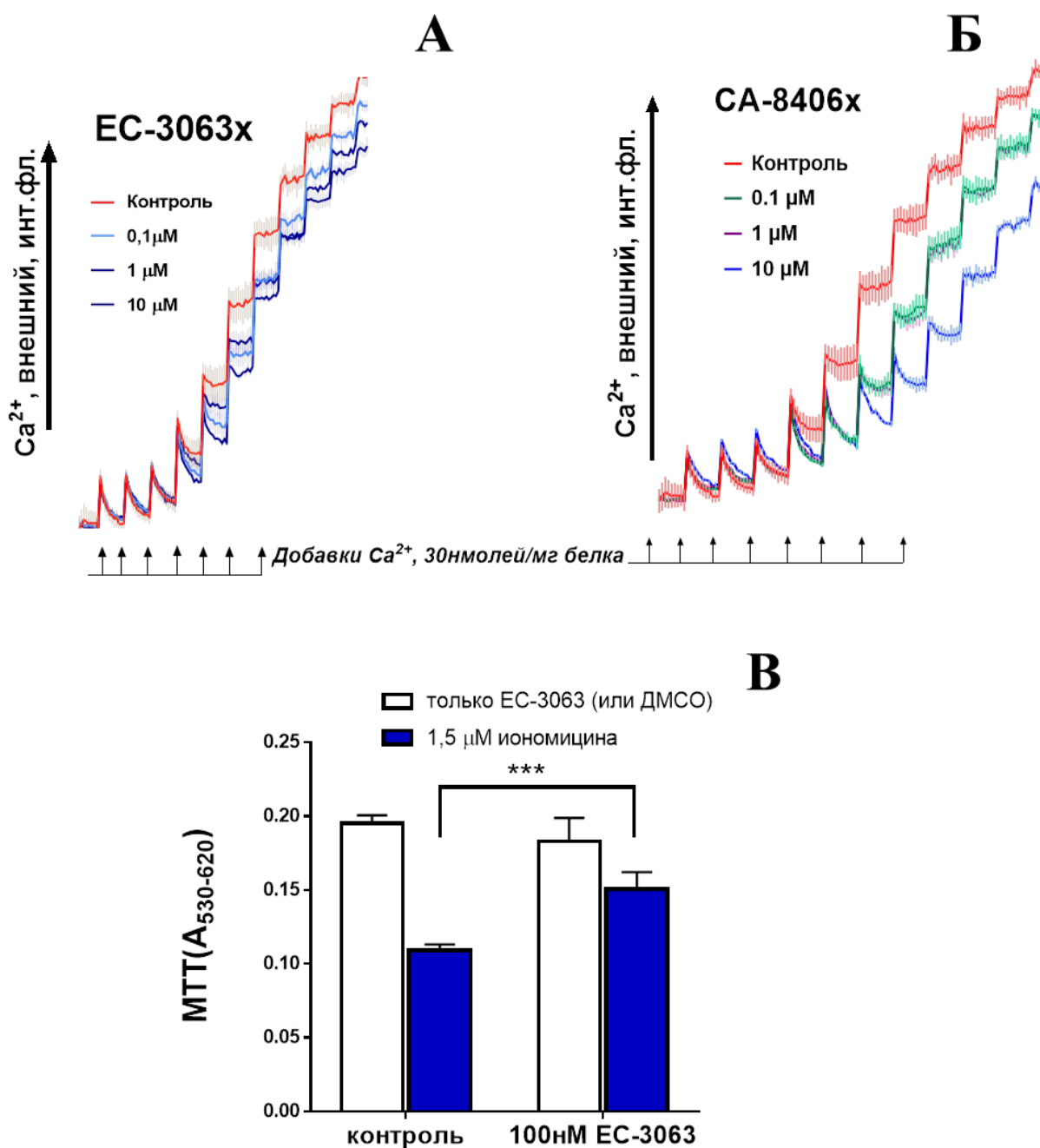


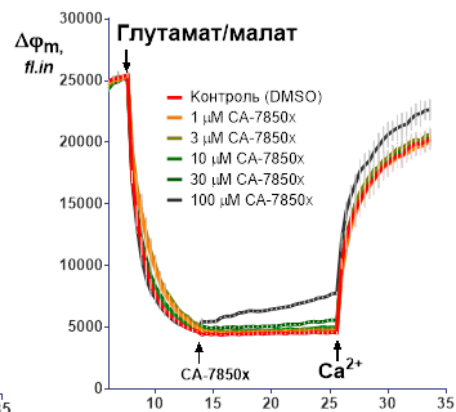
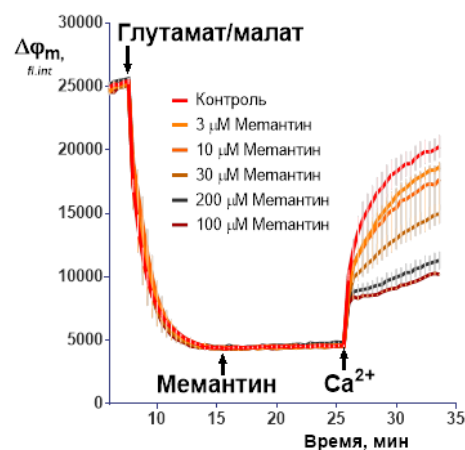
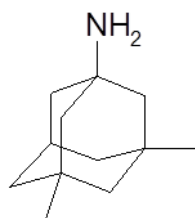
Рисунок 35 Влияние Димебона и его гомобивалентных аналогов на: А и Б – на кальцевую ёмкость митохондрий мозга крыс; В – выживаемость первичных нейронов коры мозга крыс в условиях кальцевого стресса (в присутствии 1,5 μ М иономицина)

Дальнейшие исследования на клеточных и *in vivo* моделях нейродегенерации проводятся в настоящее время.

4.5.2. Бис-аминоадамантаны

В ряду гомобивалентных производных аминоадамантанов не удалось найти соединений, превосходящих мемантин по способности подавлять открытие пор МП. Соединение-лидер по способности вытеснять специфический внутриканальный ингибитор НМДА-подтипа глутаматного рецептора - СА-7850х не только не отличается от мемантина, но и вызывает деполяризацию митохондрий, в большей степени выраженную при энергизации митохондрий сукцинатом в присутствии ингибитора комплекса 1 ротенона (Рисунок 36).

Мемантин



CA-7850x

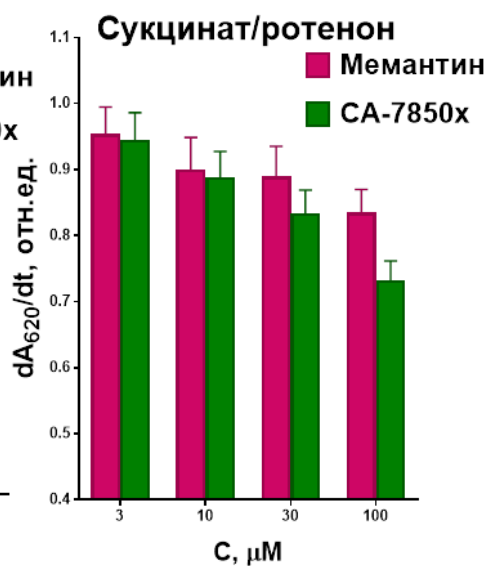
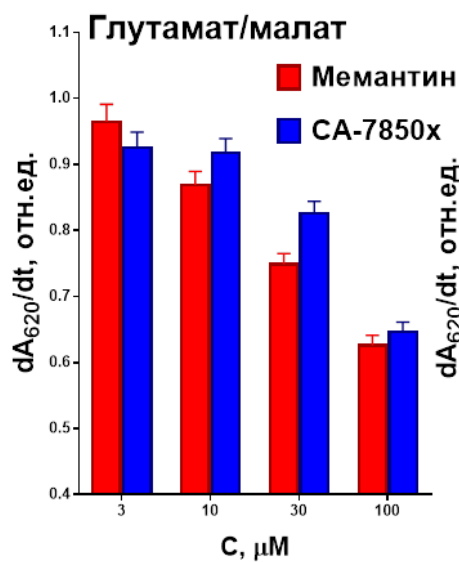
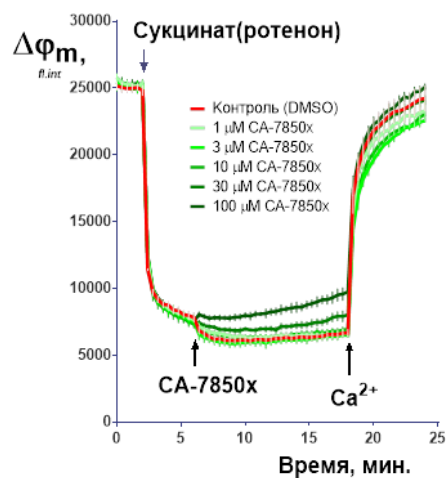
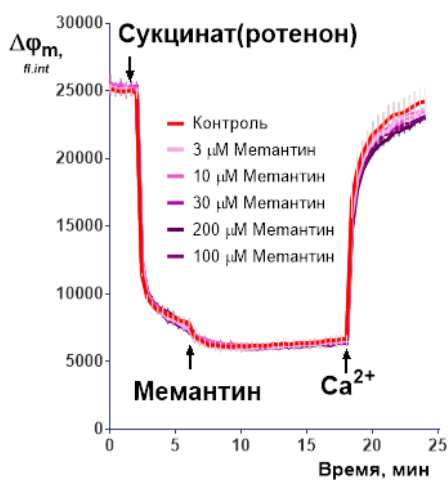
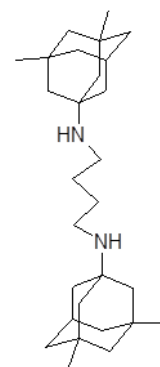


Рисунок 36 Влияние на мембранный потенциал в присутствии глутамата/малата (А,Б) или сукцината/ротенона (В,Г) мемантина (А, В) и СА-

7850х (Б, Г), и вызванное 25 μM Ca^{2+} «набухание» (Д,Е) митохондрий мозга крыс

Для этого соединения были проведены пилотные эксперименты по поведенческому тестированию. В тесте пассивного избегания была выявлена тенденция к улучшению кратковременной памяти наивных мышей и нейропротекторному эффекту веществ в условиях нарушения пространственной памяти скополамином при введении мышам мемантина и СА-7850х в дозе 5 мг/кг. Мемантин и СА-7850х в исследуемой дозе не оказывают эффектов на двигательную активность, уровень тревожности и ориентировочно-исследовательское поведение мышей в тесте открытое поле.

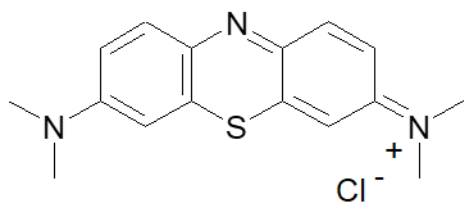
Как и для мемантина *in vivo* в тесте кондиционирования страха при одновременном введении этого соединения со скополамином непосредственно перед сессией переучивания, показано ускорение процесса угашения памяти об аверсивном событии. Однако учитывая наши и литературные данные о возможности амнестического действия мемантина, мы не можем не учитывать возможности проявления этого эффекта. В то же время, наблюдаемая тенденция снижения амнестического эффекта скополамина при совместном введении с СА-7850х или мемантином перед сессией обучения в тесте контекстного кондиционирования страха и увеличение количества обучившихся мышей в тесте пассивного избегания позволяет предположить положительное влияние на память этого соединения. Для подтверждения этого предположения и предположения о стимуляции процесса угашения аверсивного следа памяти необходимо проведение дальнейших исследований.

4.5.3. *Конъюгаты производных МС и индолов, включая гамма-карболины*

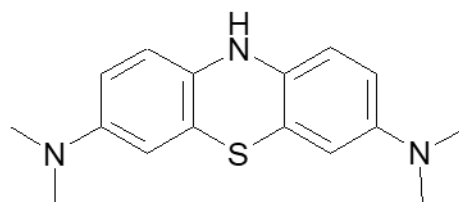
Также было создано несколько перспективных рядов гетеробивалентных комплексов. Один из таких рядов - конъюгаты,

содержащие как фармакофор производные ряда индолов, и как второй фармакофор – метиленовый синий (МС), соединение с уникально богатым нейпротекторным потенциалом (Рисунок 37).

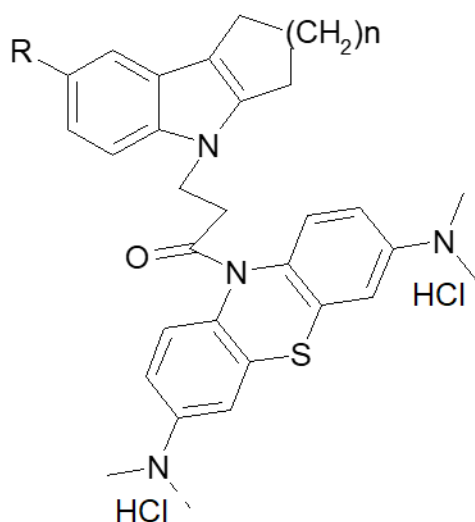
Метиленовый синий (МС)



Лейкоформа
Метиленового синего (МСН₂)



Конъюгаты производных
индолов и фенотиазинов



Конъюгаты производных
тетрагидро-Υ-карболинов и
фенотиазинов

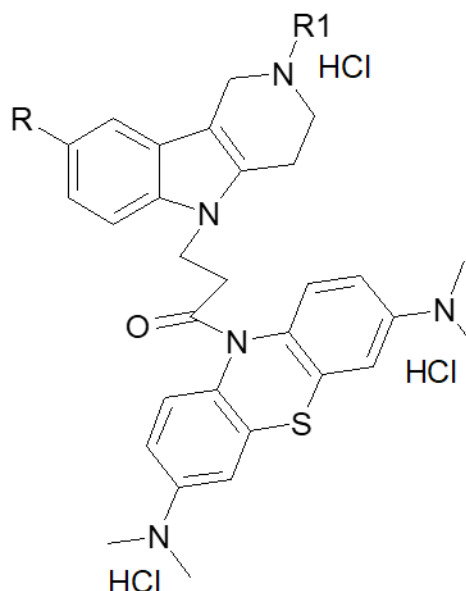


Рисунок 37 Формулы прообразов фармакофоров и конъюгатов производных индолов, тетрагидро-Υ-карболинов и фенотиазинов

МС является членом семейства фенотиазинов с широким спектром терапевтических и диагностических применений. Благодаря как катионным, так и липофильным свойствам, МС легко проникает через гематоэнцефалический барьер, клеточную и митохондриальную мембрану и диффундирует в митохондриальный матрикс, где при низких дозах он образует окислительно-восстановительное равновесие с ферментами электронтранспортной цепи, усиливая митохондриальное дыхание. Таким образом, МС является мощным окислительно-восстановительным агентом с высокой биодоступностью для митохондрий, что снижает частоту образования митохондриальных АФК и, следовательно, задерживает клеточное старение [58, 112]. Кроме того, МС модифицирует активность ряда мембранно-связанных переносчиков и ионных каналов, в частности, потенциал-зависимого Na^+ канала и Ca^{2+} -зависимого K^+ канала с чем связывают деполяризующее влияние МС на нейрональную мембрану [60, 61]. МС влияет на нейрональные взаимосвязи, изменяя активность холинэргической, моноаминэргической или глутаматэргической синаптической нейротрансмиссии [62-64] и оказывает улучшающее влияние на память в нормальном мозге. Многие исследователи связывают этот эффект не только с влиянием на рецепторные и ферментные элементы нейротрансмиссивных систем, но и в значительной степени с направленным на митохондрии действием [65]. Соответственно, МС обладает высоким потенциалом для лечения ишемических и гипоксических расстройств, болезни Альцгеймера и некоторых других нейродегенеративных заболеваний [55, 56, 66, 67]. Важно отметить, что МС значительно снижает уровень аномальных белковых агрегатов и их токсичность - Хантингтин, α -синуклеин, тау и β -амилоид, но механизмы такой активности сильно отличаются - от окислительно-восстановительного ингибирования агрегации и уменьшения количества олигомеров до активации протеасомной активности [68-71, 73].

С другой стороны, многие производные индола (второго фармакофора наших конъюгатов) обладают нейроактивной активностью - от различных трициклических антидепрессантов, включая производные дибензоциклогептена, до ингибитора микротрубочек - колхицина, и одним из наиболее интересных для нас классов производных индола циклоалкана являются производные карбазолов. Например, производные аминопропилкарбазола, а также представитель класса γ -карболинов димебон, продемонстрировали пронейрогенную и нейропротекторную активность без явной токсичности, и одним из ключевых механизмов такой активности является ингибирование МП. Кроме того, димебон (латрепердин) и метиленовый синий способны защищать нейроны в различных моделях нейродегенерации [210, 270] и значительное предотвращение патологических признаков наблюдались на модели ALS *in vitro*, когда оба соединения вводили одновременно [271, 272]. Чжу и соавторами в 2013 году был синтезирован ряд N-замещенных карбазолов, из которых были выделены соединения-лидеры, защищающие от гибели нейрональные клетки HT22 в условиях нейротоксичности вызванной глутаматом и гомоцистеиновой кислотой. Было показано, что нейропротекторный эффект может быть результатом его антиоксидантной активности [273]. Также были обнаружены некоторые цианиновые соединения на основе карбазола, обладающие способностью предотвращать агрегацию A β , снижать активность гликогенсинтазинкиназы-3 β (ГКС-3 β) и гиперфосфорилирование тау в тройной трансгенной модели AD [274].

Нашими коллегами было показано, что все новые конъюгаты МС и производных индолов проявляют довольно высокую на уровне исходных фармакофоров или более эффективную ингибиторную активность в отношении АХЭ и БХЭ, причём γ -карболин-содержащие конъюгаты проявляют выраженную селективность в отношении АХЭ [275]. Поиск ингибиторов АХЭ, способных компенсировать утраченные функции холинергической нейромедиаторной системы изначально рассматривался как

наиболее очевидная стратегия создания лекарств для БА, так как гибель холинэргических нейронов базального ядра Мейнерта является характерной особенностью этого заболевания. Ингибиторы холинэстераз (преимущественно ацетилхолинэстеразы, АХЭ) донепезил (Арисепт), ривастигмин (Экселон), галантамин являются до настоящего времени основными терапевтическими средствами для лечения этого заболевания.

Мы показали, что исследуемые конъюгаты также проявили свойства эффективных антиоксидантов – величины IC_{50} для ингибирования Fe^{3+} -индуцированного ПОЛ этими соединениями находятся в диапазоне от 0.5 до 4 мкМ. Ранее нами была показана способность известного нейропротектора димебона подавлять спонтанное и вызванное тБГП или β -амилоидом ПОЛ митохондрий [130, 179, 276]. Но, в концентрациях ниже 10 мкМ димебон не способен ингибировать Fe^{3+} -индуцированное ПОЛ митохондрий, в то время как такой способностью обладают МС и MSH_2 . Это позволяет предположить, что способность новых конъюгатов подавлять Fe^{3+} -индуцированное LP, очевидно, обусловлена наличием именно фенотиазинового фрагмента (фрагмента МС).

Дополнительным возможным механизмом подавления ПОЛ митохондрий МС и его индол-содержащими производными может быть не только их способность связывать свободные радикалы, но и снижение продукции свободных радикалов кислорода митохондриями в результате их способности к альтернативному переносу электронов.

Деполяризация, как и стимуляция поглощения кислорода, обусловленная способностью МС к альтернативному переносу электронов в дыхательной цепи митохондрий, была показана ранее [277], и именно с этой активностью связывают его антиоксидантный и нейропротекторный эффект. Как показали результаты исследования, в концентрации 30 μ М (максимальная концентрация для тестов первичного скрининга) как МС, так и в меньшей степени его восстановленная форма MSH_2 слабо depoляризуют митохондрии в присутствии глутамата и малата и в большей степени

деполяризуют в присутствии сукцината ($40 \pm 9\%$ и $18 \pm 1\%$, соответственно). Большая часть исследованных конъюгатов влияют на митохондриальный потенциал аналогично МС, при этом деполяризующая активность производных γ -карболинов в большинстве случаев превосходит МС. Так, в присутствии $30 \text{ }\mu\text{M}$ соединения-лидера Са-7237х деполяризация в присутствии NADH-зависимых субстратов составляет $29 \pm 11 \%$, а в присутствии FADH₂-зависимых субстратов - $67 \pm 2 \%$. Наименьшую степень деполяризации вызывают конъюгаты МС и фторсодержащих производных карбазолов СА-7498х и ЕС-2915х. МС и исследованные конъюгаты концентрационно-зависимо снижают деполяризацию, вызванную катионами кальция, но не деполяризацию, вызванную разобщителем дыхательной цепи карбонилцианид-3-хлорфенилгидразоном (СССР), что может быть связано с подавлением потенциал-зависимого входа кальция в митохондрии. Это подтверждается подавлением кальций-вызванного «набухания» митохондрий и снижения кальциевой ёмкости митохондрий, в частности в присутствии соединений-лидеров по совокупности тестов - СА-7237х, СА-7498х и ЕС-2915х.

МС может переносить электроны от NADH на цитохром С, тем самым компенсируя снижение или ингибирование активности комплекса I. Восстанавливаясь благодаря окислению NADH и окисляясь благодаря восстановлению цитохрома С, $\text{MC} \leftrightarrow \text{MCH}_2$ усиливает окислительное восстановление в митохондриях и образование АТФ.

Мы решили оценить – стимулируют ли активность ДЦМ и сохраняется ли способность к шунтированию повреждённых участков ДЦМ у синтезированных нами комплексов.

Анализ активности дыхательной цепи синаптомитохондриальной Р2-фракции мозга крыс проводили с использованием биоэнергетического анализатора XFe96 (Seahorse Bioscience), который с помощью твердотельных флуориметрических датчиков позволяет регистрировать уровень O_2 и H^+ .

Скорость изменения уровня O_2 и H^+ в ограниченном участке планшета в среде над иммобилизованными митохондриями, клетками или синаптомитохондриальной фракцией, т.е. скорость поглощения ими кислорода, последовательно измеряют в присутствии только субстрата (базальное дыхание), затем после добавления АДФ измеряем фосфорилирующее дыхание, нефосфорилирующее дыхание после добавления олигомицина, максимальное дыхание, стимулированное разобщителем FCCP и не связанное с работой дыхательной цепи митохондрий поглощение кислорода после добавления ингибиторов комплексов 1 и 3 (ротенона и антимицина А) (Рисунок 38) .

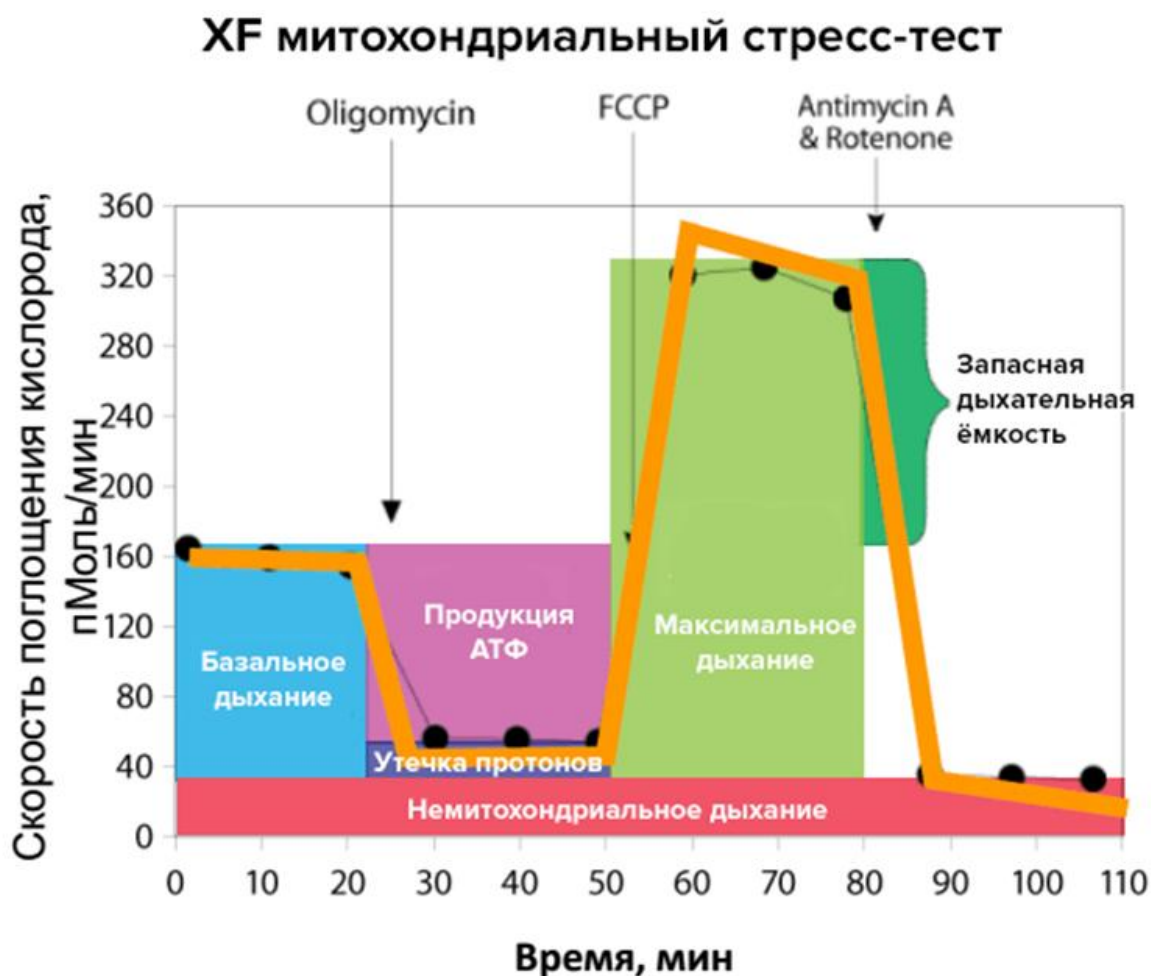


Рисунок 38 Схема оценки биоэнергетического анализа (рисунок использован с разрешения фирмы Биохиммак)

Исследованные соединения-лидеры как в классе конъюгатов производных γ -карболинов и фенотиазинов - СА-7237х, так и в ряду конъюгатов производных карбазолов и фенотиазинов СА-7498х и ЕС-2915х вызывают усиление дыхательной функции изолированных митохондрий P2-фракции мозга крыс. Эффект наблюдается как в присутствии субстратов Комплекса I (Рисунок 39), так и в присутствии субстрата Комплекса II (Рисунок 40), т. е. пирувата/малата и сукцината (в присутствии ингибитора комплекса I ротенона). Скорость поглощения кислорода увеличивается в присутствии конъюгатов производных индолов и фенотиазинов как при сопряженном фосфорилирующем дыхании в присутствии АДФ, так и в присутствии разобщителя протонофора FCCP.

