

На правах рукописи



ВИНОГРАДОВА Дарья Викторовна

**МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ
ТЕТРАГИДРО- γ -КАРБОЛИНОВ С МИТОХОНДРИЯМИ**

02.00.10 – биоорганическая химия

03.00.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Черноголовка - 2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Институте физиологически активных веществ Российской академии наук (ИФАВ РАН)

Научный руководитель: **Шевцова Елена Феофановна**
кандидат химических наук, заведующая лабораторией молекулярного скрининга ИФАВ РАН

Научный консультант: **Бачурин Сергей Олегович**
доктор химических наук, член-корреспондент РАН, директор ИФАВ РАН

Официальные оппоненты: **Санина Наталия Алексеевна**
доктор химических наук, заведующая отделом Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химической физики Российской академии наук,

Гусаров Дмитрий Алексеевич
кандидат химических наук, старший научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

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

Защита состоится «24» июня 2014 г. в 14 на заседании диссертационного совета Д 002.102.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологически активных веществ Российской академии наук по адресу: 142432, Московская обл., г. Черноголовка, ул. Северный проезд, д. 1.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ИФАВ РАН.

Автореферат разослан « » мая 2014 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета
Д.002.102.01,
кандидат химических наук



С.В. Афанасьева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

В связи с ростом средней продолжительности жизни в развитых странах одна из самых актуальных проблем здравоохранения является проблема обусловленных возрастом нейродегенеративных заболеваний. Наиболее распространенной формой деменции является болезнь Альцгеймера (БА). По данным Всемирной организации здравоохранения, в мире проживает более 35 миллионов человек с БА, на лечение людей с деменцией и уход за ними ежегодно расходуется более 600 миллиардов долларов США. До сих пор не разработана эффективная нейропротекторная терапия, а препараты для лечения нейродегенеративных заболеваний являются симптоматическими и направлены на компенсацию специфического для данного заболевания медиаторного дефицита, а также не решена проблема ранней медицинской диагностики данного заболевания.

Было установлено, что важным звеном патогенеза БА является нарушение митохондриальных функций и, в том числе, снижение их способности регулировать гомеостаз кальция в клетке и устойчивости к процессу скачка митохондриальной проницаемости (СМП). Процесс СМП обусловлен открытием комплекса пор, что является ключевым этапом каскадов гибели клеток. Именно поэтому митохондрии, и особенно процесс СМП, являются крайне перспективной мишенью для поиска нейропротекторных препаратов. Было показано, что нейропротекторное действие в различных моделях токсичности отечественного препарата димебон (3,6-диметил-9-(2-метилпиридил-5)-этил-1,2,3,4-тетрагидро-γ-карболина дигидрохлорид), являющегося одним из перспективных лекарственных средств лечения БА, по меньшей мере частично обусловлено именно взаимодействием с митохондриями - с его способностью увеличивать их устойчивость к индукции СМП. Однако конкретные митохондриальные мишени димебона до конца не известны. В связи с этим возникает необходимость детального исследования влияния и механизмов взаимодействия димебона с основными компонентами поры СМП. Одновременно с этим, принимая во внимание нейропротекторное действие димебона, особый интерес представляет направленный синтез и

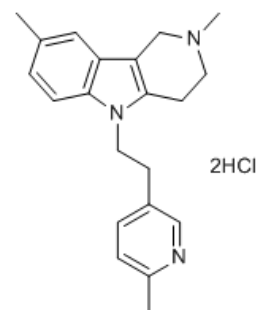


Рисунок 1.
Структурная
формула
димебона.

последующий скрининг активности ряда его структурных аналогов.

Целью настоящей работы являлось исследование механизма влияния димебона на процесс СМП и кальциевый гомеостаз митохондрий, а также поиск потенциальных эффективных нейропротекторов в ряду его новых структурных аналогов.

Основными задачами настоящей работы являлись:

1. Разработка комплексной системы скрининга на проявление митопротекторной активности и ее практическая проверка на примере оригинальных аналогов димебона в ряду производных тетрагидро- γ -карболинов.
2. Исследование механизма действия димебона на явление скачка митохондриальной проницаемости митохондрий мозга крыс.
3. Исследование действие димебона на кальциевый гомеостаз митохондрий мозга крыс.
4. Анализ взаимосвязи структуры и влияния на функциональные характеристики митохондрий для серии оригинальных аналогов димебона в ряду производных тетрагидро- γ -карболинов.

Научная новизна работы

Впервые исследованы механизмы влияния димебона на процесс СМП митохондрий мозга крыс. Показано, что способность димебона увеличивать устойчивость митохондрий к СМП зависит от энергизации митохондрий, при полном ингибировании работы дыхательной цепи димебон не подавляет СМП. Также показано, что, в отличие от известного ингибитора СМП циклоспорина А, димебон не влияет на конформационные переходы переносчика адениновых нуклеотидов. Способность димебона увеличивать кальциевую ёмкость митохондрий зависит от характера увеличения кальция в среде.

Был разработан комплекс методик для скрининга активности потенциальных нейропротекторных препаратов, основной мишенью которых являются митохондрии. С применением разработанного комплекса методов впервые был проанализирован ряд новых структурных аналогов димебона, содержащих тетрагидро- γ -карболиновую фармакофорную группировку. Установлено, что биологическая активность соединений зависит не только от природы заместителей в тетрагидро- γ -карболиновой группировке, но и от структуры фрагмента, связанного через этильный линкер,

присоединенный к атому азота пиррольного цикла. Обнаружены соединения, которые повышают устойчивость митохондрий к индукции СМП эффективнее, чем димебон. Показан нейропротекторный эффект соединения-лидера в моделях глутаматной эксайтотоксичности и в модели свободнорадикального окислительного стресса на первичных культурах гранулярных клеток новорожденных крыс.

Практическая значимость

Исследованные в настоящей работе соединения перспективны в качестве эффективных препаратов для лечения, в том числе предупреждения, нейродегенеративных расстройств (в первую очередь, БА). В настоящее время одно из выявленных соединений-лидеров выбрано для доклинических исследований в рамках Федеральной целевой программы Министерства образования и науки. Помимо этого, методологические находки при разработке совокупности методов скрининга ТГК также представляют практический интерес в области поиска потенциальных лекарственных препаратов, основной мишенью которых являются митохондрии.

Личный вклад автора

Диссертант принимал активное участие в постановке целей и задач работы, выборе методов исследования и их апробации. Экспериментальные исследования, анализ и интерпретация полученных результатов, а также подготовка научных статей к публикации выполнены непосредственно автором.

Апробация работы

Основные результаты были доложены на следующих Российских и международных конференциях: 1^{ая} Российская конференция по медицинской химии «MedChem Russia-2013» (г. Москва, 2013), 17^{ая} Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (г. Пушкино, 2013), 26th ECNP Congress (г. Барселона, Испания, 2013), 4ая международная научная конференция «Химия, структура и функция биомолекул» (г. Минск, Белоруссия, 2012), 24th ECNP Congress (г. Париж, Франция, 2011), 8th IBRO World Congress of Neuroscience (г. Флоренция, Италия, 2011).

Публикации

По материалам работы опубликовано 3 научные статьи в российских и международных журналах, 1 статья в электронном виде на сайте журнала и 7 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

Объем и структура работы

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 123 страницах, включает 26 рисунков и 10 таблиц. Список литературы содержит 240 