CA-7498

EC-2915

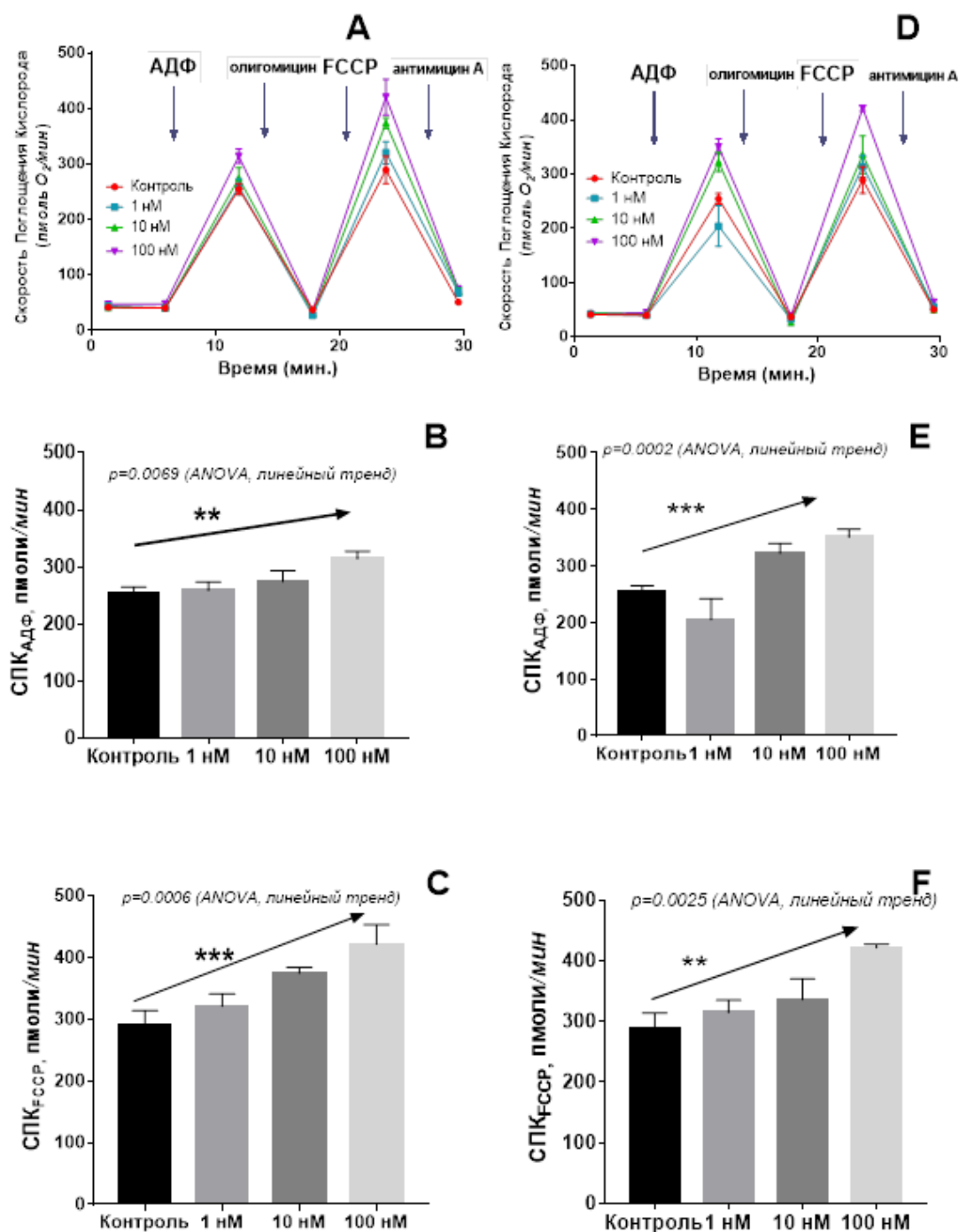


Рисунок 39 Биоэнергетическая характеристика влияния представителей конъюгатов производных индолов и фенотиазинов (МС) на дыхание Р2-фракции мозга крыс (5 μ г белка в ячейке) в присутствии 5 мМ пирувата и 5 мМ малата. Достоверность отличий оценивали одномерным дисперсионным анализом ANOVA с апостериорным тестом Даннетта(** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$)

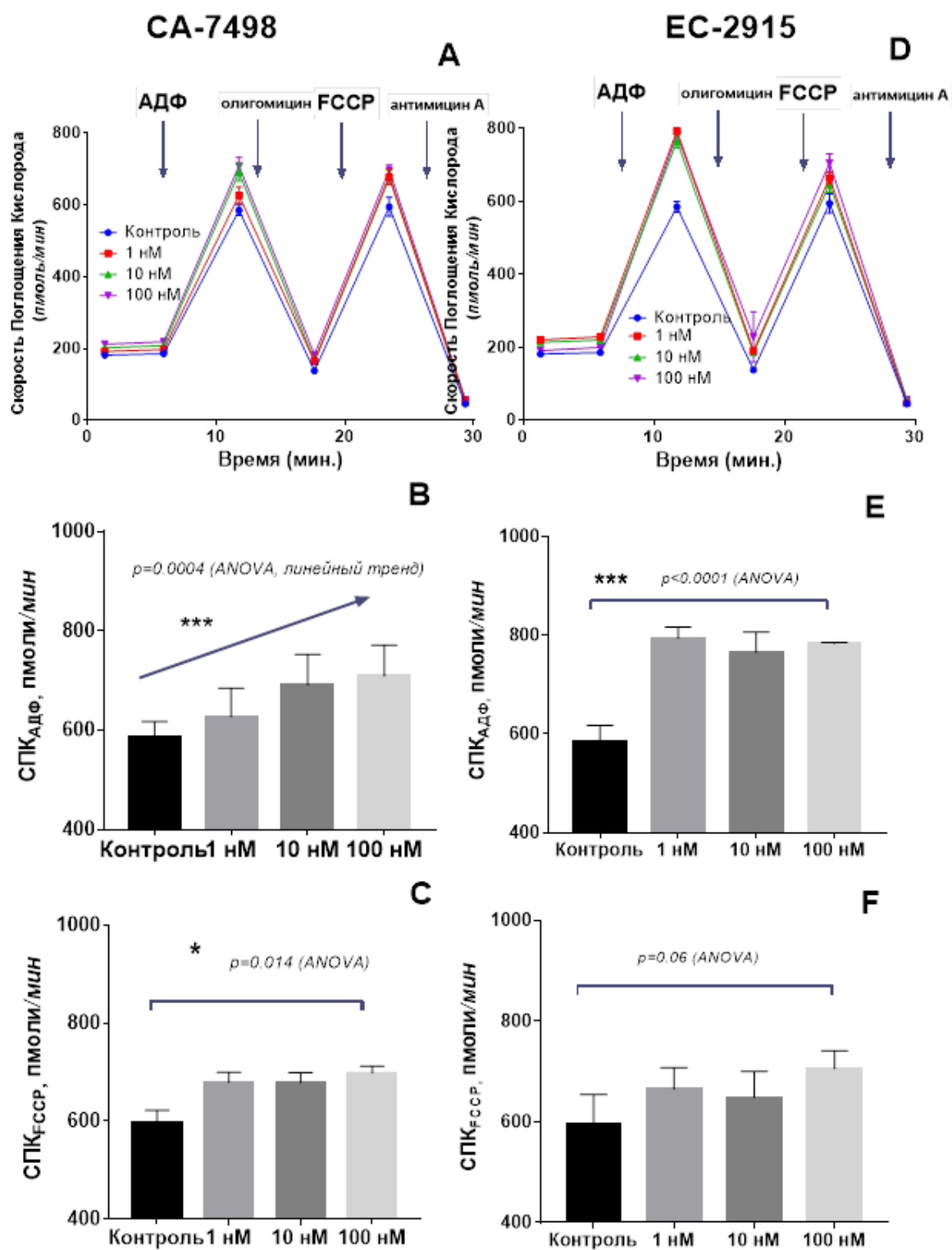


Рисунок 40 Биоэнергетическая характеристика влияния представителей конъюгатов производных индолов и фенотиозинов (МС) на дыхание Р2-фракции мозга крыс (5 μ г белка в ячейке) в присутствии 10 мМ сукцината и 1 μ М ротенона. Достоверность отличий оценивали одномерным дисперсионным анализом ANOVA с апостериорным тестом Даннетта(*** - $p<0.001$).

Такой же эффект потенцирования митохондриального дыхания для МС наблюдался ранее на митохондриях сердца крыс [278] и на изолированных митохондриях мозга, где МС увеличивал скорость восстановления цитохрома с при использовании NADH в качестве донора электронов [279].

В несколько меньшей степени чем МС и его лейко-форма, новые конъюгаты сохраняют способность к альтернативному транспорту электронов, реполяризуя митохондрии после ингибирования комплекса I ДЦМ ротеноном (Рисунок 41).

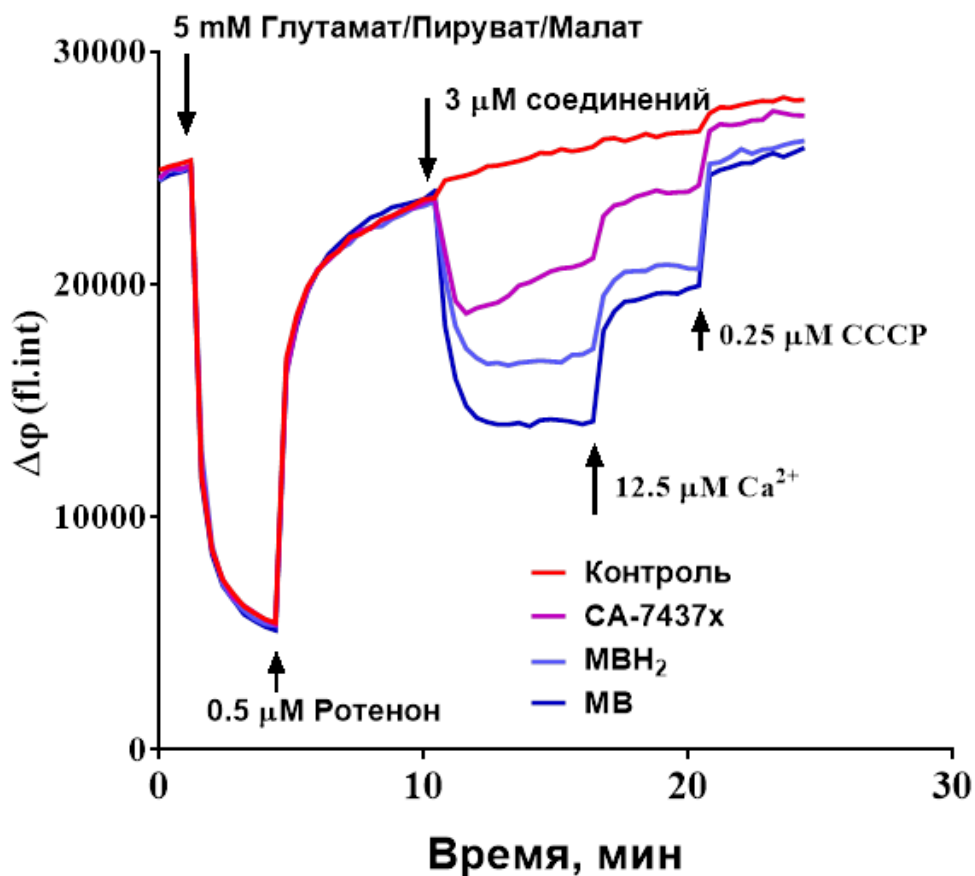


Рисунок 41 Реполяризация митохондрий после ингибирования комплекса I ДЦМ ротеноном

Этот факт отчасти может также обуславливать антиоксидантный эффект соединений и представляет интерес для дальнейшего исследования

влияния новых соединений в условиях нарушений работы ДЦ митохондрий [275].

Не менее важными типами активности исследуемых соединений являются обнаруженная нами их способность стимулировать полимеризацию тубулина с образованием микротрубочек нормальной структуры и ингибирование активности КГС-3 β (табл. 5).

Таблица 5 Влияние конъюгатов МС и производных индолов на активность КГС-3 β и на полимеризацию тубулина в микротрубочки

No	R	R ¹	Влияние 0.1мМ соединений на скорость полимеризации тубулина (ΔA_{355}) % от контроля	Ингибирование активности КГС3 β в присутствии 100нМ соединений, % от контроля
МС	-	-	168 $\pm$ 17	n.d.
МСН ₂	-	-	178 $\pm$ 11	n.d.
СА-2915х	CF ₃ O	H	179 $\pm$ 27	33 $\pm$ 17
СА-7498х	CF ₃ O	CH ₃	207 $\pm$ 5	41,1 $\pm$ 5,3
LiCl (20mM)	-	-	-	62,8 $\pm$ 9,1

Стимуляция как новыми соединениями, так и МС и МСН₂ полимеризации тубулина и, соответственно, стабилизация микротрубочек как компенсация утраченной функции тау-белка может обеспечить нормализацию аксонального транспорта, способствовать росту аксонов. Кроме того, значительные нарушения сборки микротрубочек и их фосфорилирования наблюдаются при болезни Альцгеймера и могут быть индуцированы аномальным накоплением ряда металлов [280]. Можно

предположить, что соединения, способные увеличивать полимеризацию тубулина в микротрубочки нормальной структуры, будут обладать положительным терапевтическим эффектом при регуляции нейрональной пластичности, усиливая процессы аксоно- и нейрогенеза. Ингибирование активности КГС-3 β , одной из основных киназ, отвечающих за патогенное гиперфосфорилирование тау-белка при БА рассматривается также как тау-направленная терапия [281], и в значительной степени рассматривается как терапевтическая стратегия антидепрессантного эффекта [282]. В то же время, стресс и ряд патологических состояний связаны с накоплением митохондриальной фракции КГС-3 β . С увеличением внутримитохондриальной активной формы КГС-3 β связывают нарушения работы комплексов дыхательной цепи. Кроме того, КГС-3 β , связываясь с циклофилином D и усиливая олигомеризацию потенциал-зависимого анионного канала (VDAC), увеличивает вероятность открытия пор МП [85, 283]. Показана регуляторная роль КГС-3 β в процессах биогенеза митохондрий, митохондриальной динамике и антиоксидантном статусе митохондрий.

Нужно отметить, что связь нейропротекторного эффекта с ингибированием активности КГС-3 β благодаря усилению ингибиторного (S9) и ослаблению активирующего (Tyr216) фосфорилирования недавно была показана как для МС, так и для Р7СЗ – производного аминопропилкарбазола со значительной способностью стимулировать нейрогенез благодаря способности подавлять митохондриальную индукцию апоптоза новых нейронов [68, 284].

Способность соединений-лидеров подавлять развитие кальций-вызванной деполяризации митохондрий, стимуляция их дыхательной активности и антиоксидантная активность позволяет предположить наличие нейропротекторной активности соединений. В то же время, стимуляция поглощения кислорода митохондриями в присутствии субстратов комплекса II может привести к фальш-положительным результатам МТТ теста. Поэтому,

прежде всего была проведена оценка выживаемости клеток в присутствии разных концентраций (от 1нМ до 10 μМ) соединения СА-7498х и показано, что это соединение не влияет на образование формазана в МТТ тесте. Затем на первичной культуре гранулярных нейронов мозжечка крыс была исследована способность соединений-лидеров защищать клетки от гибели, вызванной перенагрузкой кальцием (иономицин-вызванной токсичности). Эта модель нейротоксичности отражает механизм кальциевого стресса, наблюдаемого при амилоидной токсичности, при эксайтотоксичности, при ишемических повреждениях. На Рисунок 42 видно, что соединение СА-7498х достоверно защищает от иономицин-вызванной токсичности начиная уже с 10нМ концентрации. Аналогичная картина наблюдается и для соединений СА-7237х и ЕС-2915х (данные не представлены).

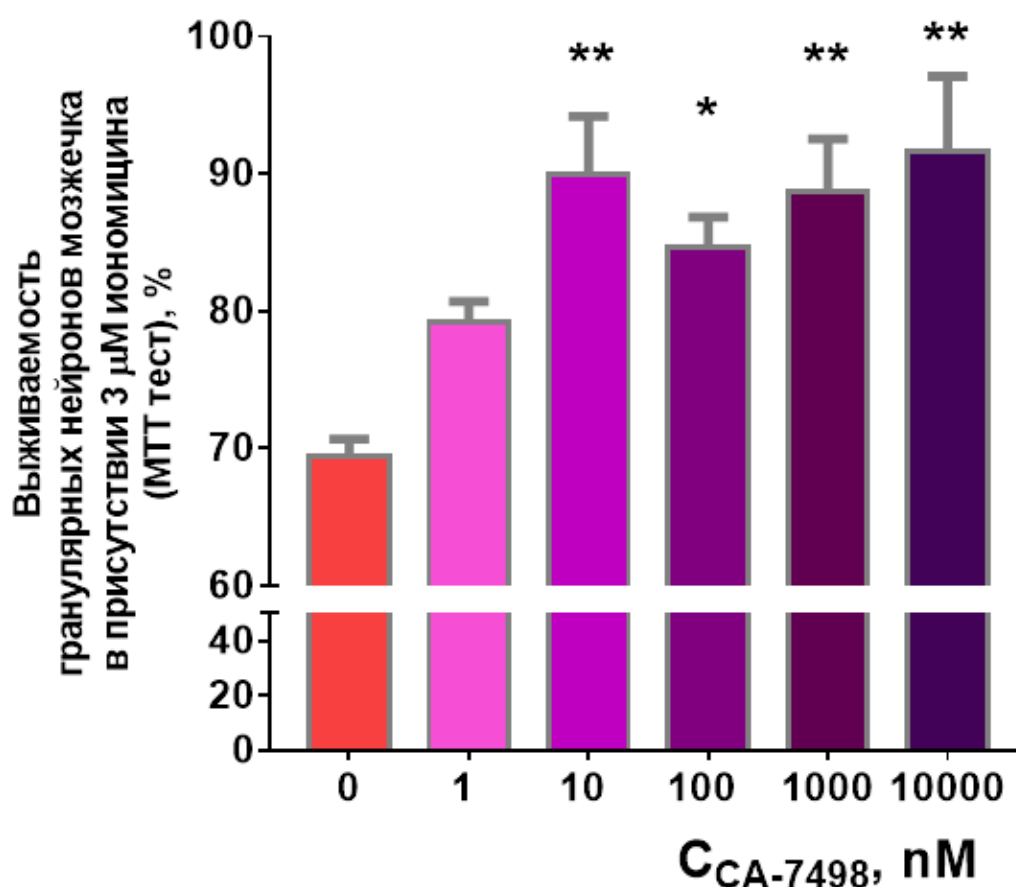


Рисунок 42 Влияние соединения-лидера из класса конъюгатов производных индолов и фенотиазинов (МС) СА-7498 на выживаемость гранулярных

нейронов мозжечка в условиях моделирования кальциевого стресса при добавлении 3 μ M иономицина. Выживаемость нейронов оценивали стандартным МТТ тестом. Достоверность отличий оценивали одномерным дисперсионным анализом ANOVA с апостериорным тестом Даннетта(* - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$)

Таким образом, детальное исследование биологической активности представителей конъюгатов циклоалканиндолов с МС показало, что данные соединения эффективно ингибируют холинэстеразы, вытесняют пропидий из PAS АХЭ, т.е. являются потенциальными блокаторами АХЭ-индуцируемой агрегации бета-амилоида, а также подавляют перекисное окисление липидов, стимулируют кислород-зависимое дыхание митохондрий мозга и снижают кальций-вызванное открытие пор МП. Поэтому не удивительно, что эти соединения обладают очевидным нейропротекторным эффектом на клеточной модели кальциевого стресса. Не менее важными мишенями действия новых соединений является их способность стимулировать сборку микротрубочек, что позволяет предположить их компенсаторный эффект на систему микротрубочек в случае таупатий, и ингибировать активность КГС-3 β - одной из наиболее перспективных мишеней для создания лекарств для лечения НЗ.

4.5.4. Производные адамантансодержащих индолов

Особый интерес представляло изучение новых конъюгатов, сочетающих фармакофорные фрагменты карбазола и аминок адамантана, проявивших широкий спектр нейротропной активности в опытах *in vitro* [262]. Способность соединений этого класса стабилизировать микротрубочки и защищать нейрональные клетки от кальциевой токсичности защищена патентами [285, 286], соответственно. Для двух соединений-лидеров этого ряда - ТГ-2112х и ТГ-2113х – достаточно близких по структуре (отличия только в наличии двух метильных заместителей в адамантановой части молекул) проведены детальные исследования их взаимодействий с комплексом мишеней *in vitro* (Рисунок 43).

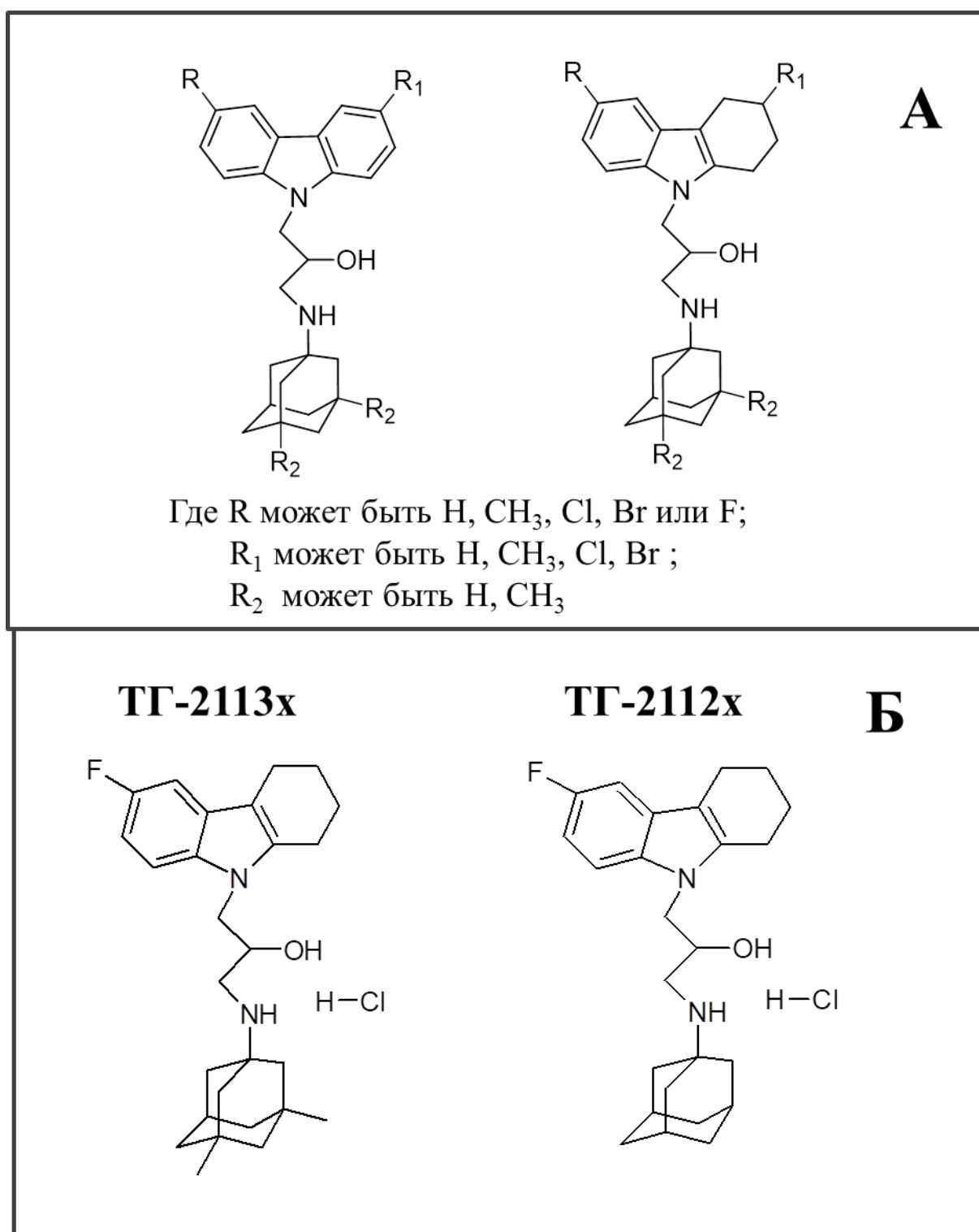


Рисунок 43 Формулы конъюгатов производных аминоксантаминов и карбазолов: А – общая формула; Б – соединения-лидеры ТГ-2112х и ТГ-2113х.

Для обоих соединений был показан эффект увеличения устойчивости к индукции МП, отсутствие деполяризации и увеличение кальциевой ёмкости

в этих же концентрациях. Также наши коллеги показали, что оба соединения являются селективными ингибиторами БХЭ, что важно, так как согласно исследованиям последних лет, именно ингибиторы БХЭ повышают уровень ацетилхолина в мозге и улучшают когнитивные функции у грызунов, не оказывая при этом классических побочных эффектов ингибиторов АХЭ. Мы показали, что оба соединения усиливают полимеризацию тубулина, дозозависимо увеличивая скорость полимеризации с образованием микротрубочек нормальной структуры, что подтверждено электронной микроскопией. Но конъюгат с «мемантиновым» заместителем - ТГ-2113х гораздо более активен в этом тесте – при 0.1мМ концентрации он более, чем в 3 раза увеличивает скорость полимеризации, а конъюгат с амантадиновым заместителем – в 1,7 раза. Таким образом, эти соединения стабилизируют микротрубочки, что может компенсировать тау-патологию, а также может способствовать нормализации аксонального транспорта в нейронах в условиях патологии (Рисунок 44)

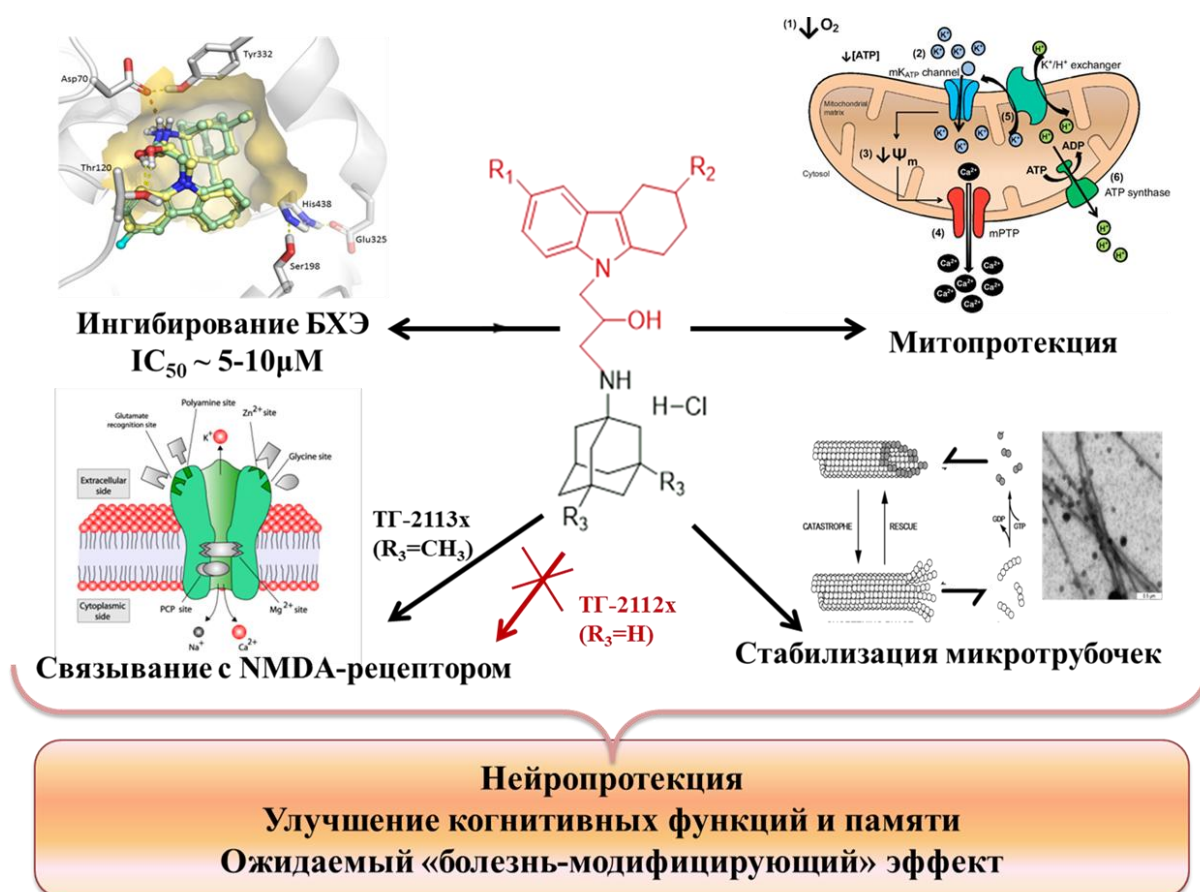


Рисунок 44 Новые мультитаргетные соединения в ряду адамантан-содержащих индолов

Ожидаемо, что в отличие от ТГ-2112х, конъюгат с «мемантиновым» заместителем - ТГ-2113х является эффективным лигандом NMDA-подтипа глутаматных рецепторов.

Оба конъюгата обладают очень высокой способностью защищать нейрональные клетки от глутаматной эксайтотоксичности, что для ТГ-2113х может быть связано с ингибированием NMDA-рецепторов, и от кальциевого стресса, вызванного иономицином. Нейропротекторная активность может быть также связана с влиянием на митохондрии - подавлением кальций-вызванного процесса МП.

4.5.4.1. ТГ-2112х – нейропротектор с уникальным механизмом защиты от эксайтотоксичности

Для более детального анализа механизма нейропротекторного эффекта при глутаматной эксайтотоксичности на внутриклеточном – митохондриальном уровне мы выбрали именно ТГ-2112х, так как он не ингибирует NMDA-рецептор и, соответственно, его нейропротекторный эффект на этой модели может быть обусловлен именно взаимодействием с митохондриями, что было показано в совместной работе [287]. Полученный эффект оказался ранее не описанным и крайне интересным для поддержания нейрональной активности и проявления нейропротекторного потенциала.

Методом флуоресцентной микроскопии с применением специфических флуоресцентных маркеров мы исследовали изменения цитозольного и митохондриального кальция одновременно с регистрацией митохондриального потенциала в условиях эксайтотоксичности (100 μM) и в условиях физиологически нормальных концентраций внеклеточного глутамата (5 μM). Добавление 100 μM глутамата к зрелым (≥ 12 дней *in vitro*) нейронам первичной культуры клеток гиппокампа вызывает первоначальное

кратковременное повышение цитозольного кальция $[Ca^{2+}]_c$, за которым через несколько минут следует вторичный рост $[Ca^{2+}]_c$ до плато (Рисунок 45А). Одновременное измерение цитозольного кальция и митохондриального потенциала показали, что замедленное вторичное увеличение $[Ca^{2+}]_c$ сопровождается прогрессирующей и практически полной потерей мембранного потенциала митохондрий, что соответствует увеличению интенсивности флуоресценции родамина 123 (Рисунок 45В). Предварительная инкубация клеток с 0,5-1 μM ТГ-2112х не изменила влияние 100 μM глутамата на первичное или вторичное увеличение $[Ca^{2+}]_c$ в гиппокампальных нейронах (Рисунок 45Б). Однако в большинстве нейронов отсроченная дерегуляция кальция не вызвала изменений в $\Delta\psi_m$ ($n = 67$ из 88 нейронов), в остальных клетках аппликация 100 μM глутамата вызвала только незначительную деполяризацию (от $93 \pm 6\%$ сигнала Rh123 в контроле до $14 \pm 2\%$ в клетках, обработанных ТГ-2112х (0,5 μM); $p < 0,001$; Рисунок 45Г и Д).

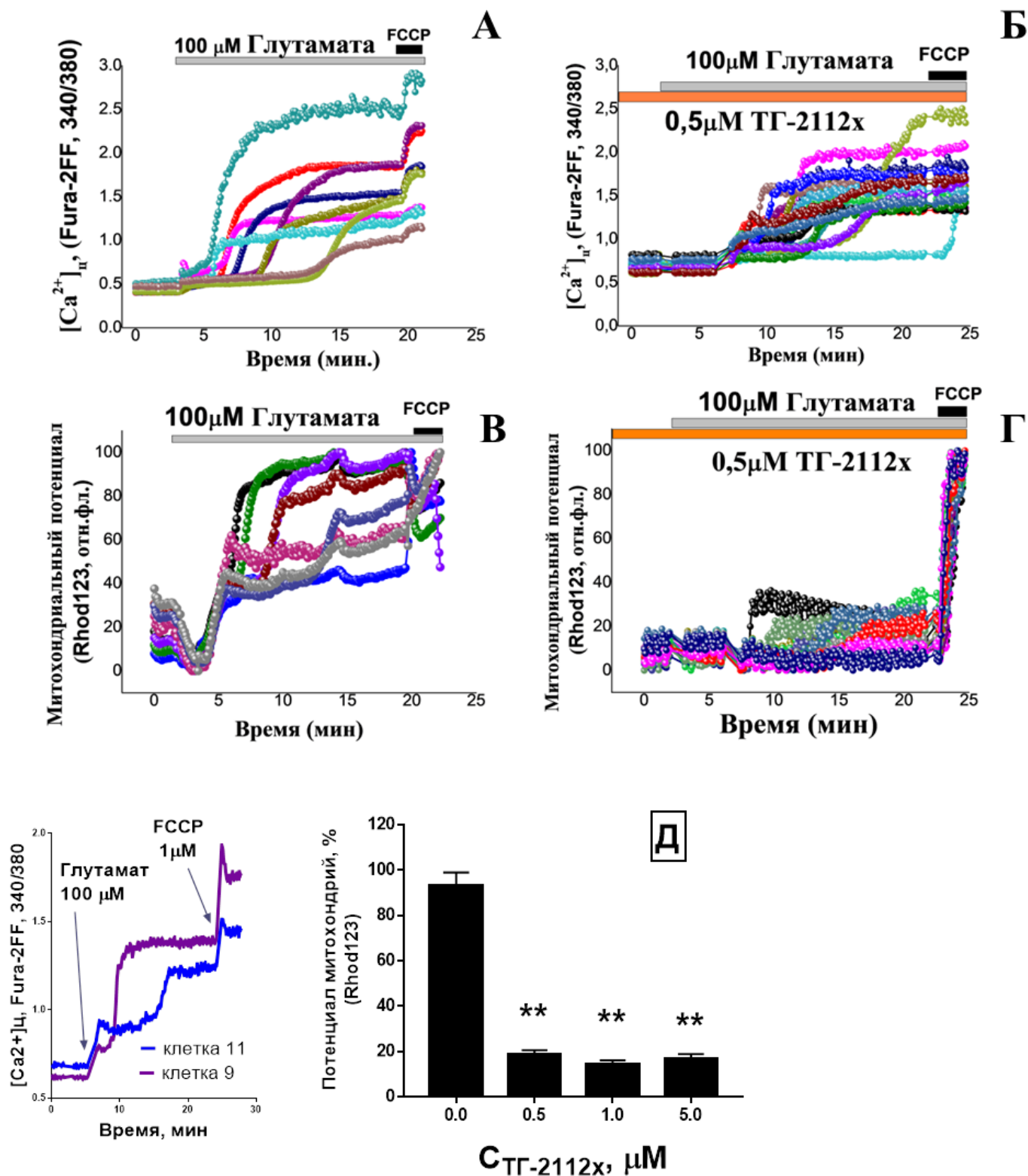


Рисунок 45 Влияние ТГ-2112х на цитозольный кальций $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и потенциал мембраны митохондрий ($\Delta\psi_m$) при воздействии 100 μM глутамата. Одновременные измерения динамики $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Fura-2FF, 340/380) и $\Delta\psi_m$ (Rhod123, отн.фл.) проведены для одиночных нейронов. Глутамат (100 μM) вносили в среду, не содержащую Mg^{2+} . Увеличение

флуоресценции Rhod123 отражает деполяризацию митохондрий, аналогично эффекту митохондриального разобщителя FCCP (1 μM), добавленного к клеткам в конце этого и последующих экспериментов для отметки 100% деполяризации. А и В иллюстрируют различия в динамике $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ц}}$ и $\Delta\psi_{\text{m}}$ соответственно, в контроле (А и В) и в ответ на предварительную инкубацию клеток с 0,5 μM ТГ-2112х (Б и Г). Д - Обобщает влияние различных концентраций ТГ-2112х на индуцированную глутаматом деполяризацию митохондрий. ** $P < 0,01$

Чтобы проверить, изменяет ли ТГ-2112х в ответ на активацию глутаматных рецепторов $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ц}}$, мы использовали небольшие физиологические концентрации глутамата (5 μM) в первичной ко-культуре коры мозга крыс, нагруженной FURA-2FF. Глутамат индуцирует кратковременный пик с последующим восстановлением $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ц}}$ (Рисунок 46А).

Важно, что предварительная инкубация (5 мин) клеток с 0,5 или 1 μM ТГ-2112х значительно увеличивала $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ц}}$ нейронов в ответ на глутамат (с $0,42 \pm 0,03$ ($n = 67$) в контроле до $1,02 \pm 0,04$ ($n = 56$; $p < 0,001$) и $0,87 \pm 0,03$ ($n = 76$; $p < 0,001$) для 0,5 μM и 1 μM ТГ-2112х; Рисунок 46 Б, В, Г). Таким образом, ТГ-2112х увеличивает физиологически значимую реакцию нейронов кальция на физиологическую концентрацию глутамата, что может свидетельствовать об ингибировании выброса Ca^{2+} из нейрона или блокировании захвата кальция митохондриями.

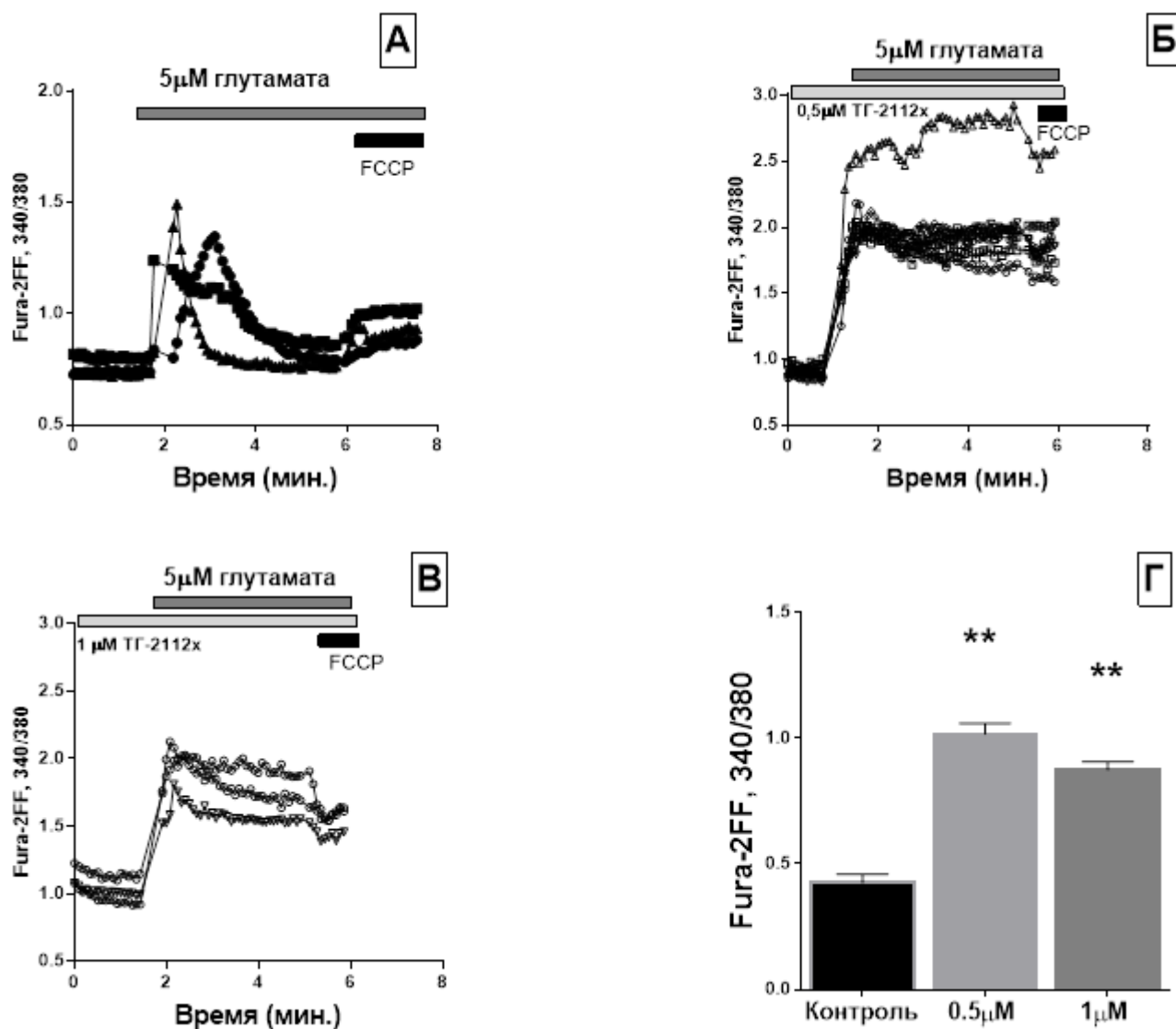


Рисунок 46 Влияние ТГ-2112х на изменения $[Ca^{2+}]_i$ в нейронах при применении нетоксичной концентрации глутамата (А). Преинкубация клеток с 0,5 μM (Б) или 1 μM (В) ТГ-2112х. Г- иллюстрирует разницу $[Ca^{2+}]_i$ в пробах контроля и пробах, прединкубированных с 0,5 μM или 1 μM ТГ-2112х.. ** $P < 0,01$

Для дальнейшего подтверждения того, что эффекты, наблюдаемые в экспериментах с интактными нейронами, напрямую связаны с изменениями митохондриального захвата Ca^{2+} - мы измерили поглощение Ca^{2+} в митохондриях проницаемых клеток. Эти эксперименты позволяют непосредственно измерить кинетику поглощения Ca^{2+} в зависимости от

строго контролируемых концентраций Ca^{2+} в среде инкубации. Добавление буфера с ионами Ca^{2+} ($0,5 \mu\text{M}$) увеличивало содержание митохондриального кальция (Рисунок 47А). Применение потенциал-зависимого кальциевого ионофора ферутина (20 μM) [288] вызвало дальнейшее увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{м}}$. Но в присутствии ТГ-2112х (Рисунок 47Б) такие же добавки кальция не вызывали какого-либо увеличения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{м}}$, а вот добавление ферутина и дальнейшее добавление кальция вызвало увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{м}}$ в митохондриях, обработанных ТГ-2112х. Прежде всего, это свидетельствует о поддержании митохондриального потенциала в митохондриях, обработанных ТГ-2112х, а также позволяет утверждать, что ТГ-2112х ингибирует захват кальция митохондриями в физиологических условиях.

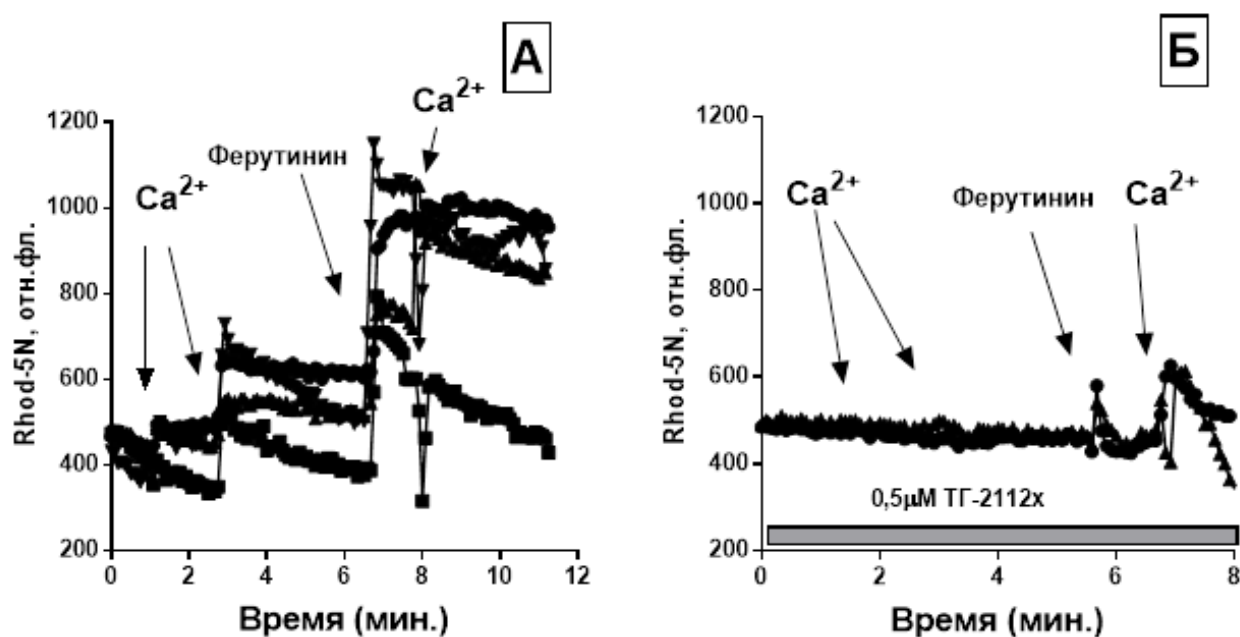


Рисунок 47 Влияние ТГ-2112х на захват кальция митохондриями в проницаемых клетках нейрональной ко-культуры. Добавление 100nM - $5\mu\text{M}$ кальция в среду с проницаемыми нейронами вызывало повышение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{м}}$ в контроле (А), но не в пробы с $0,5 \mu\text{M}$ ТГ-2112х (Б)

На препаратах изолированных митохондрий мозга это соединение не влияет на митохондриальный потенциал, но увеличивает устойчивость митохондрий к кальций-вызванному открытию пор МП (Рисунок 48А) и увеличивает их кальциевую ёмкость, причём этот эффект зависит от используемых субстратов ДЦ митохондрий (Рисунок 48Б и В), наличие глутамата приводит к снижению кальциевой ёмкости митохондрий при высоких концентрациях ($>10 \mu\text{M}$) ТГ-2112х.

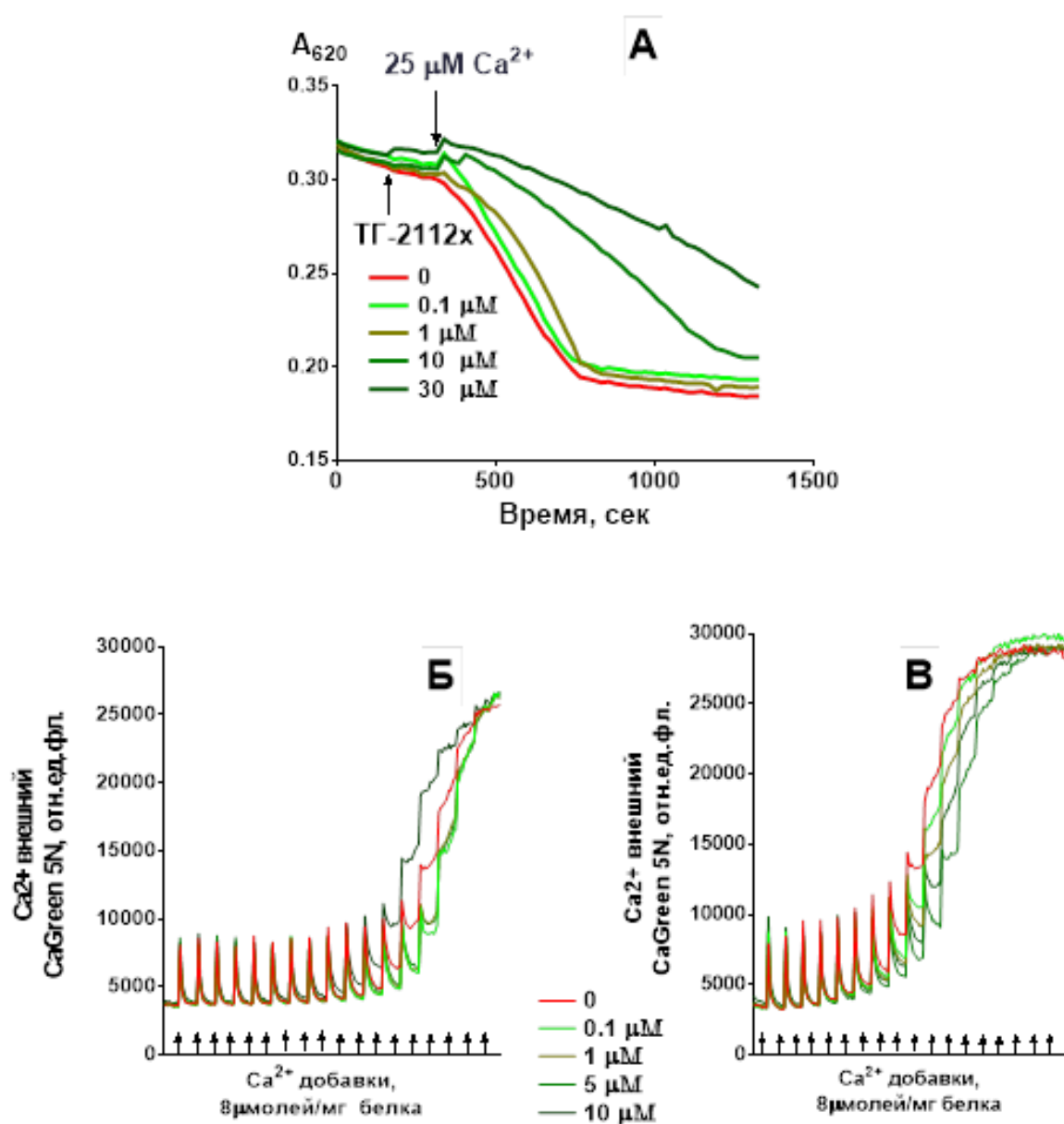


Рисунок 48 Оценка влияния ТГ-2112х на кальций-индуцированное «набухание» митохондрий печени крыс (А) и кальциевую ёмкость

изолированных митохондрий мозга крыс, энергизованных Б – 5мМ глутамата/малата, В – 10мМ сукцината (1μМ ротенона)

Чтобы определить влияние ТГ-2112х на клеточное дыхание, скорость потребления кислорода (СПК) нейронами и клетками глии ко-культур измеряли с помощью биоэнергетического анализатора XF96 при последовательном добавлении разных концентраций ТГ-2112х или ДМСО, ингибитора АТФ-синтазы олигомицина для снятия сопряжающего контроля, разобщителя дыхательной цепи протонофора FCCP и ингибиторов комплекса I и III (Рисунок 49А). Соответственно, анализировали различные характеристики митохондрий, связанные с работой дыхательной цепи (Рисунок 49Б). Не было отмечено достоверных различий между не митохондриальным дыханием, базальной скоростью потребления кислорода проб, содержащих $0,1 \div 10 \mu\text{M}$ ТГ-2112х, утечкой протонов, АТФ-связанным дыханием, (Рисунок 49Д-Ж, соответственно). Но наблюдалось достоверное увеличение максимального дыхания клеток в присутствии FCCP и достоверное увеличение их резервной дыхательной ёмкости (Рисунок 49В, Г). Это может свидетельствовать о повышении в присутствии ТГ-2112х пластичности митохондрий, способности к регуляции при повышенном уровне клеточной активности

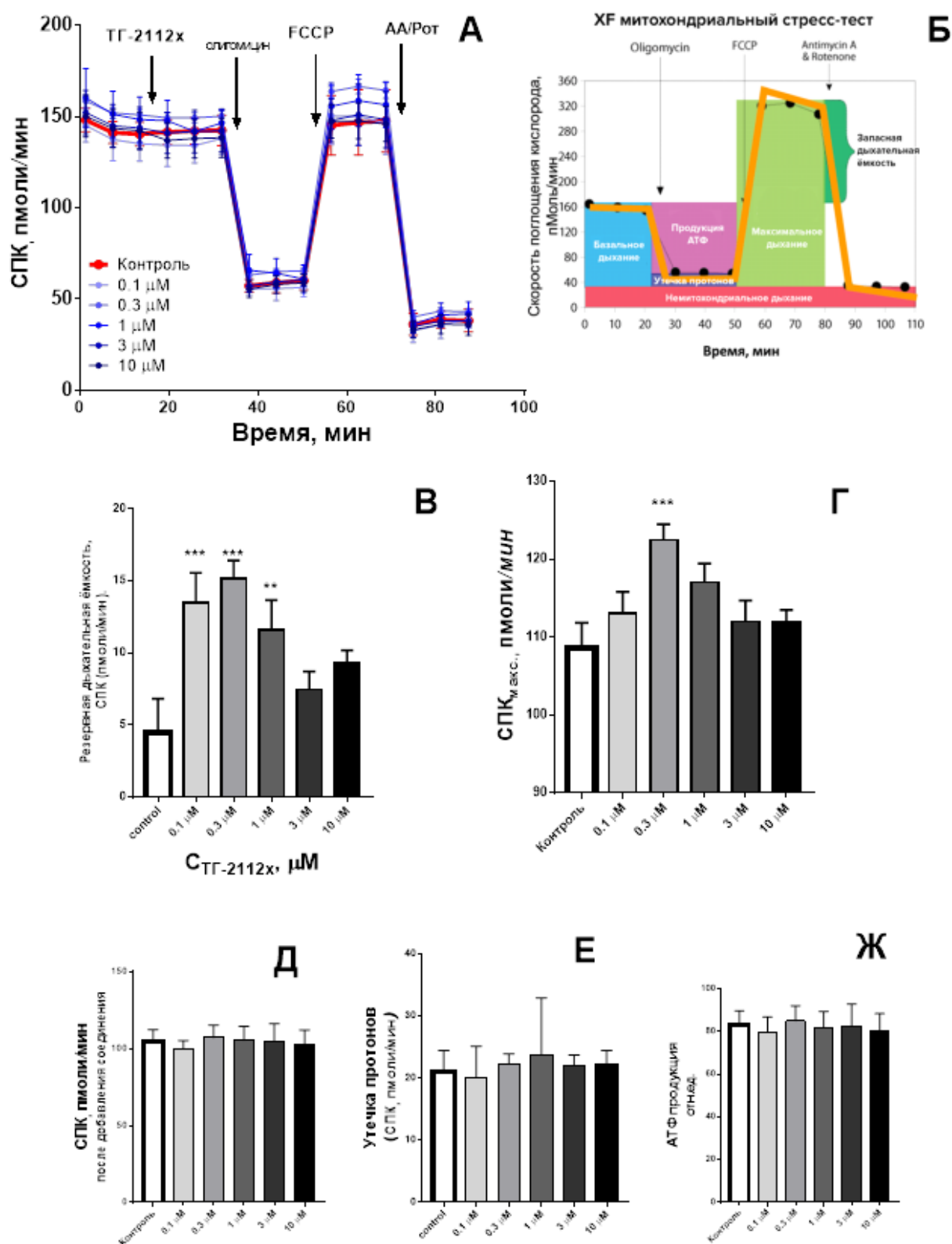


Рисунок 49 Биоэнергетическая характеристика влияния ТГ-2112х на дыхание первичной кокультуры клеток коры мозга крыс . Достоверность отличий

оценивали одномерным дисперсионным анализом ANOVA с апостериорным тестом Даннетта (** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$)

Для более детального изучения митохондриального дыхания в нейронах или астроцитах мы измерили автофлуоресценцию НАДН и ФАД в кокультурах первичных нейронов и астроцитов для оценки их окислительно-восстановительного потенциала. НАДН является донором электронов для комплекса I, и, соответственно, уровень НАДН обратно коррелирует с активностью дыхательной цепи, а ФАД(Н₂) – окислительно-восстановительным кофактором комплекса II и, соответственно, уровень ФАД прямо коррелирует с активностью комплекса II. Максимальный уровень активности дыхательной цепи в присутствии FCCP (1 μ M) соответствует минимальному уровню НАДН, но максимальному ФАД, а добавление NaCN (1 mM), ингибитора цитохром оксидазы блокирует митохондриальное дыхание и, следовательно, соответствует максимальному уровню НАДН или минимальному ФАД. ТГ-2112х (0,5-1 μ M) активирует потребление НАДН в митохондриях, что предполагает активацию дыхания, связанного с комплексом I (Рисунок 50А). И также добавление ТГ-2112х (0,5-1 μ M) увеличивает автофлуоресценцию ФАД что свидетельствует об увеличении активности комплекса II (Рисунок 50Б). Таким образом, добавление к клеткам коры мозга крыс ТГ-2112х в концентрациях, которые ингибируют поглощение митохондриального кальция, стимулирует активность дегидрогеназ, резервную дыхательную ёмкость митохондрий, но не влияет или даже увеличивает мембранный потенциал митохондрий.

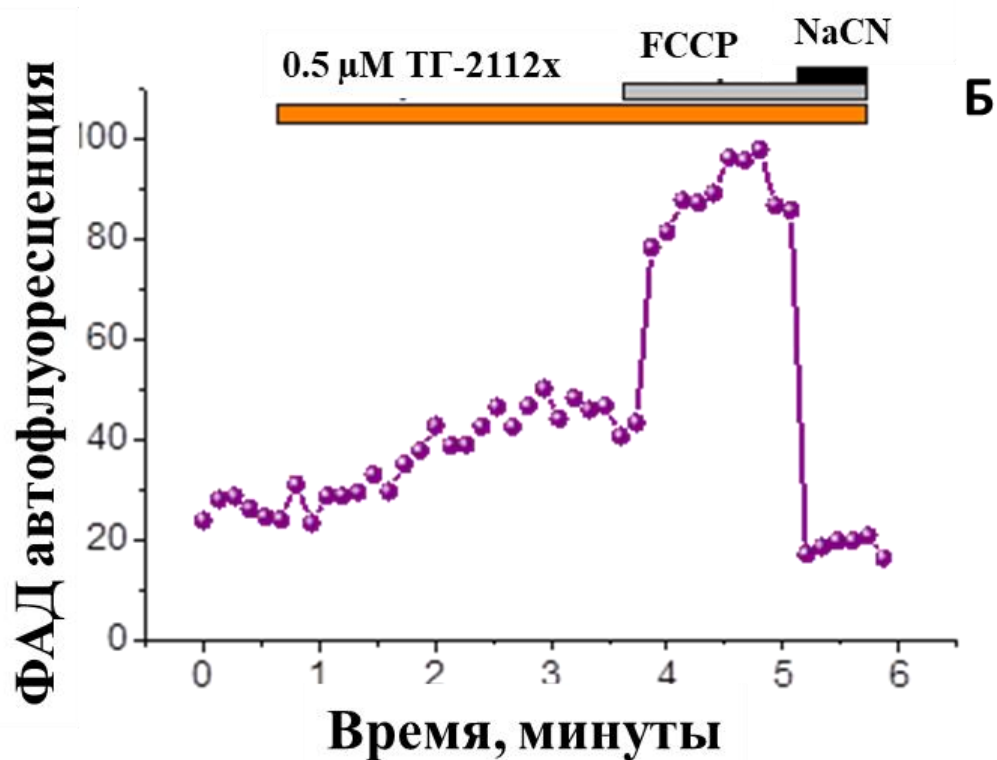
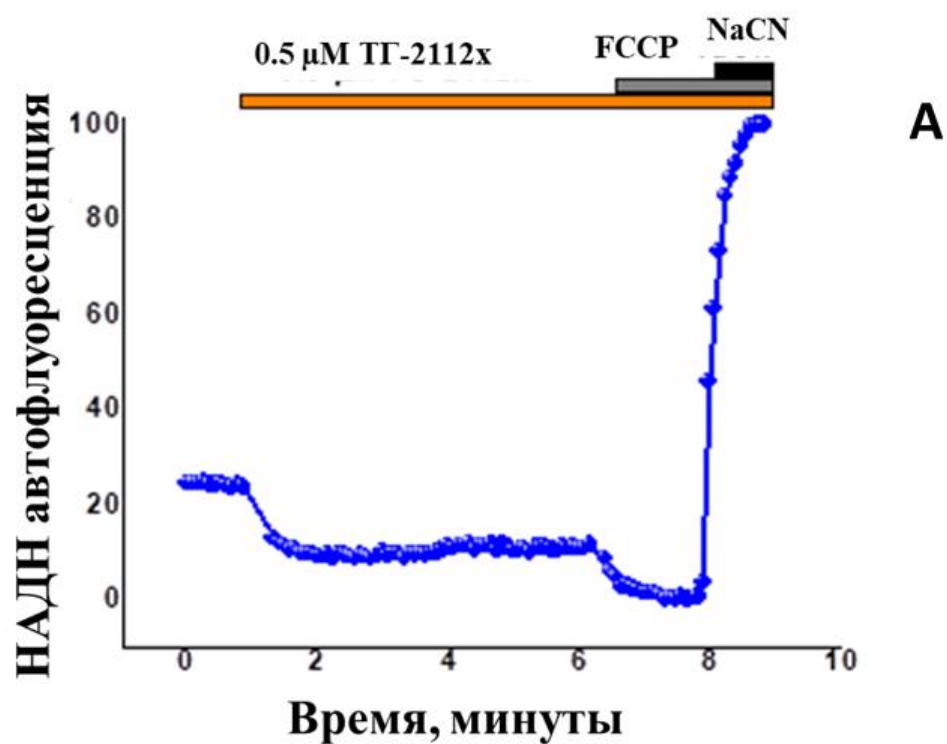


Рисунок 50 Оценка влияния ТГ-2112х на окислительно-восстановительный потенциал кокультуры клеток коры мозга крыс по уровню автофлуоресценции НАДН (А) и ФАД (Б)

Со способностью ингибировать открытие пор МП, очевидно, связана и нейропротекторная активность соединения, проявляющаяся и на описанной выше искусственной модели кальциевого стресса, вызванного добавлением к нейронам первичной культуры коры мозга крыс кальциевого ионофора иономицина (Рисунок 51).

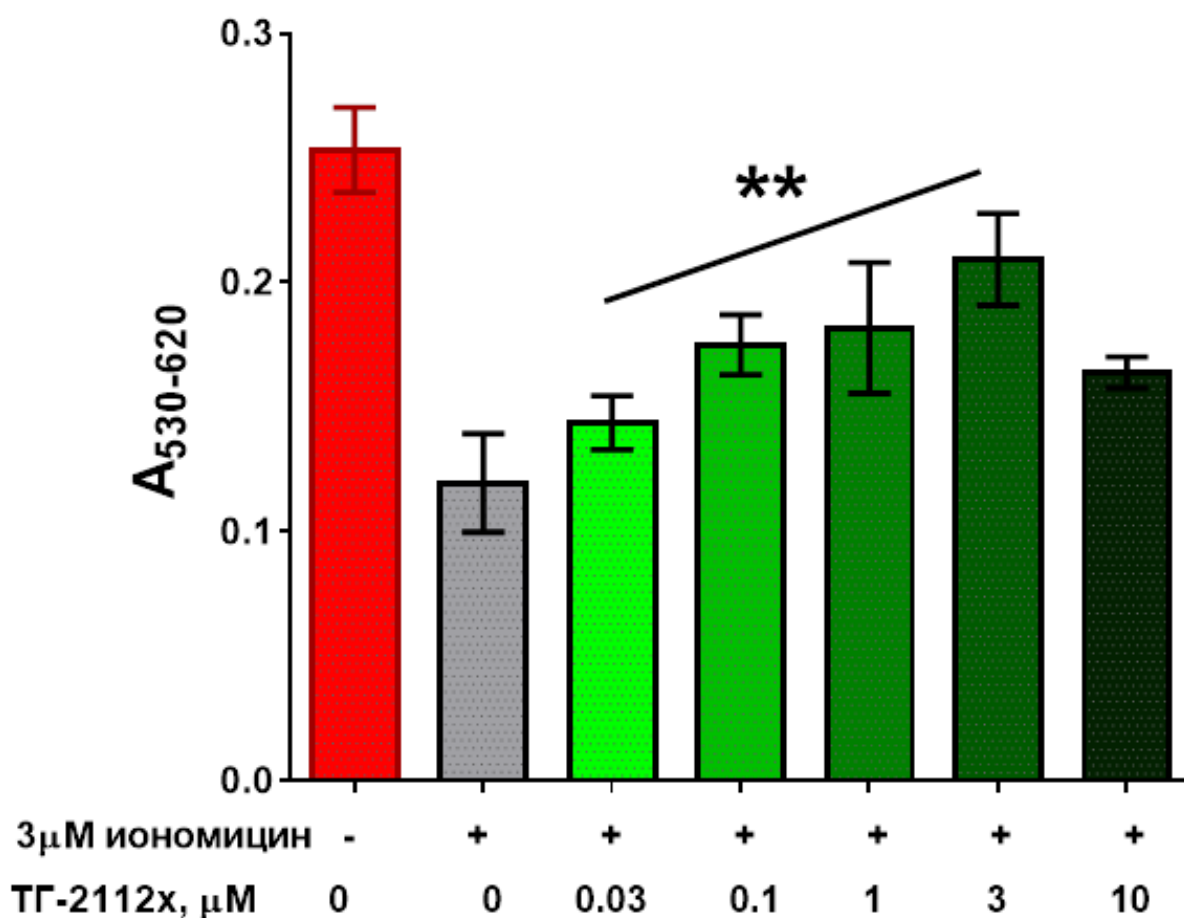


Рисунок 51 Влияние соединения-лидера из класса конъюгатов производных индолов и фенотиазинов (МС) СА-7498 на выживаемость гранулярных нейронов мозжечка в условиях моделирования кальциевого стресса при добавлении 3 μM иономицина. Выживаемость нейронов оценивали стандартным МТТ тестом. Достоверность отличий оценивали одномерным дисперсионным анализом ANOVA с апостериорным тестом линейного тренда (** - $p < 0.01$)

Наблюдаемая синхронизация деполяризации митохондрий и отсроченной дерегуляции кальция позволяет предположить, что эти два процесса должны каким-то образом быть взаимозависимыми и оба необходимы в механизме гибели клеток, индуцированной глутаматом [288]. Несмотря на то, что начальная деполяризация митохондрий не связана с открытием поры МП [289, 290], тем не менее, она является пусковой точкой в механизме гибели клеток. Отсроченная дерегуляция кальция (вторичный подъём цитозольного кальция в нейроне) в течение длительного времени считалась начальной точкой нейродегенеративного процесса при воздействии глутамата [291]. Но наши результаты показывают, что нейроны могут выживать даже после длительной отсроченной дерегуляции кальция при отсутствии деполяризации митохондрий. Именно митохондриальный захват кальция, как предполагалось, является триггером как деполяризации митохондрий, так и вследствие этого – триггером нейродегенерации при эксайтотоксичности глутамата [292]. Наши данные подтверждают это предположение – соединение ТГ-2112х предотвращает гибель нейронов при эксайтотоксичности, предотвращая начальный захват кальция митохондриями и затем увеличивая их устойчивость к индукции открытия пор МП. Механизм наблюдаемого снижения митохондриального захвата кальция остаётся неизвестным и, возможно, вызван не ингибированием кальциевого митохондриального унипортера (MCU), а подавлением альтернативного механизма медленного или низко-концентрационного захвата кальция митохондриями, существование которого было предложено после исследования мышей с нокаутом гена MCU [293].

Важным преимуществом именно такого механизма нейропротекции является отсутствие подавления важных физиологических нейрональных функций, что наблюдается, например, при ингибировании NMDA-рецепторов. Более того, наблюдаемое нами при физиологической концентрации глутамата увеличение цитозольной физиологически значимой концентрации кальция может обуславливать нормализацию или стимуляцию

нейронального ответа на нейротрансмиттерную стимуляцию. А это может быть дополнительным механизмом когнитивно-стимулирующих свойств соединения ТГ-2112х, которые были показаны нами в тестах узнавания новой локализации известного объекта в тесте кондиционирования страха (данные готовятся к публикации). Более детально нейропротекторный потенциал *in vivo* был исследован для аналога этого соединения, “мемантин”-содержащего – ТГ-2113х. Нужно отметить, что для этого соединения в настоящее время уже также показан тот же механизм действия на митохондрии, который был описан выше для ТГ-2112х.

Для *in vivo* изучения нейропротекторных и когнитивно-стимулирующих свойств ТГ-2113х мы использовали три модели нарушения когнитивных функций, связанных с нейродегенерацией на мышах – возрастного снижения когнитивной функции, скополамин-вызванной амнезии, и церебрального амилоидоза как модели болезни Альцгеймера на трансгенных мышах линии 5xFAD.

Прежде всего, нам представлялось необходимым оценить влияние препарата на когнитивные нарушения при старении, так как возраст считается одним из основных этиологических факторов развития сенильной деменции. Важным преимуществом этой модели является естественное развитие сложных молекулярных изменений, которые на настоящий момент еще не изучены полностью, но приводят к поведенческим изменениям, схожими с клиническими проявлениями деменции [294]. Возрастная деменция в значительной степени связана с нарушениями функций митохондрий, в частности со сниженным порогом для индукции МП, а также нарушениями холинергической передачи [295-297], и спектр мишеней действия соединения ТГ-2113х позволяет предположить его эффективность в снижении когнитивного старческого дефицита.

Вторая модель нарушений когнитивных функций, широко используемая при оценке нейротропных препаратов - скополаминовая модель амнезии. Скополамин является неселективным, конкурентным

блокатором мускариновых рецепторов и широко используется в доклинических исследованиях в качестве "холинэргической" модели нарушений памяти. 5xFAD трансгенные мыши считаются одной из самых агрессивных моделей болезни Альцгеймера. У 5xFAD мышей биохимические маркеры появляются на 10-12 месяцев раньше, чем, например, у PDAPP, Tg2576, TgAPP/Ld/2 или других трансгенных линий [298]. Мыши 5xFAD содержат 5 мутаций, способствующих усиленной продукции патологических форм β -амилоида: 3 мутации человеческого белка предшественника бета-амилоида (APP; шведская мутация K670N/M671L, флоридская – I716V и лондонская – V717I, названные по стране, где впервые были обнаружена связь мутации с наследственной формой болезни Альцгеймера [299] и 2 мутации пресенилина, являющегося субъединицей γ -секретазы (и PS1; M146L и L286V). В этой модели шведская мутация увеличивает производство всего $A\beta$, в то время как другие четыре мутации увеличивают продукцию именно нейротоксичного $A\beta$ (1-42).

Ассоциативную и контекстуальную память мышей, процессы ее формирования и угашения оценивали в тесте контекстного кондиционирования страха (contextual fear conditioning), который часто используется в доклинических исследованиях потенциальных препаратов против деменции [300-302]. Данный тест основан на классическом (павловском) обучении, в котором участвуют ассоциативная связь между двумя стимулами: условным стимулом, который является нейтральным и не имеет прямого отношения к задаче, и безусловным стимулом, который жизненно важен и способен вызывать типичную реакцию поведения. В протоколе контекстного кондиционирования страха условным стимулом считается контекст тестирования, т.е. установка, экспериментальная комната, освещение, экспериментатор, а безусловным – удар током. Реакцией на безусловный стимул считается фризинг, абсолютно неподвижное состояние, за исключением дыхательных движений. Такое состояние в природных

условиях является защитной реакцией грызунов, повышающей шансы остаться незамеченными и выжить в условиях опасности.

Известно, что не только ассоциативное обучение, но и угашение обретенной памяти, т.е. подавление нерелевантной информации, является важным процессом для нормальной жизнедеятельности, и нарушены у пожилых людей и пациентов с деменцией. Но если процессы консолидации памяти широко изучаются и предлагаются перспективные терапевтические препараты, патология в процессах угашения изучается гораздо менее часто. Ранее нашими коллегами был валидирован протокол поведенческого исследования кондиционирования страха, включающий помимо сессии обучения, сессию переучивания [196], который позволяет изучать оба процесса – и процессы консолидации памяти, и процесс угашения аверсивной информации. На Рисунок 52 представлена схема проведения такого эксперимента.

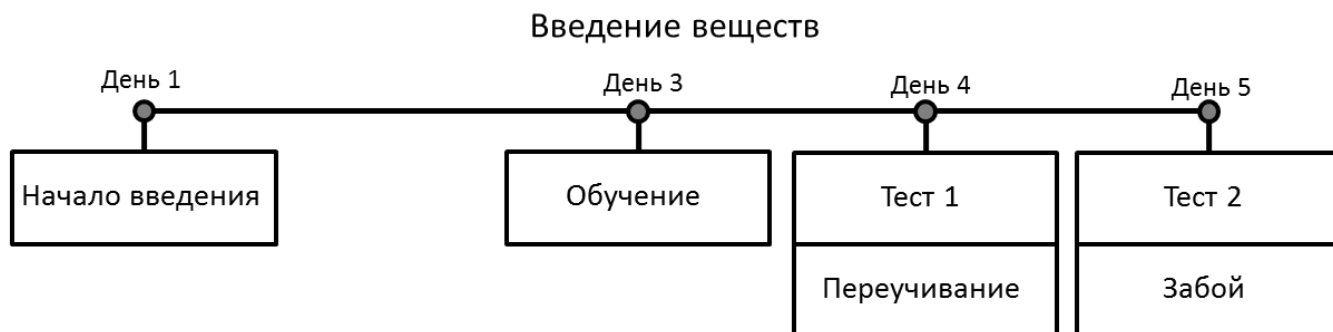


Рисунок 52 Общая схема введения веществ и проведения теста кондиционирования страха

4.5.5. Оценка эффектов соединения ТГ-2113х на *in vivo* моделях

4.5.5.1. ТГ-2113х восстанавливает возрастные нарушения формирования и угашения памяти

В тесте 1 у мышей, получавших соединение ТГ-2113х, процент фризинга был значительно выше, чем у контрольной группы (*тест 1*: $p=0,0022$; *тест 2*: $p=0,9515$ по сравнению с 16-месячными контрольными мышами, *двухфакторный ANOVA*, Рисунок 53), что указывает на способность ТГ-2113х усиливать ассоциативное обучение у мышей позднего возраста. В то время как у контрольных мышей процент фризинга не отличался в тестах 1 и 2 ($p=0,3851$, *двухфакторный ANOVA*, Рисунок 53, введение ТГ-2113х не только повышало этот показатель в тесте 1, но и обуславливало значительное снижение этого показателя в тесте 2 ($p=0,0081$, *двухфакторный ANOVA*, Рисунок 53).

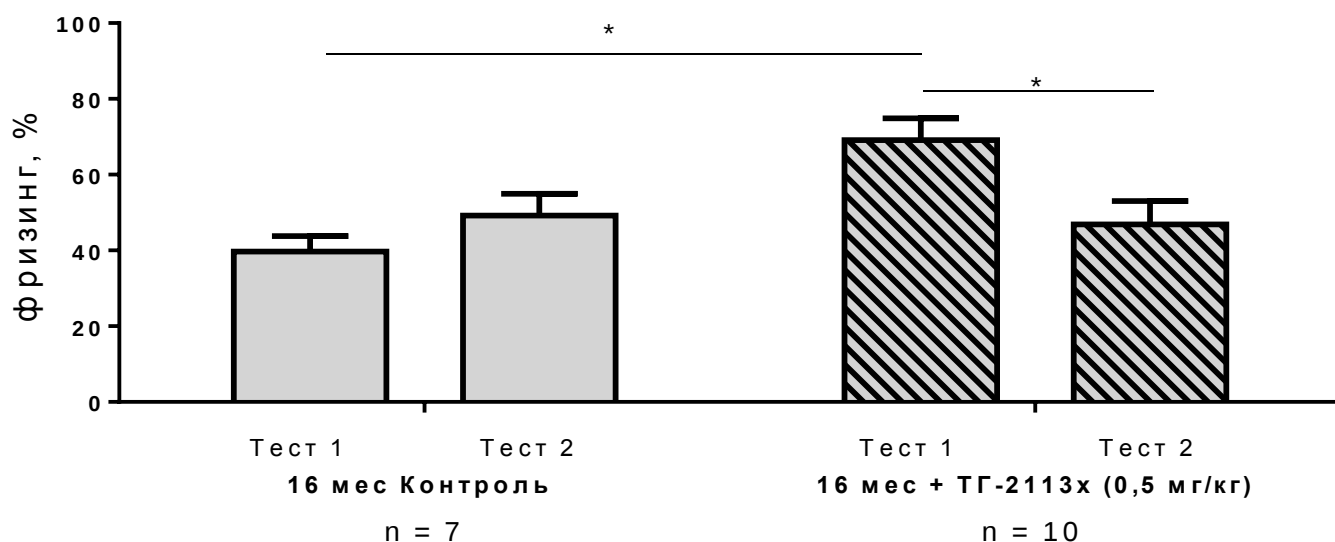


Рисунок 53 Введение ТГ-2113х 16-месячным мышам улучшает запоминание и восстанавливает угашение памяти об аверсивном воздействии. Введение ТГ-2113х увеличивает процент фризинга 16-месячных мышей в тесте 1 по сравнению с контролем. Процент фризинга у контрольной группы 16-

месячных мышей не отличается в тесте 1 и 2, в то время как у 16-месячных мышей, получавших ТГ-2113х, этот показатель ниже в тесте 2. * - $p < 0,05$, двухфакторный ANOVA; No - $p < 0,05$, Манн-Уитни тест.

Эти данные позволяют предположить, что ТГ-2113х улучшает обучение и восстанавливает когнитивную пластичность мышей позднего возраста.

4.5.5.2. ТГ-2113х защищает от скополамин-вызванной амнезии молодых мышей, не влияя на память здоровых животных

В тесте 1 введение скополамина существенно снизило процент фризинга по сравнению с контролем, это нарушение было восстановлено на фоне введения ТГ-2113х ($p=0,0034$ и $p=0,9907$ соответственно; скополамин+ТГ-2113х: $p=0,0115$ по сравнению со скополамином; двухфакторный ANOVA, Рисунок 54). У мышей, которым вводили только ТГ-2113х, данный показатель не отличался от контрольной группы ($p=0,9999$; двухфакторный ANOVA, Рисунок 54).

В тесте 2 процент фризинга отличался от контрольной группы только у мышей, которым вводили скополамин (скополамин: $p=0,0252$; скополамин+ТГ-2113х: $p=0,3831$; ТГ-2113х: $p>0,9999$; двухфакторный ANOVA, Рисунок 54).

У всех групп мышей в тесте 2 процент фризинга достоверно ниже, чем в тесте 1 (контроль: $p=0,0026$; Скополамин: $p=0,0111$; Скополамин+ТГ-2113х: $p<0,0001$; ТГ-2113х: $p=0,0020$; двухфакторный ANOVA, Рисунок 54), что свидетельствует о нормальном угашении памяти у животных.

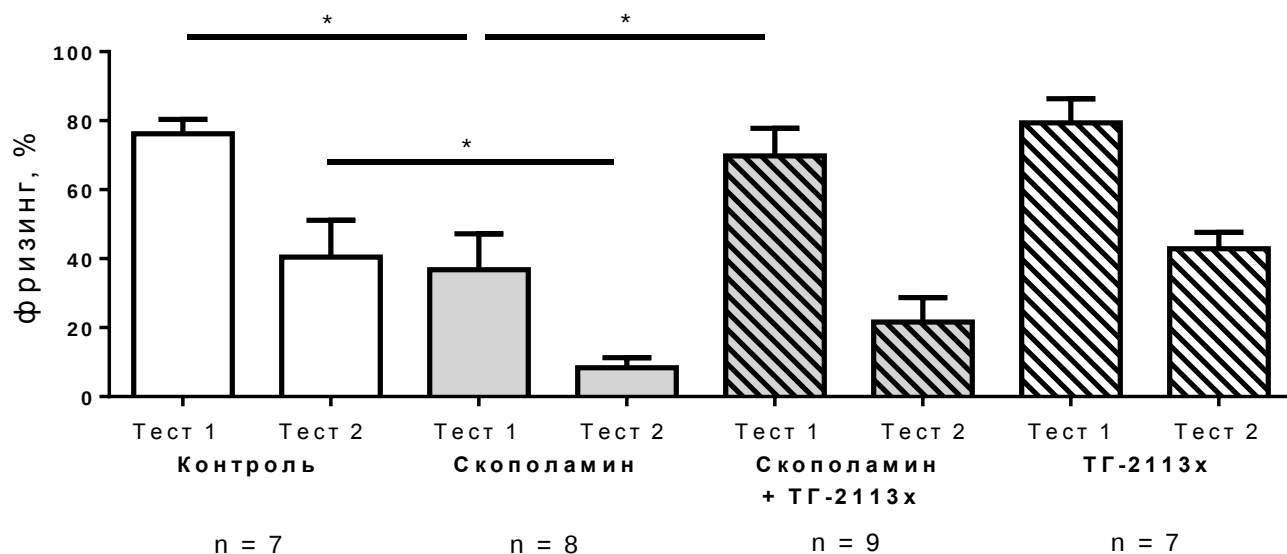


Рисунок 54 Введение ТГ-2113х восстанавливает обучение, нарушенное введением скополамина, до уровня контроля, но не оказывает эффекта на когнитивные функции здоровых мышей. Введение ТГ-2113х предотвращало снижение процента фризинга в тесте 1, но не тесте 2, вызванное скополамином, до уровня контрольных мышей, при этом не оказало влияния на память здоровых мышей. * - $p < 0,05$, двухфакторный ANOVA.

Полученные результаты позволяют предположить, что введение ТГ-2113х восстанавливает нарушенную скополамином способность к формированию памяти. Однако оценка влияния соединения на процесс угашения памяти в представленном протоколе не представляется возможной, т.к. введение скополамина не нарушило этого процесса и мыши из всех групп успешно переучились. Отсутствие влияния скополамина на угашение памяти в представленном протоколе теста согласуется с работами других авторов [303].

4.5.5.3. Влияние ТГ-2113х на формирование памяти у 5xFAD мышей

В тесте 1 процент фризинга у гетерозиготных мышей значительно ниже по сравнению с контролем ($p=0,0008$, рис. 55), это нарушение было

восстановлено на фоне введения ТГ-2113х ($p=0,4924$, рис. 55). У всех групп мышей в тесте 2 процент фризинга не отличался от показателя в тесте 1 (WT: $p>0,9999$; Het: $p=0,3881$; Het+ТГ-2113х: $p=0,9755$, рис. 55), что свидетельствует о нарушенном угашении памяти животных.

Полученные результаты позволяют предположить, что на модели церебрального амилоидоза, 5xFAD мышах, введение ТГ-2113х восстанавливает способность к формированию памяти, но достоверно не восстанавливает нарушенный процесс угашения памяти.

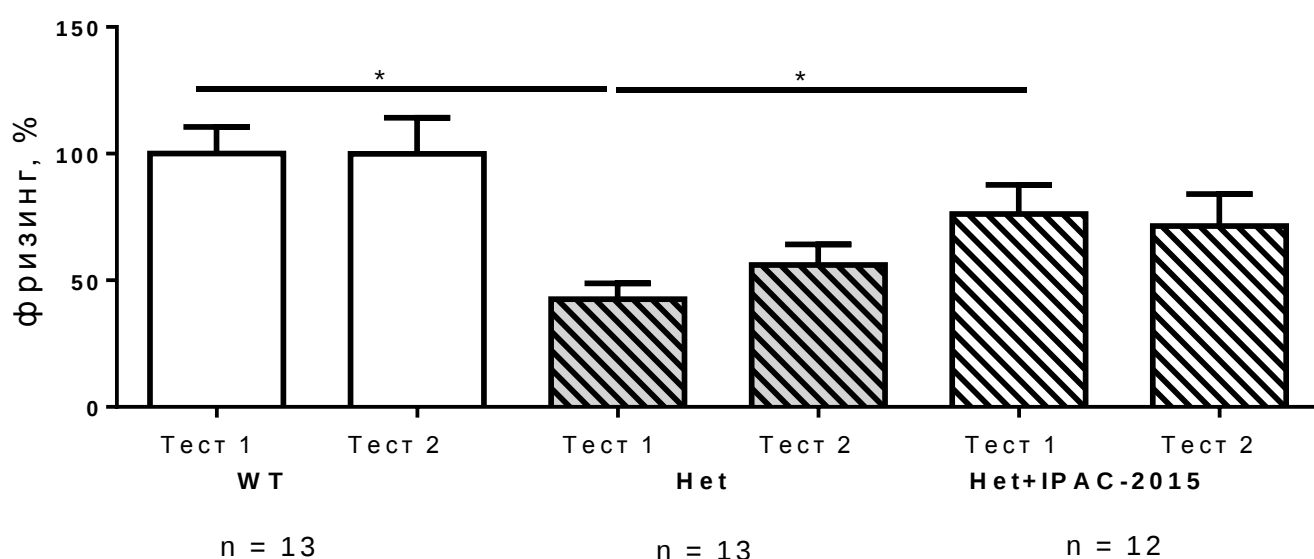


Рисунок 55 ТГ-2113х улучшает формирование памяти, но не оказывает влияния на процесс её угашения у 5xFAD мышей среднего возраста. В тесте 1, у 9-месячных гетерозиготных 5xFAD мышей, получавших ТГ-2113х (Het+ТГ-2113Х), процент фризинга выше, чем у контрольных гетерозиготных мышей (Het) и на уровне животных дикого типа (WT). * - $p < 0,05$, двухфакторный ANOVA; No - Манн-Уитни тест. Данные представлены нормированными к WT.

Не только ассоциативное обучение, но и угашение обретенной памяти, т.е. подавление нерелевантной информации, является важным процессом для нормальной жизнедеятельности, и нарушены у пациентов с деменцией и у пожилых людей в целом. Но если процессы ассоциативного обучения

широко изучаются и предлагаются перспективные терапевтические препараты, направленные на их коррекцию, то патология в процессах угашения обделена вниманием, как со стороны исследователей, так и фармкомпаний. В данной работе с применением 3х моделей нейродегенераций на мышах представлены результаты, предполагающие положительный эффект мультитаргентного соединения ТГ-2113х как на обучение мышей, так и угашение следа памяти.

Таким образом, имеющиеся к настоящему моменту данные позволяет рассматривать это соединение в качестве перспективного кандидата для последующих исследований в качестве оригинального нейропротекторного препарата.

В настоящий момент заканчиваются доклинические испытания безопасности препарата ТГ-2113х, которые показали, что соединение относится к 5 классу токсичности, и не показало значимой токсичности при субхроническом и хроническом введении.

5. ВЫВОДЫ.

1. Обоснована стратегия и разработана методология поиска кандидатов в лекарственные препараты для лечения нейродегенеративных заболеваний с потенциальной нейропротекторной активностью как ингибиторов пор МП, доказавшая свою перспективность при практическом применении.

2. Показано, что перспективным направлением разработки новых нейропротекторов является поиск веществ, увеличивающих устойчивость митохондрий к индукторам МП и не влияющих на формирование мембранного потенциала митохондрий и активность дыхательной цепи митохондрий. Сохранность функциональной активности нейрона требует отсутствия блокады в целом процессов активного транспорта кальция в митохондриях.

3. Установлено, что модельный нейропротектор Димебон и его фторсодержащие производные увеличивают устойчивость митохондрий к индукции МП только в энергизованном состоянии и не влияют на кальций-индуцированное набухание митохондрий в деэнергизованном состоянии.

4. Для ряда модельных и новых синтезированных блокаторов глутаматных рецепторов показано их влияние и на кальций-зависимое открытие пор митохондриальной проницаемости. Обоснована перспективность и реализуемость нового подхода поиска мультитаргетных лекарственных препаратов, механизм действия которых связан одновременно с воздействием на митохондриальные кальций-зависимые функции и глутаматные рецепторы нейронов и которые обеспечивают нейропротекторный эффект и улучшение когнитивных функций

5. Впервые обнаружен ряд соединений, обладающих уникальным действием на кальциевый гомеостаз в митохондриях. На примере конъюгата фтор-содержащего тетрагидрокарбазола и аминаадамантана ТГ-2112х, показано, что данные молекулярные структуры способны блокировать вход кальция в митохондрии при низких клеточных концентрациях кальция и

увеличивать кальциевую ёмкость митохондрий, повышая их устойчивость к кальций-вызванному открытию пор МП.

6. На примерах соединений, обладающих способностью увеличивать устойчивость митохондрий к индукции открытия пМП – монофторсодержащего производного димебона – DF-302 и триптаминового производного секуринина АМ показано значение митопротекторного механизма действия не только для нейропротекции, но и для стимуляции нейрогенеза и снижения тяжести судорожного состояния, соответственно.

7. Валидация нейропротекторного эффекта соединений-лидеров по результатам митохондриальных тестов на *in vitro* и *in vivo* моделях нейродегенерации показала их перспективность для дальнейшего развития как лекарственных препаратов.

8. Два выявленных соединения-лидера успешно прошли доклинические испытания в рамках Государственных контрактов, одно соединение-лидер проходит доклинические испытания в рамках договора с Федеральным государственным бюджетным учреждением «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства России.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fan L., Mao C., Hu X., Zhang S., Yang Z., Hu Z., Sun H., Fan Y., Dong Y., Yang J., Shi C., Xu Y. New Insights Into the Pathogenesis of Alzheimer's Disease // *Front Neurol.* – 2019. – v. 10. – p. 1312.
2. Xie J., Liang R., Wang Y., Huang J., Cao X., Niu B. Progress in Target Drug Molecules for Alzheimer's Disease // *Curr Top Med Chem.* – 2020. – v. 20, № 1. – p. 4-36.
3. Di Resta C., Ferrari M. New molecular approaches to Alzheimer's disease // *Clin Biochem.* – 2019. – v. 72. – p. 81-86.
4. Hou Y., Dan X., Babbar M., Wei Y., Hasselbalch S. G., Croteau D. L., Bohr V. A. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease // *Nat Rev Neurol.* – 2019. – v. 15, № 10. – p. 565-581.
5. Kumar A., Sidhu J., Goyal A., Tsao J. W. Alzheimer Disease // *StatPearls.* – Treasure Island (FL), 2020.
6. Liu P. P., Xie Y., Meng X. Y., Kang J. S. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease // *Signal Transduct Target Ther.* – 2019. – v. 4, № 1. – p. 29.
7. Swerdlow R. H., Burns J. M., Khan S. M. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: progress and perspectives // *Biochim Biophys Acta.* – 2014. – v. 1842, № 8. – p. 1219-31.
8. Cuajungco M. P., Goldstein L. E., Nunomura A., Smith M. A., Lim J. T., Atwood C. S., Huang X., Farrag Y. W., Perry G., Bush A. I. Evidence that the beta-amyloid plaques of Alzheimer's disease represent the redox-silencing and entombment of abeta by zinc // *J Biol Chem.* – 2000. – v. 275, № 26. – p. 19439-42.
9. Reddy P. H., Beal M. F. Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease // *Trends Mol Med.* – 2008. – v. 14, № 2. – p. 45-53.

10. Shevtzova E. F., Kireeva E. G., Bachurin S. O. Effect of beta-amyloid peptide fragment 25-35 on nonselective permeability of mitochondria // Bull Exp Biol Med. – 2001. – v. 132, № 6. – p. 1173-6.
11. Wood H. Mitochondrial dysfunction manifests in the early stages of Alzheimer disease // Nat Rev Neurol. – 2020. – v. 16, № 5. – p. 242.
12. de la Torre J. The Vascular Hypothesis of Alzheimer's Disease: A Key to Preclinical Prediction of Dementia Using Neuroimaging // J Alzheimers Dis. – 2018. – v. 63, № 1. – p. 35-52.
13. Diniz B. S., Butters M. A., Albert S. M., Dew M. A., Reynolds C. F., 3rd. Late-life depression and risk of vascular dementia and Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis of community-based cohort studies // Br J Psychiatry. – 2013. – v. 202, № 5. – p. 329-35.
14. Edwards Iii G. A., Gamez N., Escobedo G., Jr., Calderon O., Moreno-Gonzalez I. Modifiable Risk Factors for Alzheimer's Disease // Front Aging Neurosci. – 2019. – v. 11. – p. 146.
15. Friedman D., Honig L. S., Scarmeas N. Seizures and epilepsy in Alzheimer's disease // CNS Neurosci Ther. – 2012. – v. 18, № 4. – p. 285-94.
16. Li X., Song D., Leng S. X. Link between type 2 diabetes and Alzheimer's disease: from epidemiology to mechanism and treatment // Clin Interv Aging. – 2015. – v. 10. – p. 549-60.
17. Lou D., Du Y., Huang D., Cai F., Zhang Y., Li T., Zhou W., Gao H., Song W. Traumatic Brain Injury Alters the Metabolism and Facilitates Alzheimer's Disease in a Murine Model // Mol Neurobiol. – 2018. – v. 55, № 6. – p. 4928-4939.
18. Rahman S. Mitochondrial disease and epilepsy // Dev Med Child Neurol. – 2012. – v. 54, № 5. – p. 397-406.
19. Vossel K. A., Beagle A. J., Rabinovici G. D., Shu H., Lee S. E., Naasan G., Hegde M., Cornes S. B., Henry M. L., Nelson A. B., Seeley W. W., Geschwind M. D., Gorno-Tempini M. L., Shih T., Kirsch H. E., Garcia P. A., Miller B. L.,

Mucke L. Seizures and epileptiform activity in the early stages of Alzheimer disease // JAMA Neurol. – 2013. – v. 70, № 9. – p. 1158-66.

20. Amatniek J. C., Hauser W. A., DelCastillo-Castaneda C., Jacobs D. M., Marder K., Bell K., Albert M., Brandt J., Stern Y. Incidence and predictors of seizures in patients with Alzheimer's disease // Epilepsia. – 2006. – v. 47, № 5. – p. 867-72.

21. Schnier C., Duncan S., Wilkinson T., Mbizvo G. K., Chin R. F. M. A nationwide, retrospective, data-linkage, cohort study of epilepsy and incident dementia // Neurology. – 2020. – v. 95, № 12. – p. e1686-e1693.

22. Waldbaum S., Patel M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: a contributing link to acquired epilepsy? // J Bioenerg Biomembr. – 2010. – v. 42, № 6. – p. 449-55.

23. Kudin A. P., Kudina T. A., Seyfried J., Vielhaber S., Beck H., Elger C. E., Kunz W. S. Seizure-dependent modulation of mitochondrial oxidative phosphorylation in rat hippocampus // Eur J Neurosci. – 2002. – v. 15, № 7. – p. 1105-14.

24. Folbergrova J., Kunz W. S. Mitochondrial dysfunction in epilepsy // Mitochondrion. – 2012. – v. 12, № 1. – p. 35-40.

25. Kann O., Kovacs R. Mitochondria and neuronal activity // Am J Physiol Cell Physiol. – 2007. – v. 292, № 2. – p. C641-57.

26. Steinlein O. K. Calcium signaling and epilepsy // Cell Tissue Res. – 2014. – v. 357, № 2. – p. 385-93.

27. Reddy A. P., Reddy P. H. Mitochondria-Targeted Molecules as Potential Drugs to Treat Patients With Alzheimer's Disease // Prog Mol Biol Transl Sci. – 2017. – v. 146. – p. 173-201.

28. Shevtsova E. F., Vinogradova D. V., Neganova M. E., Avila-Rodriguez M., Ashraf G. M., Barreto G. E., Bachurin S. O., Aliev G. Mitochondrial Permeability Transition Pore as a Suitable Target for Neuroprotective Agents Against Alzheimer's Disease // CNS Neurol Disord Drug Targets. – 2017. – v. 16, № 6. – p. 677-685.

29. Wilkins H. M., Morris J. K. New Therapeutics to Modulate Mitochondrial Function in Neurodegenerative Disorders // *Curr Pharm Des.* – 2017. – v. 23, № 5. – p. 731-752.
30. Zhang L., Wang H., Zhou X., Mao L., Ding K., Hu Z. Role of mitochondrial calcium uniporter-mediated Ca^{2+} and iron accumulation in traumatic brain injury // *J Cell Mol Med.* – 2019. – v. 23, № 4. – p. 2995-3009.
31. Liao Y., Dong Y., Cheng J. The Function of the Mitochondrial Calcium Uniporter in Neurodegenerative Disorders // *Int J Mol Sci.* – 2017. – v. 18, № 2.
32. Esteras N., Abramov A. Y. Mitochondrial Calcium Deregulation in the Mechanism of Beta-Amyloid and Tau Pathology // *Cells.* – 2020. – v. 9, № 9.
33. Jiang D., Zhao L., Clapham D. E. Genome-wide RNAi screen identifies *Letm1* as a mitochondrial $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter // *Science.* – 2009. – v. 326, № 5949. – p. 144-7.
34. Sparagna G. C., Gunter K. K., Sheu S. S., Gunter T. E. Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode // *J Biol Chem.* – 1995. – v. 270, № 46. – p. 27510-5.
35. Baughman J. M., Perocchi F., Girgis H. S., Plovanich M., Belcher-Timme C. A., Sancak Y., Bao X. R., Strittmatter L., Goldberger O., Bogorad R. L., Koteliansky V., Mootha V. K. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter // *Nature.* – 2011. – v. 476, № 7360. – p. 341-5.
36. Jadiya P., Kolmetzky D. W., Tomar D., Di Meco A., Lombardi A. A., Lambert J. P., Luongo T. S., Ludtmann M. H., Pratico D., Elrod J. W. Impaired mitochondrial calcium efflux contributes to disease progression in models of Alzheimer's disease // *Nat Commun.* – 2019. – v. 10, № 1. – p. 3885.
37. Chetelat G., Desgranges B., de la Sayette V., Viader F., Eustache F., Baron J. C. Mild cognitive impairment: Can FDG-PET predict who is to rapidly convert to Alzheimer's disease? // *Neurology.* – 2003. – v. 60, № 8. – p. 1374-7.

38. Chen Z., Zhong C. Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies // *Prog Neurobiol.* – 2013. – v. 108. – p. 21-43.
39. Kuehn B. M. In Alzheimer Research, Glucose Metabolism Moves to Center Stage // *JAMA.* – 2020. – v. 323, № 4. – p. 297-299.
40. Neth B. J., Craft S. Insulin Resistance and Alzheimer's Disease: Bioenergetic Linkages // *Front Aging Neurosci.* – 2017. – v. 9. – p. 345.
41. de la Monte S. M., Wands J. R. Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed // *J Diabetes Sci Technol.* – 2008. – v. 2, № 6. – p. 1101-13.
42. Kandimalla R., Thirumala V., Reddy P. H. Is Alzheimer's disease a Type 3 Diabetes? A critical appraisal // *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* – 2017. – v. 1863, № 5. – p. 1078-1089.
43. Watson G. S., Craft S. The role of insulin resistance in the pathogenesis of Alzheimer's disease: implications for treatment // *CNS Drugs.* – 2003. – v. 17, № 1. – p. 27-45.
44. Wang W., Zhao F., Ma X., Perry G., Zhu X. Mitochondria dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease: recent advances // *Mol Neurodegener.* – 2020. – v. 15, № 1. – p. 30.
45. Hauptmann S., Scherping I., Droese S., Brandt U., Schulz K. L., Jendrach M., Leuner K., Eckert A., Muller W. E. Mitochondrial dysfunction: an early event in Alzheimer pathology accumulates with age in AD transgenic mice // *Neurobiol Aging.* – 2009. – v. 30, № 10. – p. 1574-86.
46. Teo E., Ravi S., Barardo D., Kim H. S., Fong S., Cazenave-Gassiot A., Tan T. Y., Ching J., Kovalik J. P., Wenk M. R., Gunawan R., Moore P. K., Halliwell B., Tolwinski N., Gruber J. Metabolic stress is a primary pathogenic event in transgenic *Caenorhabditis elegans* expressing pan-neuronal human amyloid beta // *Elife.* – 2019. – v. 8.
47. Wang Y., An H., Liu T., Qin C., Sesaki H., Guo S., Radovick S., Hussain M., Maheshwari A., Wondisford F. E., O'Rourke B., He L. Metformin

Improves Mitochondrial Respiratory Activity through Activation of AMPK // *Cell Rep.* – 2019. – v. 29, № 6. – p. 1511-1523 e5.

48. Isobe C., Abe T., Terayama Y. Increase in the oxidized/total coenzyme Q-10 ratio in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients // *Dement Geriatr Cogn Disord.* – 2009. – v. 28, № 5. – p. 449-54.

49. Orsucci D., Mancuso M., Ienco E. C., LoGerfo A., Siciliano G. Targeting mitochondrial dysfunction and neurodegeneration by means of coenzyme Q10 and its analogues // *Curr Med Chem.* – 2011. – v. 18, № 26. – p. 4053-64.

50. Yang X., Zhang Y., Xu H., Luo X., Yu J., Liu J., Chang R. C. Neuroprotection of Coenzyme Q10 in Neurodegenerative Diseases // *Curr Top Med Chem.* – 2016. – v. 16, № 8. – p. 858-66.

51. Galasko D. R., Peskind E., Clark C. M., Quinn J. F., Ringman J. M., Jicha G. A., Cotman C., Cottrell B., Montine T. J., Thomas R. G., Aisen P. Antioxidants for Alzheimer disease: a randomized clinical trial with cerebrospinal fluid biomarker measures // *Arch Neurol.* – 2012. – v. 69, № 7. – p. 836-41.

52. Gutzmann H., Kuhl K. P., Hadler D., Rapp M. A. Safety and efficacy of idebenone versus tacrine in patients with Alzheimer's disease: results of a randomized, double-blind, parallel-group multicenter study // *Pharmacopsychiatry.* – 2002. – v. 35, № 1. – p. 12-8.

53. Thal L. J., Grundman M., Berg J., Ernstrom K., Margolin R., Pfeiffer E., Weiner M. F., Zamrini E., Thomas R. G. Idebenone treatment fails to slow cognitive decline in Alzheimer's disease // *Neurology.* – 2003. – v. 61, № 11. – p. 1498-502.

54. Bistas E., Sanghavi D. Methylene Blue // *StatPearls.* – Treasure Island (FL), 2020.

55. Schirmer R. H., Adler H., Pickhardt M., Mandelkow E. "Lest we forget you--methylene blue..." // *Neurobiol Aging.* – 2011. – v. 32, № 12. – p. 2325 e7-16.

56. Tucker D., Lu Y., Zhang Q. From Mitochondrial Function to Neuroprotection-an Emerging Role for Methylene Blue // *Mol Neurobiol.* – 2018. – v. 55, № 6. – p. 5137-5153.

57. Yang L., Youngblood H., Wu C., Zhang Q. Mitochondria as a target for neuroprotection: role of methylene blue and photobiomodulation // *Transl Neurodegener.* – 2020. – v. 9, № 1. – p. 19.

58. Atamna H., Nguyen A., Schultz C., Boyle K., Newberry J., Kato H., Ames B. N. Methylene blue delays cellular senescence and enhances key mitochondrial biochemical pathways // *FASEB J.* – 2008. – v. 22, № 3. – p. 703-12.

59. Gabrielli D., Belisle E., Severino D., Kowaltowski A. J., Baptista M. S. Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions // *Photochem Photobiol.* – 2004. – v. 79, № 3. – p. 227-32.

60. Saitow F., Nakaoka Y. The photodynamic action of methylene blue on the ion channels of *Paramecium* causes cell damage // *Photochem Photobiol.* – 1997. – v. 65, № 5. – p. 902-7.

61. Kress M., Petersen M., Reeh P. W. Methylene blue induces ongoing activity in rat cutaneous primary afferents and depolarization of DRG neurons via a photosensitive mechanism // *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* – 1997. – v. 356, № 5. – p. 619-25.

62. Pfaffendorf M., Bruning T. A., Batnik H. D., van Zwieten P. A. The interaction between methylene blue and the cholinergic system // *Br J Pharmacol.* – 1997. – v. 122, № 1. – p. 95-8.

63. Ramsay R. R., Dunford C., Gillman P. K. Methylene blue and serotonin toxicity: inhibition of monoamine oxidase A (MAO A) confirms a theoretical prediction // *Br J Pharmacol.* – 2007. – v. 152, № 6. – p. 946-51.

64. Vutskits L., Briner A., Klauser P., Gascon E., Dayer A. G., Kiss J. Z., Muller D., Licker M. J., Morel D. R. Adverse effects of methylene blue on the central nervous system // *Anesthesiology.* – 2008. – v. 108, № 4. – p. 684-92.

65. Auchter A. M., Shumake J., Gonzalez-Lima F., Monfils M. H. Preventing the return of fear using reconsolidation updating and methylene blue is differentially dependent on extinction learning // *Sci Rep.* – 2017. – v. 7. – p. 46071.

66. Stack C., Jainuddin S., Elipenahli C., Gerges M., Starkova N., Starkov A. A., Jove M., Portero-Otin M., Launay N., Pujol A., Kaidery N. A., Thomas B., Tampellini D., Beal M. F., Dumont M. Methylene blue upregulates Nrf2/ARE genes and prevents tau-related neurotoxicity // *Hum Mol Genet.* – 2014. – v. 23, № 14. – p. 3716-32.

67. Wilcock G. K., Gauthier S., Frisoni G. B., Jia J., Hardlund J. H., Moeblus H. J., Bentham P., Kook K. A., Schelter B. O., Wischik D. J., Davis C. S., Staff R. T., Vuksanovic V., Ahearn T., Bracoud L., Shamsi K., Marek K., Seibyl J., Riedel G., Storey J. M. D., Harrington C. R., Wischik C. M. Potential of Low Dose Leuco-Methylthioninium Bis(Hydromethanesulphonate) (LMTM) Monotherapy for Treatment of Mild Alzheimer's Disease: Cohort Analysis as Modified Primary Outcome in a Phase III Clinical Trial // *J Alzheimers Dis.* – 2018. – v. 61, № 1. – p. 435-457.

68. Lee B. I., Suh Y. S., Chung Y. J., Yu K., Park C. B. Shedding Light on Alzheimer's beta-Amyloidosis: Photosensitized Methylene Blue Inhibits Self-Assembly of beta-Amyloid Peptides and Disintegrates Their Aggregates // *Sci Rep.* – 2017. – v. 7, № 1. – p. 7523.

69. Medina D. X., Caccamo A., Oddo S. Methylene blue reduces abeta levels and rescues early cognitive deficit by increasing proteasome activity // *Brain Pathol.* – 2011. – v. 21, № 2. – p. 140-9.

70. Necula M., Breydo L., Milton S., Kaye R., van der Veer W. E., Tone P., Glabe C. G. Methylene blue inhibits amyloid Abeta oligomerization by promoting fibrillization // *Biochemistry.* – 2007. – v. 46, № 30. – p. 8850-60.

71. Schwab K., Frahm S., Horsley D., Rickard J. E., Melis V., Goatman E. A., Magbagbeolu M., Douglas M., Leith M. G., Baddeley T. C., Storey J. M. D., Riedel G., Wischik C. M., Harrington C. R., Theuring F. A Protein Aggregation

Inhibitor, Leuco-Methylthioninium Bis(Hydromethanesulfonate), Decreases alpha-Synuclein Inclusions in a Transgenic Mouse Model of Synucleinopathy // *Front Mol Neurosci.* – 2017. – v. 10. – p. 447.

72. Soeda Y., Saito M., Maeda S., Ishida K., Nakamura A., Kojima S., Takashima A. Methylene Blue Inhibits Formation of Tau Fibrils but not of Granular Tau Oligomers: A Plausible Key to Understanding Failure of a Clinical Trial for Alzheimer's Disease // *J Alzheimers Dis.* – 2019. – v. 68, № 4. – p. 1677-1686.

73. Sontag E. M., Lotz G. P., Agrawal N., Tran A., Aron R., Yang G., Necula M., Lau A., Finkbeiner S., Glabe C., Marsh J. L., Muchowski P. J., Thompson L. M. Methylene blue modulates huntingtin aggregation intermediates and is protective in Huntington's disease models // *J Neurosci.* – 2012. – v. 32, № 32. – p. 11109-19.

74. Gauthier S., Feldman H. H., Schneider L. S., Wilcock G. K., Frisoni G. B., Hardlund J. H., Moebius H. J., Bentham P., Kook K. A., Wischik D. J., Schelter B. O., Davis C. S., Staff R. T., Bracoud L., Shamsi K., Storey J. M., Harrington C. R., Wischik C. M. Efficacy and safety of tau-aggregation inhibitor therapy in patients with mild or moderate Alzheimer's disease: a randomised, controlled, double-blind, parallel-arm, phase 3 trial // *Lancet.* – 2016. – v. 388, № 10062. – p. 2873-2884.

75. Sanz-Blasco S., Valero R. A., Rodriguez-Crespo I., Villalobos C., Nunez L. Mitochondrial Ca²⁺ overload underlies Abeta oligomers neurotoxicity providing an unexpected mechanism of neuroprotection by NSAIDs // *PLoS One.* – 2008. – v. 3, № 7. – p. e2718.

76. Qin W., Haroutunian V., Katsel P., Cardozo C. P., Ho L., Buxbaum J. D., Pasinetti G. M. PGC-1alpha expression decreases in the Alzheimer disease brain as a function of dementia // *Arch Neurol.* – 2009. – v. 66, № 3. – p. 352-61.

77. Singulani M. P., Pereira C. P. M., Ferreira A. F. F., Garcia P. C., Ferrari G. D., Alberici L. C., Britto L. R. Impairment of PGC-1alpha-mediated mitochondrial biogenesis precedes mitochondrial dysfunction and Alzheimer's

pathology in the 3xTg mouse model of Alzheimer's disease // *Exp Gerontol.* – 2020. – v. 133. – p. 110882.

78. Ciron C., Lengacher S., Dusonchet J., Aebischer P., Schneider B. L. Sustained expression of PGC-1alpha in the rat nigrostriatal system selectively impairs dopaminergic function // *Hum Mol Genet.* – 2012. – v. 21, № 8. – p. 1861-76.

79. Dumont M., Stack C., Elipenahli C., Jainuddin S., Gerges M., Starkova N., Calingasan N. Y., Yang L., Tampellini D., Starkov A. A., Chan R. B., Di Paolo G., Pujol A., Beal M. F. Bezafibrate administration improves behavioral deficits and tau pathology in P301S mice // *Hum Mol Genet.* – 2012. – v. 21, № 23. – p. 5091-105.

80. Escribano L., Simon A. M., Perez-Mediavilla A., Salazar-Colocho P., Del Rio J., Frechilla D. Rosiglitazone reverses memory decline and hippocampal glucocorticoid receptor down-regulation in an Alzheimer's disease mouse model // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2009. – v. 379, № 2. – p. 406-10.

81. Risner M. E., Saunders A. M., Altman J. F., Ormandy G. C., Craft S., Foley I. M., Zvartau-Hind M. E., Hosford D. A., Roses A. D. Efficacy of rosiglitazone in a genetically defined population with mild-to-moderate Alzheimer's disease // *Pharmacogenomics J.* – 2006. – v. 6, № 4. – p. 246-54.

82. Sato T., Hanyu H., Hirao K., Kanetaka H., Sakurai H., Iwamoto T. Efficacy of PPAR-gamma agonist pioglitazone in mild Alzheimer disease // *Neurobiol Aging.* – 2011. – v. 32, № 9. – p. 1626-33.

83. Strum J. C., Shehee R., Virley D., Richardson J., Mattie M., Selley P., Ghosh S., Nock C., Saunders A., Roses A. Rosiglitazone induces mitochondrial biogenesis in mouse brain // *J Alzheimers Dis.* – 2007. – v. 11, № 1. – p. 45-51.

84. Wenz T., Diaz F., Spiegelman B. M., Moraes C. T. Activation of the PPAR/PGC-1alpha pathway prevents a bioenergetic deficit and effectively improves a mitochondrial myopathy phenotype // *Cell Metab.* – 2008. – v. 8, № 3. – p. 249-56.

85. Yang K., Chen Z., Gao J., Shi W., Li L., Jiang S., Hu H., Liu Z., Xu D., Wu L. The Key Roles of GSK-3 β in Regulating Mitochondrial Activity // *Cell Physiol Biochem.* – 2017. – v. 44, № 4. – p. 1445-1459.

86. Haworth R. A., Hunter D. R. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site // *Arch Biochem Biophys.* – 1979. – v. 195, № 2. – p. 460-7.

87. Barsukova A., Komarov A., Hajnoczky G., Bernardi P., Bourdette D., Forte M. Activation of the mitochondrial permeability transition pore modulates Ca²⁺ responses to physiological stimuli in adult neurons // *Eur J Neurosci.* – 2011. – v. 33, № 5. – p. 831-42.

88. Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? // *Front Physiol.* – 2013. – v. 4. – p. 95.

89. Boyman L., Coleman A. K., Zhao G., Wescott A. P., Joca H. C., Greiser B. M., Karbowski M., Ward C. W., Lederer W. J. Dynamics of the mitochondrial permeability transition pore: Transient and permanent opening events // *Arch Biochem Biophys.* – 2019. – v. 666. – p. 31-39.

90. Kwong J. Q., Molkenstein J. D. Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart // *Cell Metab.* – 2015. – v. 21, № 2. – p. 206-214.

91. Mnatsakanyan N., Beutner G., Porter G. A., Alavian K. N., Jonas E. A. Physiological roles of the mitochondrial permeability transition pore // *J Bioenerg Biomembr.* – 2017. – v. 49, № 1. – p. 13-25.

92. Perez M. J., Quintanilla R. A. Development or disease: duality of the mitochondrial permeability transition pore // *Dev Biol.* – 2017. – v. 426, № 1. – p. 1-7.

93. Hou Y., Mattson M. P., Cheng A. Permeability transition pore-mediated mitochondrial superoxide flashes regulate cortical neural progenitor differentiation // *PLoS One.* – 2013. – v. 8, № 10. – p. e76721.

94. Pfeiffer D. R., Schmid P. C., Beatrice M. C., Schmid H. H. Intramitochondrial phospholipase activity and the effects of Ca²⁺ plus N-

ethylmaleimide on mitochondrial function // J Biol Chem. – 1979. – v. 254, № 22. – p. 11485-94.

95. Pavlov E., Zakharian E., Bladen C., Diao C. T., Grimbly C., Reusch R. N., French R. J. A large, voltage-dependent channel, isolated from mitochondria by water-free chloroform extraction // Biophys J. – 2005. – v. 88, № 4. – p. 2614-25.

96. Smithen M., Elustondo P. A., Winkfein R., Zakharian E., Abramov A. Y., Pavlov E. Role of polyhydroxybutyrate in mitochondrial calcium uptake // Cell Calcium. – 2013. – v. 54, № 2. – p. 86-94.

97. Abramov A. Y., Fraley C., Diao C. T., Winkfein R., Colicos M. A., Duchen M. R., French R. J., Pavlov E. Targeted polyphosphatase expression alters mitochondrial metabolism and inhibits calcium-dependent cell death // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2007. – v. 104, № 46. – p. 18091-6.

98. Baev A. Y., Angelova P. R., Abramov A. Y. Inorganic polyphosphate is produced and hydrolyzed in F₀F₁-ATP synthase of mammalian mitochondria // Biochem J. – 2020. – v. 477, № 8. – p. 1515-1524.

99. Elustondo P. A., Nichols M., Negoda A., Thirumaran A., Zakharian E., Robertson G. S., Pavlov E. V. Mitochondrial permeability transition pore induction is linked to formation of the complex of ATPase C-subunit, polyhydroxybutyrate and inorganic polyphosphate // Cell Death Discov. – 2016. – v. 2. – p. 16070.

100. Bauer T. M., Murphy E. Role of Mitochondrial Calcium and the Permeability Transition Pore in Regulating Cell Death // Circ Res. – 2020. – v. 126, № 2. – p. 280-293.

101. Carroll J., He J., Ding S., Fearnley I. M., Walker J. E. Persistence of the permeability transition pore in human mitochondria devoid of an assembled ATP synthase // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2019. – v. 116, № 26. – p. 12816-12821.

102. He J., Carroll J., Ding S., Fearnley I. M., Walker J. E. Permeability transition in human mitochondria persists in the absence of peripheral stalk subunits of ATP synthase // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2017. – v. 114, № 34. – p. 9086-9091.

103. Sileikyte J., Forte M. The Mitochondrial Permeability Transition in Mitochondrial Disorders // *Oxid Med Cell Longev.* – 2019. – v. 2019. – p. 3403075.
104. Varanyuwatana P., Halestrap A. P. The roles of phosphate and the phosphate carrier in the mitochondrial permeability transition pore // *Mitochondrion.* – 2012. – v. 12, № 1. – p. 120-5.
105. Gutierrez-Aguilar M., Baines C. P. Structural mechanisms of cyclophilin D-dependent control of the mitochondrial permeability transition pore // *Biochim Biophys Acta.* – 2015. – v. 1850, № 10. – p. 2041-7.
106. Porter G. A., Jr., Beutner G. Cyclophilin D, Somehow a Master Regulator of Mitochondrial Function // *Biomolecules.* – 2018. – v. 8, № 4.
107. Andres R. H., Huber A. W., Schlattner U., Perez-Bouza A., Krebs S. H., Seiler R. W., Wallimann T., Widmer H. R. Effects of creatine treatment on the survival of dopaminergic neurons in cultured fetal ventral mesencephalic tissue // *Neuroscience.* – 2005. – v. 133, № 3. – p. 701-13.
108. Azarashvili T., Krestinina O., Baburina Y., Odinokova I., Grachev D., Papadopoulos V., Akatov V., Lemasters J. J., Reiser G. Combined effect of G3139 and TSPO ligands on Ca^{2+} -induced permeability transition in rat brain mitochondria // *Arch Biochem Biophys.* – 2015. – v. 587. – p. 70-7.
109. Bernardi P., Rasola A., Forte M., Lippe G. The Mitochondrial Permeability Transition Pore: Channel Formation by F-ATP Synthase, Integration in Signal Transduction, and Role in Pathophysiology // *Physiol Rev.* – 2015. – v. 95, № 4. – p. 1111-55.
110. Dolder M., Wendt S., Wallimann T. Mitochondrial creatine kinase in contact sites: interaction with porin and adenine nucleotide translocase, role in permeability transition and sensitivity to oxidative damage // *Biol Signals Recept.* – 2001. – v. 10, № 1-2. – p. 93-111.
111. Fontaine E., Bernardi P. Progress on the mitochondrial permeability transition pore: regulation by complex I and ubiquinone analogs // *J Bioenerg Biomembr.* – 1999. – v. 31, № 4. – p. 335-45.

112. Kowaltowski A. J., Castilho R. F., Vercesi A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress // *FEBS Lett.* – 2001. – v. 495, № 1-2. – p. 12-5.
113. Camilleri A., Zarb C., Caruana M., Ostermeier U., Ghio S., Hogen T., Schmidt F., Giese A., Vassallo N. Mitochondrial membrane permeabilisation by amyloid aggregates and protection by polyphenols // *Biochim Biophys Acta.* – 2013. – v. 1828, № 11. – p. 2532-43.
114. Kim J., Yang Y., Song S. S., Na J. H., Oh K. J., Jeong C., Yu Y. G., Shin Y. K. Beta-amyloid oligomers activate apoptotic BAK pore for cytochrome c release // *Biophys J.* – 2014. – v. 107, № 7. – p. 1601-8.
115. Durell S. R., Guy H. R., Arispe N., Rojas E., Pollard H. B. Theoretical models of the ion channel structure of amyloid beta-protein // *Biophys J.* – 1994. – v. 67, № 6. – p. 2137-45.
116. Jang H., Zheng J., Nussinov R. Models of beta-amyloid ion channels in the membrane suggest that channel formation in the bilayer is a dynamic process // *Biophys J.* – 2007. – v. 93, № 6. – p. 1938-49.
117. Lal R., Lin H., Quist A. P. Amyloid beta ion channel: 3D structure and relevance to amyloid channel paradigm // *Biochim Biophys Acta.* – 2007. – v. 1768, № 8. – p. 1966-75.
118. Schiavone M., Zulian A., Menazza S., Petronilli V., Argenton F., Merlini L., Sabatelli P., Bernardi P. Alisporivir rescues defective mitochondrial respiration in Duchenne muscular dystrophy // *Pharmacol Res.* – 2017. – v. 125, № Pt B. – p. 122-131.
119. Park I., Londhe A. M., Lim J. W., Park B. G., Jung S. Y., Lee J. Y., Lim S. M., No K. T., Lee J., Pae A. N. Discovery of non-peptidic small molecule inhibitors of cyclophilin D as neuroprotective agents in Abeta-induced mitochondrial dysfunction // *J Comput Aided Mol Des.* – 2017. – v. 31, № 10. – p. 929-941.
120. Valasani K. R., Sun Q., Fang D., Zhang Z., Yu Q., Guo Y., Li J., Roy A., ShiDu Yan S. Identification of a Small Molecule Cyclophilin D Inhibitor for

Rescuing Abeta-Mediated Mitochondrial Dysfunction // ACS Med Chem Lett. – 2016. – v. 7, № 3. – p. 294-9.

121. Valasani K. R., Vangavaragu J. R., Day V. W., Yan S. S. Structure based design, synthesis, pharmacophore modeling, virtual screening, and molecular docking studies for identification of novel cyclophilin D inhibitors // J Chem Inf Model. – 2014. – v. 54, № 3. – p. 902-12.

122. Briston T., Selwood D. L., Szabadkai G., Duchen M. R. Mitochondrial Permeability Transition: A Molecular Lesion with Multiple Drug Targets // Trends Pharmacol Sci. – 2019. – v. 40, № 1. – p. 50-70.

123. Keinan N., Pahima H., Ben-Hail D., Shoshan-Barmatz V. The role of calcium in VDAC1 oligomerization and mitochondria-mediated apoptosis // Biochim Biophys Acta. – 2013. – v. 1833, № 7. – p. 1745-54.

124. Zalk R., Israelson A., Garty E. S., Azoulay-Zohar H., Shoshan-Barmatz V. Oligomeric states of the voltage-dependent anion channel and cytochrome c release from mitochondria // Biochem J. – 2005. – v. 386, № Pt 1. – p. 73-83.

125. Ben-Hail D., Begas-Shvartz R., Shalev M., Shteinifer-Kuzmine A., Gruzman A., Reina S., De Pinto V., Shoshan-Barmatz V. Novel Compounds Targeting the Mitochondrial Protein VDAC1 Inhibit Apoptosis and Protect against Mitochondrial Dysfunction // J Biol Chem. – 2016. – v. 291, № 48. – p. 24986-25003.

126. Martin L. J., Fancelli D., Wong M., Niedzwiecki M., Ballarini M., Plyte S., Chang Q. GNX-4728, a novel small molecule drug inhibitor of mitochondrial permeability transition, is therapeutic in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis // Front Cell Neurosci. – 2014. – v. 8. – p. 433.

127. Briston T., Lewis S., Koglin M., Mistry K., Shen Y., Hartopp N., Katsumata R., Fukumoto H., Duchen M. R., Szabadkai G., Staddon J. M., Roberts M., Powney B. Identification of ER-000444793, a Cyclophilin D-independent inhibitor of mitochondrial permeability transition, using a high-throughput screen in cryopreserved mitochondria // Sci Rep. – 2016. – v. 6. – p. 37798.

128. Sileikyte J., Forte M. Shutting down the pore: The search for small molecule inhibitors of the mitochondrial permeability transition // *Biochim Biophys Acta*. – 2016. – v. 1857, № 8. – p. 1197-1202.
129. Bachurin S., Bukatina E., Lermontova N., Tkachenko S., Afanasiev A., Grigoriev V., Grigorieva I., Ivanov Y., Sablin S., Zefirov N. Antihistamine agent Dimebon as a novel neuroprotector and a cognition enhancer // *Ann N Y Acad Sci*. – 2001. – v. 939. – p. 425-35.
130. Bachurin S. O., Shevtsova E. P., Kireeva E. G., Oxenkrug G. F., Sablin S. O. Mitochondria as a target for neurotoxins and neuroprotective agents // *Ann N Y Acad Sci*. – 2003. – v. 993. – p. 334-44; discussion 345-9.
131. Grigorev V. V., Dranyi O. A., Bachurin S. O. Comparative study of action mechanisms of dimebon and memantine on AMPA- and NMDA-subtypes glutamate receptors in rat cerebral neurons // *Bull Exp Biol Med*. – 2003. – v. 136, № 5. – p. 474-7.
132. Ustyugov A., Shevtsova E., Ashraf G. M., Tarasov V. V., Bachurin S. O., Aliev G. New Therapeutic Property of Dimebon as a Neuroprotective Agent // *Curr Med Chem*. – 2018. – v. 25, № 39. – p. 5315-5326.
133. Vasilieva N. A., Shevtsova E. F., Van'kin G. I., Lermontova N. N., Serkova T. P., Nikolaeva N. S., Bachurin S. O. Wave-Like Dose-Dependence of the Stimulating Effects of Dimebon on Cognition in a Wide Dose Range // *Bull Exp Biol Med*. – 2019. – v. 167, № 6. – p. 740-743.
134. Алесенко А.В., Бачурин С. О., Каратассо Ю.О., Коротаева А.А., Шевцова Е.Ф., Шингарова Л.Н. . Коррекция димебоном нарушений состава фосфолипидов в структурах мозга, вызванных фактором некроза опухоли в эксперименте // *Журнал Неврологии и психиатрии им. Корсакова*. – 2018. – Т. 118, № 8. – p. 91-97.
135. Shevtsova E. F., Vinogradova D. V., Kireeva E. G., Reddy V. P., Aliev G., Bachurin S. O. Dimebon attenuates the Abeta-induced mitochondrial permeabilization // *Curr Alzheimer Res*. – 2014. – v. 11, № 5. – p. 422-9.

136. Zhang S., Hedskog L., Petersen C. A., Winblad B., Ankarcrona M. Dimebon (latrepirdine) enhances mitochondrial function and protects neuronal cells from death // *J Alzheimers Dis.* – 2010. – v. 21, № 2. – p. 389-402.

137. Rothstein J. D. Edaravone: A new drug approved for ALS // *Cell.* – 2017. – v. 171, № 4. – p. 725.

138. Takayasu Y., Nakaki J., Kawasaki T., Koda K., Ago Y., Baba A., Matsuda T. Edaravone, a radical scavenger, inhibits mitochondrial permeability transition pore in rat brain // *J Pharmacol Sci.* – 2007. – v. 103, № 4. – p. 434-7.

139. Zhang G. L., Zhang L., Guo Y. Y., Ma Z. L., Wang H. Y., Li T., Liu J., Du Y., Yao L., Li T. T., Du J. M. Protective Effect of Edaravone Against Abeta25-35-Induced Mitochondrial Oxidative Damage in SH-SY5Y Cells // *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* – 2017. – v. 63, № 5. – p. 36-42.

140. Rupprecht R., Papadopoulos V., Rammes G., Baghai T. C., Fan J., Akula N., Groyer G., Adams D., Schumacher M. Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders // *Nat Rev Drug Discov.* – 2010. – v. 9, № 12. – p. 971-88.

141. Azarashvili T., Grachev D., Krestinina O., Evtodienko Y., Yurkov I., Papadopoulos V., Reiser G. The peripheral-type benzodiazepine receptor is involved in control of Ca²⁺-induced permeability transition pore opening in rat brain mitochondria // *Cell Calcium.* – 2007. – v. 42, № 1. – p. 27-39.

142. Baburina Y., Krestinin R., Odinokova I., Sotnikova L., Kruglov A., Krestinina O. Astaxanthin Inhibits Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening in Rat Heart Mitochondria // *Antioxidants (Basel).* – 2019. – v. 8, № 12.

143. Bono F., Lamarche I., Prabonnaud V., Le Fur G., Herbert J. M. Peripheral benzodiazepine receptor agonists exhibit potent antiapoptotic activities // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1999. – v. 265, № 2. – p. 457-61.

144. Shehadeh M., Palzur E., Apel L., Soustiel J. F. Reduction of Traumatic Brain Damage by Tspo Ligand Etifoxine // *Int J Mol Sci.* – 2019. – v. 20, № 11.

145. Wu Y., Kazumura K., Maruyama W., Osawa T., Naoi M. Rasagiline and selegiline suppress calcium efflux from mitochondria by PK11195-induced

opening of mitochondrial permeability transition pore: a novel anti-apoptotic function for neuroprotection // *J Neural Transm (Vienna)*. – 2015. – v. 122, № 10. – p. 1399-407.

146. Elkamhawy A., Park J. E., Hassan A. H. E., Pae A. N., Lee J., Park B. G., Paik S., Do J., Park J. H., Park K. D., Moon B., Park W. K., Cho H., Jeong D. Y., Roh E. J. Design, synthesis, biological evaluation and molecular modelling of 2-(2-aryloxyphenyl)-1,4-dihydroisoquinolin-3(2H)-ones: A novel class of TSPO ligands modulating amyloid-beta-induced mPTP opening // *Eur J Pharm Sci*. – 2017. – v. 104. – p. 366-381.

147. Grimm A., Lejri I., Halle F., Schmitt M., Gotz J., Bihel F., Eckert A. Mitochondria modulatory effects of new TSPO ligands in a cellular model of tauopathies // *J Neuroendocrinol*. – 2020. – v. 32, № 1. – p. e12796.

148. Hallé F., Lejri I., Abarghaz M., Grimm A., Klein C., Maitre M., Schmitt M., Bourguignon J.-J., Mensah-Nyagan A. G., Eckert A., Bihel F. Discovery of Imidazoquinazolinone Derivatives as TSPO Ligands Modulating Neurosteroidogenesis and Cellular Bioenergetics in Neuroblastoma Cells Expressing Amyloid Precursor Protein // *ChemistrySelect*. – 2017. – v. 2, № 22. – p. 6452-6457.

149. Bordet T., Buisson B., Michaud M., Drouot C., Galea P., Delaage P., Akentieva N. P., Evers A. S., Covey D. F., Ostuni M. A., Lacapere J. J., Massaad C., Schumacher M., Steidl E. M., Maux D., Delaage M., Henderson C. E., Pruss R. M. Identification and characterization of cholest-4-en-3-one, oxime (TRO19622), a novel drug candidate for amyotrophic lateral sclerosis // *J Pharmacol Exp Ther*. – 2007. – v. 322, № 2. – p. 709-20.

150. Eckert G. P., Eckert S. H., Eckmann J., Hagl S., Muller W. E., Friedland K. Olesoxime improves cerebral mitochondrial dysfunction and enhances Abeta levels in preclinical models of Alzheimer's disease // *Exp Neurol*. – 2020. – v. 329. – p. 113286.

151. Morshead C. M., Reynolds B. A., Craig C. G., McBurney M. W., Staines W. A., Morassutti D., Weiss S., van der Kooy D. Neural stem cells in the

adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells // *Neuron*. – 1994. – v. 13, № 5. – p. 1071-82.

152. McDonald H. Y., Wojtowicz J. M. Dynamics of neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats // *Neurosci Lett*. – 2005. – v. 385, № 1. – p. 70-5.

153. Ryu J. R., Hong C. J., Kim J. Y., Kim E. K., Sun W., Yu S. W. Control of adult neurogenesis by programmed cell death in the mammalian brain // *Mol Brain*. – 2016. – v. 9. – p. 43.

154. Chow A., Morshead C. M. Cyclosporin A enhances neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus // *Stem Cell Res*. – 2016. – v. 16, № 1. – p. 79-87.

155. Pieper A. A., Xie S., Capota E., Estill S. J., Zhong J., Long J. M., Becker G. L., Huntington P., Goldman S. E., Shen C. H., Capota M., Britt J. K., Kotti T., Ure K., Brat D. J., Williams N. S., MacMillan K. S., Naidoo J., Melito L., Hsieh J., De Brabander J., Ready J. M., McKnight S. L. Discovery of a proneurogenic, neuroprotective chemical // *Cell*. – 2010. – v. 142, № 1. – p. 39-51.

156. Shin J. Y., Kong S. Y., Yoon H. J., Ann J., Lee J., Kim H. J. An Aminopropyl Carbazole Derivative Induces Neurogenesis by Increasing Final Cell Division in Neural Stem Cells // *Biomol Ther (Seoul)*. – 2015. – v. 23, № 4. – p. 313-9.

157. Albeni B. C., Sullivan P. G., Thompson M. B., Scheff S. W., Mattson M. P. Cyclosporin ameliorates traumatic brain-injury-induced alterations of hippocampal synaptic plasticity // *Exp Neurol*. – 2000. – v. 162, № 2. – p. 385-9.

158. Bachurin S. O., Shevtzova E. P., Lermontova N. N., Serkova T. P., Ramsay R. R. The effect of dithiocarbamates on neurotoxic action of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine (MPTP) and on mitochondrial respiration chain // *Neurotoxicology*. – 1996. – v. 17, № 3-4. – p. 897-903.

159. Raefsky S. M., Mattson M. P. Adaptive responses of neuronal mitochondria to bioenergetic challenges: Roles in neuroplasticity and disease resistance // *Free Radic Biol Med*. – 2017. – v. 102. – p. 203-216.

160. Haydon P. G., Carmignoto G. Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling // *Physiol Rev.* – 2006. – v. 86, № 3. – p. 1009-31.
161. Malenka R. C., Bear M. F. LTP and LTD: an embarrassment of riches // *Neuron.* – 2004. – v. 44, № 1. – p. 5-21.
162. Ruthel G., Hollenbeck P. J. Response of mitochondrial traffic to axon determination and differential branch growth // *J Neurosci.* – 2003. – v. 23, № 24. – p. 8618-24.
163. Weeber E. J., Levy M., Sampson M. J., Anflous K., Armstrong D. L., Brown S. E., Sweatt J. D., Craigen W. J. The role of mitochondrial porins and the permeability transition pore in learning and synaptic plasticity // *J Biol Chem.* – 2002. – v. 277, № 21. – p. 18891-7.
164. Selkoe D. J. Alzheimer's disease is a synaptic failure // *Science.* – 2002. – v. 298, № 5594. – p. 789-91.
165. Bagetta V., Barone I., Ghiglieri V., Di Filippo M., Sgobio C., Bernardi G., Calabresi P., Picconi B. Acetyl-L-Carnitine selectively prevents post-ischemic LTP via a possible action on mitochondrial energy metabolism // *Neuropharmacology.* – 2008. – v. 55, № 2. – p. 223-9.
166. Genrikhs E. E., Stelmashook E. V., Popova O. V., Kapay N. A., Korshunova G. A., Sumbatyan N. V., Skrebitsky V. G., Skulachev V. P., Isaev N. K. Mitochondria-targeted antioxidant SkQT1 decreases trauma-induced neurological deficit in rat and prevents amyloid-beta-induced impairment of long-term potentiation in rat hippocampal slices // *J Drug Target.* – 2015. – v. 23, № 4. – p. 347-52.
167. Batool A., Kamal M. A., Rizvi S. M. D., Rashid S. Topical Discoveries on Multi-Target Approach to Manage Alzheimer's Disease // *Curr Drug Metab.* – 2018. – v. 19, № 8. – p. 704-713.
168. Magi S., Piccirillo S., Preziuso A., Amoroso S., Lariccia V. Mitochondrial localization of NCXs: Balancing calcium and energy homeostasis // *Cell Calcium.* – 2020. – v. 86. – p. 102162.

169. Wang Q., Zhang H., Xu H., Guo D., Shi H., Li Y., Zhang W., Gu Y. 5-HTR3 and 5-HTR4 located on the mitochondrial membrane and functionally regulated mitochondrial functions // *Sci Rep.* – 2016. – v. 6. – p. 37336.
170. Gergalova G., Lykhmus O., Kalashnyk O., Koval L., Chernyshov V., Kryukova E., Tsetlin V., Komisarenko S., Skok M. Mitochondria express $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors to regulate Ca^{2+} accumulation and cytochrome c release: study on isolated mitochondria // *PLoS One.* – 2012. – v. 7, № 2. – p. e31361.
171. Lykhmus O., Voytenko L. P., Lips K. S., Bergen I., Krasteva-Christ G., Vetter D. E., Kummer W., Skok M. Nicotinic Acetylcholine Receptor $\alpha 9$ and $\alpha 10$ Subunits Are Expressed in the Brain of Mice // *Front Cell Neurosci.* – 2017. – v. 11. – p. 282.
172. Hashimoto M., Kazui H., Matsumoto K., Nakano Y., Yasuda M., Mori E. Does donepezil treatment slow the progression of hippocampal atrophy in patients with Alzheimer's disease? // *Am J Psychiatry.* – 2005. – v. 162, № 4. – p. 676-82.
173. Ye C. Y., Lei Y., Tang X. C., Zhang H. Y. Donepezil attenuates Abeta-associated mitochondrial dysfunction and reduces mitochondrial Abeta accumulation in vivo and in vitro // *Neuropharmacology.* – 2015. – v. 95. – p. 29-36.
174. Arias E., Gallego-Sandin S., Villarroya M., Garcia A. G., Lopez M. G. Unequal neuroprotection afforded by the acetylcholinesterase inhibitors galantamine, donepezil, and rivastigmine in SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of nicotinic receptors // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2005. – v. 315, № 3. – p. 1346-53.
175. Kume T., Takada-Takatori Y. Nicotinic Acetylcholine Receptor Signaling: Roles in Neuroprotection // *Nicotinic Acetylcholine Receptor Signaling in Neuroprotection* / Akaike A. и др. – Singapore, 2018. – p. 59-71.
176. Gingrich J. R., Pelkey K. A., Fam S. R., Huang Y., Petralia R. S., Wenthold R. J., Salter M. W. Unique domain anchoring of Src to synaptic NMDA

receptors via the mitochondrial protein NADH dehydrogenase subunit 2 // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2004. – v. 101, № 16. – p. 6237-42.

177. Nesterov S. V., Skorobogatova Y. A., Panteleeva A. A., Pavlik L. L., Mikheeva I. B., Yaguzhinsky L. S., Nartsissov Y. R. NMDA and GABA receptor presence in rat heart mitochondria // *Chem Biol Interact*. – 2018. – v. 291. – p. 40-46.

178. Korde A. S., Maragos W. F. Identification of an N-methyl-D-aspartate receptor in isolated nervous system mitochondria // *J Biol Chem*. – 2012. – v. 287, № 42. – p. 35192-200.

179. Ustyugov A., Shevtsova E., Bachurin S. Novel Sites of Neuroprotective Action of Dimebon (Latrepirdine) // *Mol Neurobiol*. – 2015. – v. 52, № 2. – p. 970-8.

180. Zheng H., Fridkin M., Youdim M. From single target to multitarget/network therapeutics in Alzheimer's therapy // *Pharmaceuticals (Basel)*. – 2014. – v. 7, № 2. – p. 113-35.

181. Bachurin S. O., Bovina E. V., Ustyugov A. A. Drugs in Clinical Trials for Alzheimer's Disease: The Major Trends // *Med Res Rev*. – 2017. – v. 37, № 5. – p. 1186-1225.

182. Cummings J., Ritter A., Zhong K. Clinical Trials for Disease-Modifying Therapies in Alzheimer's Disease: A Primer, Lessons Learned, and a Blueprint for the Future // *J Alzheimers Dis*. – 2018. – v. 64, № s1. – p. S3-S22.

183. Ettcheto M., Busquets O., Espinosa-Jimenez T., Verdaguer E., Auladell C., Camins A. A Chronological Review of Potential Disease-Modifying Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease // *Curr Pharm Des*. – 2020. – v. 26, № 12. – p. 1286-1299.

184. Davis J. N., Hunnicutt E. J., Jr., Chisholm J. C. A mitochondrial bottleneck hypothesis of Alzheimer's disease // *Mol Med Today*. – 1995. – v. 1, № 5. – p. 240-7.

185. Swerdlow R. H. Mitochondria and cell bioenergetics: increasingly recognized components and a possible etiologic cause of Alzheimer's disease // *Antioxid Redox Signal.* – 2012. – v. 16, № 12. – p. 1434-55.
186. Lanzillotta C., Di Domenico F., Perluigi M., Butterfield D. A. Targeting Mitochondria in Alzheimer Disease: Rationale and Perspectives // *CNS Drugs.* – 2019. – v. 33, № 10. – p. 957-969.
187. Oliver D. M. A., Reddy P. H. Small molecules as therapeutic drugs for Alzheimer's disease // *Mol Cell Neurosci.* – 2019. – v. 96. – p. 47-62.
188. Van Giau V., An S. S. A., Hulme J. P. Mitochondrial therapeutic interventions in Alzheimer's disease // *J Neurol Sci.* – 2018. – v. 395. – p. 62-70.
189. Benfeito S., Fernandes C., Vilar S., Remiao F., Uriarte E., Borges F. Exploring the Multi-Target Performance of Mitochondriotropic Antioxidants against the Pivotal Alzheimer's Disease Pathophysiological Hallmarks // *Molecules.* – 2020. – v. 25, № 2.
190. Bolognesi M. L., Matera R., Minarini A., Rosini M., Melchiorre C. Alzheimer's disease: new approaches to drug discovery // *Curr Opin Chem Biol.* – 2009. – v. 13, № 3. – p. 303-8.
191. Nesi G., Sestito S., Digiacoio M., Rapposelli S. Oxidative Stress, Mitochondrial Abnormalities and Proteins Deposition: Multitarget Approaches in Alzheimer's Disease // *Curr Top Med Chem.* – 2017. – v. 17, № 27. – p. 3062-3079.
192. Rogers G. W., Brand M. D., Petrosyan S., Ashok D., Elorza A. A., Ferrick D. A., Murphy A. N. High throughput microplate respiratory measurements using minimal quantities of isolated mitochondria // *PLoS One.* – 2011. – v. 6, № 7. – p. e21746.
193. Erdahl WL K. R., Pfeiffer DR. A comparison of phospholipid degradation by oxidation and hydrolysis during the mitochondrial permeability transition // *Arch Biochem Biophys.* . – 1991. – v. 285, № 2. – p. 252-260.
194. Nicks M O. M. Towards an optimized MTT assay. // *J Immunol Methods.* – 1991. – v. 130, № 1. – p. 149-151.

195. Racine R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure // *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* – 1972. – v. 32, № 3. – p. 281-94.
196. Vignisse J., Steinbusch H. W., Grigoriev V., Bolkunov A., Proshin A., Bettendorff L., Bachurin S., Strekalova T. Concomitant manipulation of murine NMDA- and AMPA-receptors to produce pro-cognitive drug effects in mice // *Eur Neuropsychopharmacol.* – 2014. – v. 24, № 2. – p. 309-20.
197. Brusnichkin A. V., Nedosekin D. A., Galanzha E. I., Vladimirov Y. A., Shevtsova E. F., Proskurnin M. A., Zharov V. P. Ultrasensitive label-free photothermal imaging, spectral identification, and quantification of cytochrome c in mitochondria, live cells, and solutions // *J Biophotonics.* – 2010. – v. 3, № 12. – p. 791-806.
198. Бачурин С.О., Дубова Л. Г., Киреева Е.Г., Шевцова Е.Ф. Способ определения влияния соединений на процесс скачка митохондриальной проницаемости и мембранный потенциал митохондрий // патент. – Россия, 2008.
199. Petronilli V., Cola C., Massari S., Colonna R., Bernardi P. Physiological effectors modify voltage sensing by the cyclosporin A-sensitive permeability transition pore of mitochondria // *J Biol Chem.* – 1993. – v. 268, № 29. – C. 21939-45.
200. Berman S. B., Watkins S. C., Hastings T. G. Quantitative biochemical and ultrastructural comparison of mitochondrial permeability transition in isolated brain and liver mitochondria: evidence for reduced sensitivity of brain mitochondria // *Exp Neurol.* – 2000. – v. 164, № 2. – p. 415-25.
201. Cheng A., Hou Y., Mattson M. P. Mitochondria and neuroplasticity // *ASN Neuro.* – 2010. – v. 2, № 5. – p. e00045.
202. Chalmers S., Nicholls D. G. The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria // *J Biol Chem.* – 2003. – v. 278, № 21. – p. 19062-70.

203. Naga K. K., Geddes J. W. Dimebon inhibits calcium-induced swelling of rat brain mitochondria but does not alter calcium retention or cytochrome C release // *Neuromolecular Med.* – 2011. – v. 13, № 1. – p. 31-6.

204. Шевцова Е.Ф. Виноградова Д. В., Неганова М.Е., Шевцов П.Н., Леднев Б.В., Бачурин С.О. Митохондрии как важная мишень при поиске новых препаратов для лечения болезни Альцгеймера и старческих деменций. // *Biomedical Chemistry: Research and Methods.* – 2018. – v. 1, № 3. . – С. e00058.

205. Dalla Via L., Garcia-Argaez A. N., Martinez-Vazquez M., Grancara S., Martinis P., Toninello A. Mitochondrial permeability transition as target of anticancer drugs // *Curr Pharm Des.* – 2014. – v. 20, № 2. – p. 223-44.

206. Серков И.В. Шевцова Е. Ф., Дубова Л.Г., Киреева Е.Г., Вишневская Н.М., Грецкая Е.М., Безуглов В.В., Бачурин С.О. Взаимодействие производных докозагексаеновой кислоты с митохондриями. // *Доклады Академии Наук.* – 2007. – Т. 414, № 3. – С. 1-4.

207. Averina E. B., Vasilenko D. A., Gracheva Y. A., Grishin Y. K., Radchenko E. V., Burmistrov V. V., Butov G. M., Neganova M. E., Serkova T. P., Redkozubova O. M., Shevtsova E. F., Milaeva E. R., Kuznetsova T. S., Zefirov N. S. Synthesis and biological evaluation of novel 5-hydroxylaminoisoxazole derivatives as lipoxygenase inhibitors and metabolism enhancing agents // *Bioorg Med Chem.* – 2016. – v. 24, № 4. – p. 712-20.

208. Eckert S. H., Gaca J., Kolesova N., Friedland K., Eckert G. P., Muller W. E. Mitochondrial Pharmacology of Dimebon (Latrepidine) Calls for a New Look at its Possible Therapeutic Potential in Alzheimer's Disease // *Aging Dis.* – 2018. – v. 9, № 4. – p. 729-744.

209. Doody R. S., Gavrilova S. I., Sano M., Thomas R. G., Aisen P. S., Bachurin S. O., Seely L., Hung D. 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 // *Lancet.* – 2008. – v. 372, № 9634. – p. 207-15.

210. Bharadwaj P. R., Bates K. A., Porter T., Teimouri E., Perry G., Steele J. W., Gandy S., Groth D., Martins R. N., Verdile G. Latrepirdine: molecular mechanisms underlying potential therapeutic roles in Alzheimer's and other neurodegenerative diseases // *Transl Psychiatry*. – 2013. – v. 3. – p. e332.

211. Ivachtchenko A. V., Lavrovsky Y., Okun I. AVN-101: A Multi-Target Drug Candidate for the Treatment of CNS Disorders // *J Alzheimers Dis*. – 2016. – v. 53, № 2. – p. 583-620.

212. Sokolova N. V., Nenajdenko V. G., Sokolov V. B., Vinogradova D. V., Shevtsova E. F., Dubova L. G., Bachurin S. O. Synthesis and biological activity of N-substituted-tetrahydro-gamma-carbolines containing peptide residues // *Beilstein J Org Chem*. – 2014. – v. 10. – p. 155-62.

213. Stefek M., Benes L. . Pyridoindole stobadine is a potent scavenger of hydroxyl radicals // *FEBS Letters*. – 1991. – v. 294, № 3. – p. 264-266.

214. Бачурин С.О., Виноградова Д. В., Шевцова Е.Ф., Горева Т.В., Епишина Т.А., Аксиненко А.Ю., Соколов В.Б. Модификация гамма-карболинов N-замещенными пропионамидами — новый подход к созданию митопротекторных препаратов. // *Изв. АН. Сер. хим.* – 2013. – v. 3. – С. 815-819.

215. Виноградова Д.В. Неганова М. Е., Серкова Т.П., Шевцова Е.Ф. Митопротекторные свойства производных гамма-карболинов // *Естественные и технические науки*. – 2013. – Т. 12. – С. 73-78.

216. Muller K., Faeh C., Diederich F. Fluorine in pharmaceuticals: looking beyond intuition // *Science*. – 2007. – v. 317, № 5846. – p. 1881-6.

217. Purser S., Moore P. R., Swallow S., Gouverneur V. Fluorine in medicinal chemistry // *Chem Soc Rev*. – 2008. – v. 37, № 2. – p. 320-30.

218. Xing L., Honda, T., Fitz, L., & Ojima, I. . 4 - Case studies of fluorine in drug discovery // *Fluorine in Life Sciences: Pharmaceuticals, Medicinal Diagnostics, and Agrochemicals* / Günter Haufe F. R. L.Academic Press, 2019.

219. Peters O. M., Connor-Robson N., Sokolov V. B., Aksinenko A. Y., Kukharsky M. S., Bachurin S. O., Ninkina N., Buchman V. L. Chronic

administration of dimebon ameliorates pathology in TauP301S transgenic mice // *J Alzheimers Dis.* – 2013. – v. 33, № 4. – p. 1041-9.

220. Устюгов А.А. Аксиненко А. Ю., Вихарев Ю.Б., Малеев Г.В., Небогатилов В.О., Васильева Н.А., Шевцова Е.Ф., Бачурин С.О. Фторированные γ -карболины — соединения, замедляющие развитие когнитивных и моторных дисфункций в трансгенной модели нейродегенеративных заболеваний // *Изв. АН. Сер. хим.* – 2020. – Т. 4. – С. 781-786.

221. Strekalova T., Bahzenova N., Trofimov A., Schmitt-Bohrer A. G., Markova N., Grigoriev V., Zamoyski V., Serkova T., Redkozubova O., Vinogradova D., Umriukhin A., Fisenko V., Lillesaar C., Shevtsova E., Sokolov V., Aksinenko A., Lesch K. P., Bachurin S. Pro-neurogenic, Memory-Enhancing and Anti-stress Effects of DF302, a Novel Fluorine Gamma-Carboline Derivative with Multi-target Mechanism of Action // *Mol Neurobiol.* – 2018. – v. 55, № 1. – p. 335-349.

222. Korczyn A. D. Is Alzheimer's disease a homogeneous disease entity? // *J Neural Transm (Vienna).* – 2013. – v. 120, № 10. – p. 1475-7.

223. Бачурин С.О. Шевцова Е. Ф. Возможные мишени для создания лекарственных препаратов для лечения болезни Альцгеймера: новые аспекты. // *Психиатрия.* – 2008. № 4-6. – С. 43-47.

224. Бачурин С.О. Шевцова Е. Ф. Направленный поиск лекарственных препаратов для лечения болезни Альцгеймера и родственных нейродегенеративных заболеваний. // *Журнал «Технологии живых систем».* – 2010. – Т. 1. – С. 12-18.

225. Shevtsova E. P., Dubova, L.G., Kireeva, E.G., Bachurin, S.O. . Mitochondria as the memantine target // *European Neuropsychopharmacology.* – 2006. – v. 16, № Supplement 4. – p. S243-S244.

226. Geisler J. G., Marosi K., Halpern J., Mattson M. P. DNP, mitochondrial uncoupling, and neuroprotection: A little dab'll do ya // *Alzheimers Dement.* – 2017. – v. 13, № 5. – p. 582-591.

227. Bachurin S., Tkachenko S., Baskin I., Lermontova N., Mukhina T., Petrova L., Ustinov A., Proshin A., Grigoriev V., Lukoyanov N., Palyulin V., Zefirov N. Neuroprotective and cognition-enhancing properties of MK-801 flexible analogs. Structure-activity relationships // *Ann N Y Acad Sci.* – 2001. – v. 939. – p. 219-36.

228. Grigoriev V. V., Proshin A. N., Kinzirskii A. S., Bachurin S. O. Binary mechanism of action of cognition enhancer NT1505 on glutamate receptors // *Bull Exp Biol Med.* – 2012. – v. 153, № 3. – p. 298-300.

229. Герасимов Н.Ю. Новиков О. В., Каспаров В.В., Голощапов А.Н., Бурлакова Е.Б. . Исследование методом эпр-спиновых зондов действия димебона и NT-1505 на микровязкость мембран синапсом, выделенных из мозга мышей, *in vivo*. // *Биофизика.* – 2015. – Т. 59, № 2. – С. 304-309.

230. Герасимов Н.Ю. Новиков О. В., Каспаров В.В., Коварский А.Л., Голощапов А.Н., Бурлакова Е.Б.. . Действие NT-1505 на структуру мембран эндоплазматического ретикулума *in vivo* // *Биофизика.* – 2015. – Т. 60, № 5. – С. 931–935.

231. Perlovich G. L., Proshin A. N., Volkova T. V., Petrova L. N., Bachurin S. O. Novel 1,2,4-thiadiazole derivatives as potent neuroprotectors: approach to creation of bioavailable drugs // *Mol Pharm.* – 2012. – v. 9, № 8. – p. 2156-67.

232. Castro A., Castano T., Encinas A., Porcal W., Gil C. Advances in the synthesis and recent therapeutic applications of 1,2,4-thiadiazole heterocycles // *Bioorg Med Chem.* – 2006. – v. 14, № 5. – p. 1644-52.

233. del Ser T., Steinwachs K. C., Gertz H. J., Andres M. V., Gomez-Carrillo B., Medina M., Vericat J. A., Redondo P., Fleet D., Leon T. Treatment of Alzheimer's disease with the GSK-3 inhibitor tideglusib: a pilot study // *J Alzheimers Dis.* – 2013. – v. 33, № 1. – p. 205-15.

234. Andrabi S. A., Sayeed I., Siemen D., Wolf G., Horn T. F. Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for anti-apoptotic effects of melatonin // *FASEB J.* – 2004. – v. 18, № 7. – p. 869-71.

235. Pandi-Perumal S. R., BaHammam A. S., Brown G. M., Spence D. W., Bharti V. K., Kaur C., Hardeland R., Cardinali D. P. Melatonin antioxidative defense: therapeutical implications for aging and neurodegenerative processes // *Neurotox Res.* – 2013. – v. 23, № 3. – p. 267-300.

236. Zhou H., Wang J., Jiang J., Stavrovskaya I. G., Li M., Li W., Wu Q., Zhang X., Luo C., Zhou S., Sirianni A. C., Sarkar S., Kristal B. S., Friedlander R. M., Wang X. N-acetyl-serotonin offers neuroprotection through inhibiting mitochondrial death pathways and autophagic activation in experimental models of ischemic injury // *J Neurosci.* – 2014. – v. 34, № 8. – p. 2967-78.

237. Нестерова М. В. Мелатонин - адаптоген с мультимодальными возможностями. // *Медицинский Совет.* – 2015. – Т. 18. – С. 50-53.

238. Beutler J. A., Karbon E. W., Brubaker A. N., Malik R., Curtis D. R., Enna S. J. Securinine alkaloids: a new class of GABA receptor antagonist // *Brain Res.* – 1985. – v. 330, № 1. – p. 135-40.

239. Copperman R., Copperman G., Der Marderosian A. From Asia securinine--a central nervous stimulant is used in treatment of amyotrophic lateral sclerosis // *Pa Med.* – 1973. – v. 76, № 1. – p. 36-41.

240. Lin X., Guolin W., Jun-tian Z. Intracellular calcium involved in the long-term potentiation induced by securinine in dentate gyrus of anesthetized rats // *Planta Med.* – 2002. – v. 68, № 8. – p. 752-3.

241. Lin X., Jun-Tian Z. Neuroprotection by D-securinine against neurotoxicity induced by beta-amyloid (25-35) // *Neurol Res.* – 2004. – v. 26, № 7. – p. 792-6.

242. Kaplan A., Stockwell B. R. Structural Elucidation of a Small Molecule Inhibitor of Protein Disulfide Isomerase // *ACS Med Chem Lett.* – 2015. – v. 6, № 9. – p. 966-971.

243. Leonoudakis D., Rane A., Angeli S., Lithgow G. J., Andersen J. K., Chinta S. J. Anti-Inflammatory and Neuroprotective Role of Natural Product Securinine in Activated Glial Cells: Implications for Parkinson's Disease // *Mediators Inflamm.* – 2017. – v. 2017. – p. 8302636.

244. Неганова М.Е., Афанасьева С. В., Клочков С.Г., Шевцова Е.Ф. . Механизмы антиоксидантного действия производных природных сесквитерпеновых лактонов и алкалоидов. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины –2011. – Т. 52, № 12. – С. 661-665.
245. Mahesha H. G., Singh S. A., Rao A. G. Inhibition of lipoxygenase by soy isoflavones: evidence of isoflavones as redox inhibitors // Arch Biochem Biophys. – 2007. – v. 461, № 2. – p. 176-85.
246. Chu J., Pratico D. 5-Lipoxygenase pharmacological blockade decreases tau phosphorylation in vivo: involvement of the cyclin-dependent kinase-5 // Neurobiol Aging. – 2013. – v. 34, № 6. – p. 1549-54.
247. Неганова М.Е., Серкова Т. П., Клочков С.Г., Афанасьева С.В., Шевцова Е.Ф., Бачурин С.О. . Нейропротекторные свойства алломаргаритарина – нового триптаминового производного природного алкалоида секурина // Естественные и технические науки. – 2011. – Т. 5. – С. 86-90.
248. Millan-Plano S., Piedrafita E., Miana-Mena F. J., Fuentes-Broto L., Martinez-Ballarín E., Lopez-Pingarrón L., Saenz M. A., Garcia J. J. Melatonin and structurally-related compounds protect synaptosomal membranes from free radical damage // Int J Mol Sci. – 2010. – v. 11, № 1. – p. 312-28.
249. Pagani L., Eckert A. Amyloid-Beta interaction with mitochondria // Int J Alzheimers Dis. – 2011. – v. 2011. – p. 925050.
250. Hornedo-Ortega R., Da Costa G., Cerezo A. B., Troncoso A. M., Richard T., Garcia-Parrilla M. C. In Vitro Effects of Serotonin, Melatonin, and Other Related Indole Compounds on Amyloid-beta Kinetics and Neuroprotection // Mol Nutr Food Res. – 2018. – v. 62, № 3.
251. Ono K., Hamaguchi T., Naiki H., Yamada M. Anti-amyloidogenic effects of antioxidants: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease // Biochim Biophys Acta. – 2006. – v. 1762, № 6. – p. 575-86.

252. Klochkov S. G., Afanas'eva, S.V. & Grigor'ev, V.V. Synthesis and biological activity of amination products of the alkaloid securinine // *Chem Nat Compd.* – 2008. – v. 44. – p. 197–202.

253. Pearson-Smith J. N., Patel M. Metabolic Dysfunction and Oxidative Stress in Epilepsy // *Int J Mol Sci.* – 2017. – v. 18, № 11.

254. Zsurka G., Kunz W. S. Mitochondrial dysfunction and seizures: the neuronal energy crisis // *Lancet Neurol.* – 2015. – v. 14, № 9. – p. 956-66.

255. Zhang Y., Zhang M., Zhu W., Yu J., Wang Q., Zhang J., Cui Y., Pan X., Gao X., Sun H. Succinate accumulation induces mitochondrial reactive oxygen species generation and promotes status epilepticus in the kainic acid rat model // *Redox Biol.* – 2020. – v. 28. – p. 101365.

256. Редкозубова О. М. Особенности развития эпилептического статуса и способов его купирования у крыс разного возраста на литий-пилокарпиновой модели // Чепурнов С.А. Чепурнова Н. Е.; кандидатская диссертация МГУ имени М.В. Ломоносова, 2007. – 200 с.

257. Kim D. Y., Simeone K. A., Simeone T. A., Pandya J. D., Wilke J. C., Ahn Y., Geddes J. W., Sullivan P. G., Rho J. M. Ketone bodies mediate antiseizure effects through mitochondrial permeability transition // *Ann Neurol.* – 2015. – v. 78, № 1. – p. 77-87.

258. Finsterer J. Toxicity of Antiepileptic Drugs to Mitochondria // *Handb Exp Pharmacol.* – 2017. – v. 240. – p. 473-488.

259. Неганова М.Е., Блик В. А., Клочков С.Г., Чепурнова Н.Е., Шевцова Е.Ф. Исследование антиоксидантных свойств нового триптаминового производного secuрина и его влияние на судорожную активность мозга при экспериментальной эпилепсии // *Нейрохимия.* – 2011. – Т. 28, № 3. – С. 1-8.

260. Бачурин С.О. Шевцова Е. Ф., Махаева Г.Ф., Соколов В.Б. Полифармакофорные препараты для лечения нейродегенеративных заболеваний (деменции и бокового амиотрофического склероза). // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* – 2018. – Т. 81. – С. 26.

261. Sokolov V.B. Makhaeva G. F., Aksinenko A.Yu., Grigoriev V.V., Shevtsova E.F., Bachurin S.O. . Targeted synthesis and biological activity of polypharmacophoric agents for the treatment of neurodegenerative diseases // Russian Chemical Bulletin. – 2017. – v. 66, № 10. – p. 1821-1831.

262. Bachurin S. O., Shevtsova E. F., Makhaeva G. F., Grigoriev V. V., Boltneva N. P., Kovaleva N. V., Lushchekina S. V., Shevtsov P. N., Neganova M. E., Redkozubova O. M., Bovina E. V., Gabrelyan A. V., Fisenko V. P., Sokolov V. B., Aksinenko A. Y., Echeverria V., Barreto G. E., Aliev G. Novel conjugates of aminoadamantanes with carbazole derivatives as potential multitarget agents for AD treatment // Sci Rep. – 2017. – v. 7. – p. 45627.

263. Campbell A. P., Wakelin L. P., Denny W. A., Finch A. M. Homobivalent Conjugation Increases the Allosteric Effect of 9-aminoacridine at the alpha1-Adrenergic Receptors // Mol Pharmacol. – 2017. – v. 91, № 2. – p. 135-144.

264. Dietis N., Guerrini R., Calo G., Salvadori S., Rowbotham D. J., Lambert D. G. Simultaneous targeting of multiple opioid receptors: a strategy to improve side-effect profile // Br J Anaesth. – 2009. – v. 103, № 1. – p. 38-49.

265. Russo O., Berthouze M., Giner M., Soulier J. L., Rivail L., Sicsic S., Lezoualc'h F., Jockers R., Berque-Bestel I. Synthesis of specific bivalent probes that functionally interact with 5-HT(4) receptor dimers // J Med Chem. – 2007. – v. 50, № 18. – p. 4482-92.

266. Tamiz A. P., Bandyopadhyay B. C., Zhang J., Flippen-Anderson J. L., Zhang M., Wang C. Z., Johnson K. M., Tella S., Kozikowski A. P. Pharmacological and behavioral analysis of the effects of some bivalent ligand-based monoamine reuptake inhibitors // J Med Chem. – 2001. – v. 44, № 10. – p. 1615-22.

267. Sokolov V. B., Aksinenko, A. Yu., Epishina, T. A., Goreva, T. V. & Bachurin, S. O. . Conjugation of indole derivatives by copper-catalyzed alkyne-azide cycloaddition // Russian Chemical Bulletin. – 2017. – v. 66, № 9. – p. 1607-1610.

268. Sokolov V. B., Aksinenko, A. Yu., Goreva, T. V., Epishina, T. A. & Samsonova, A. N. . Copper-catalyzed 1,3-Dipolar Cycloaddition of Substituted N-Propargylindoles and Terminal Diazidoalkanes // Russian Journal of General Chemistry. – 2018. – v. 88. – p. 1266–1269.

269. Makhaeva G.F. Shevtsova E. F., Aksinenko A.Y., Kovaleva N.V., Boltneva N.P., Lushchekina S.V., Rudakova E.V., Pushkareva E.A., Serkova T.P., Dubova L.G., Shevtsov P.N., Sokolov V.B., Radchenko E.V., Palyulin V.A., Bachurin S.O., Richardson R.J. . Bis- γ -carboline as new potential multitarget agents for Alzheimer's disease // Pure Appl Chem. – 2020. – v. 92, № 7. – p. 1057-1080.

270. Cano-Cuenca N., Solis-Garcia del Pozo J. E., Jordan J. Evidence for the efficacy of latrepirdine (Dimebon) treatment for improvement of cognitive function: a meta-analysis // J Alzheimers Dis. – 2014. – v. 38, № 1. – p. 155-64.

271. Yamashita M., Nonaka T., Arai T., Kametani F., Buchman V. L., Ninkina N., Bachurin S. O., Akiyama H., Goedert M., Hasegawa M. Methylene blue and dimebon inhibit aggregation of TDP-43 in cellular models // FEBS Lett. – 2009. – v. 583, № 14. – p. 2419-24.

272. Yoon H. J., Kong S. Y., Park M. H., Cho Y., Kim S. E., Shin J. Y., Jung S., Lee J., Farhanullah, Kim H. J. Aminopropyl carbazole analogues as potent enhancers of neurogenesis // Bioorg Med Chem. – 2013. – v. 21, № 22. – p. 7165-74.

273. Zhu D., Chen M., Li M., Luo B., Zhao Y., Huang P., Xue F., Rapposelli S., Pi R., Wen S. Discovery of novel N-substituted carbazoles as neuroprotective agents with potent anti-oxidative activity // Eur J Med Chem. – 2013. – v. 68. – p. 81-8.

274. Wu X., Kosaraju J., Zhou W., Tam K. Y. SLOH, a carbazole-based fluorophore, mitigates neuropathology and behavioral impairment in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease // Neuropharmacology. – 2018. – v. 131. – p. 351-363.

275. Bachurin S. O., Makhaeva G. F., Shevtsova E. F., Boltneva N. P., Kovaleva N. V., Lushchekina S. V., Rudakova E. V., Dubova L. G., Vinogradova D. V., Sokolov V. B., Aksinenko A. Y., Fisenko V. P., Richardson R. J., Aliev G. Conjugates of methylene blue with gamma-carboline derivatives as new multifunctional agents for the treatment of neurodegenerative diseases // *Sci Rep.* – 2019. – v. 9, № 1. – p. 4873.

276. Шевцова Е.Ф., Киреева Е. Г., Бачурин С.О. . Митохондрии как мишень действия нейропротекторных препаратов. // *Вестник РАМН.* – 2005. – Т. 9. – С. 13-17.

277. Visarius T. M., Stucki J. W., Lauterburg B. H. Stimulation of respiration by methylene blue in rat liver mitochondria // *FEBS Lett.* – 1997. – v. 412, № 1. – p. 157-60.

278. Duicu O. M., Privistirescu A., Wolf A., Petrus A., Danila M. D., Ratiu C. D., Muntean D. M., Sturza A. Methylene blue improves mitochondrial respiration and decreases oxidative stress in a substrate-dependent manner in diabetic rat hearts // *Can J Physiol Pharmacol.* – 2017. – v. 95, № 11. – p. 1376-1382.

279. Lin A. L., Poteet E., Du F., Gourav R. C., Liu R., Wen Y., Bresnen A., Huang S., Fox P. T., Yang S. H., Duong T. Q. Methylene blue as a cerebral metabolic and hemodynamic enhancer // *PLoS One.* – 2012. – v. 7, № 10. – p. e46585.

280. Шевцов П.Н. Шевцова Е. Ф., Бачурин С.О. . Влияние ионов металлов на микротрубочки как возможный механизм патогенеза болезни Альцгеймера // *Biomedical Chemistry: Research and Methods.* – 2018. – Т. 1, № 3. – С. e00050.

281. Yoshiyama Y., Lee V. M., Trojanowski J. Q. Therapeutic strategies for tau mediated neurodegeneration // *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* – 2013. – v. 84, № 7. – p. 784-95.

282. Маркова Н.А. Шевцова Е. Ф. Стресс-вызванная депрессия как фактор риска развития болезни Альцгеймера: роль киназы гликогенсинтазы-3. // Патогенез. – 2013. – Т. 4. – С. 4-8.

283. Wu H. M., Lee C. G., Hwang S. J., Kim S. G. Mitigation of carbon tetrachloride-induced hepatic injury by methylene blue, a repurposed drug, is mediated by dual inhibition of GSK3 β downstream of PKA // Br J Pharmacol. – 2014. – v. 171, № 11. – p. 2790-802.

284. Gu C., Zhang Y., Hu Q., Wu J., Ren H., Liu C. F., Wang G. P7C3 inhibits GSK3 β activation to protect dopaminergic neurons against neurotoxin-induced cell death in vitro and in vivo // Cell Death Dis. – 2017. – v. 8, № 6. – p. e2858.

285. Бачурин С. О., Соколов, В.Б., Аксиненко, А.Ю., Шевцова, Е.Ф., Абрамов, А.Ю., Виноградова, Д.В., Неганова, М.Е. Применение адамантансодержащих индолов и их гидрохлоридов в качестве цитопротекторов и для лечения и предупреждения заболеваний, связанных с увеличением цитозольной концентрации кальция, и фармакологическое средство на их основе // Патент РФ № 2608737 от 23 января 2017 г – Россия, 2017.

286. Бачурин С.О. Соколов В. Б., Аксиненко А.Ю., Епишина Т.А., Горева Т.В., Шевцова Е.Ф., Шевцов П.Н. Адамантансодержащие индолы и их гидрохлориды, обладающие свойством стабилизации микротрубочек, способы их получения, фармакологическое средство на их основе и способ лечения и предупреждения заболеваний, связанных с нарушениями системы микротрубочек // Патент РФ № 2608631 от 23 января 2017 г. – Россия, 2015.

287. Angelova P. R., Vinogradova D., Neganova M. E., Serkova T. P., Sokolov V. V., Bachurin S. O., Shevtsova E. F., Abramov A. Y. Pharmacological Sequestration of Mitochondrial Calcium Uptake Protects Neurons Against Glutamate Excitotoxicity // Mol Neurobiol. – 2019. – v. 56, № 3. – p. 2244-2255.

288. Abramov A. Y., Duchen M. R. Actions of ionomycin, 4-BrA23187 and a novel electrogenic Ca^{2+} ionophore on mitochondria in intact cells // *Cell Calcium*. – 2003. – v. 33, № 2. – p. 101-12.

289. Abramov A. Y., Duchen M. R. Mechanisms underlying the loss of mitochondrial membrane potential in glutamate excitotoxicity // *Biochim Biophys Acta*. – 2008. – v. 1777, № 7-8. – p. 953-64.

290. Surin A. M., Gorbacheva L. R., Savinkova I. G., Sharipov R. R., Khodorov B. I., Pinelis V. G. Study on ATP concentration changes in cytosol of individual cultured neurons during glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis // *Biochemistry (Mosc)*. – 2014. – v. 79, № 2. – p. 146-57.

291. Randall R. D., Thayer S. A. Glutamate-induced calcium transient triggers delayed calcium overload and neurotoxicity in rat hippocampal neurons // *J Neurosci*. – 1992. – v. 12, № 5. – p. 1882-95.

292. Stout A. K., Raphael H. M., Kanterewicz B. I., Klann E., Reynolds I. J. Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake // *Nat Neurosci*. – 1998. – v. 1, № 5. – p. 366-73.

293. Holmstrom K. M., Pan X., Liu J. C., Menazza S., Liu J., Nguyen T. T., Pan H., Parks R. J., Anderson S., Noguchi A., Springer D., Murphy E., Finkel T. Assessment of cardiac function in mice lacking the mitochondrial calcium uniporter // *J Mol Cell Cardiol*. – 2015. – v. 85. – p. 178-82.

294. deToledo-Morrell L., Geinisman Y., Morrell F. Age-dependent alterations in hippocampal synaptic plasticity: relation to memory disorders // *Neurobiol Aging*. – 1988. – v. 9, № 5-6. – p. 581-90.

295. Bekdash R. A. Choline and the Brain: An Epigenetic Perspective // *Adv Neurobiol*. – 2016. – v. 12. – p. 381-99.

296. Dong Z., Fu A. Prevention of age-related memory deficit in transgenic mice by human choline acetyltransferase // *Eur J Pharmacol*. – 2012. – v. 683, № 1-3. – p. 174-8.

297. Friedman E. B. M. J., Lerer B.E., Sherman K.A., Schweitzer J.W., Kuster J. . Neurochemical and Behavioral Alterations in Aging and in Animal

Models of Alzheimer's Disease. // Alzheimer's and Parkinson's Disease. Advances in Behavioral Biology / Fisher A. H. I., Lachman C. . – Boston, MA: Springer, 1986.

298. Eriksen J. L., Janus C. G. Plaques, tangles, and memory loss in mouse models of neurodegeneration // Behav Genet. – 2007. – v. 37, № 1. – p. 79-100.

299. Jawhar S., Trawicka A., Jenneckens C., Bayer T. A., Wirths O. Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal Abeta aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease // Neurobiol Aging. – 2012. – v. 33, № 1. – p. 196 e29-40.

300. Devi L., Ohno M. Genetic reductions of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and amyloid-beta ameliorate impairment of conditioned taste aversion memory in 5XFAD Alzheimer's disease model mice // Eur J Neurosci. – 2010. – v. 31, № 1. – p. 110-8.

301. Puzzo D., Lee L., Palmeri A., Calabrese G., Arancio O. Behavioral assays with mouse models of Alzheimer's disease: practical considerations and guidelines // Biochem Pharmacol. – 2014. – v. 88, № 4. – p. 450-67.

302. Webster S. J., Bachstetter A. D., Nelson P. T., Schmitt F. A., Van Eldik L. J. Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models // Front Genet. – 2014. – v. 5. – p. 88.

303. Blake M. G., Krawczyk M. C., Baratti C. M., Boccia M. M. Neuropharmacology of memory consolidation and reconsolidation: Insights on central cholinergic mechanisms // J Physiol Paris. – 2014. – v. 108, № 4-6. – p. 286-91.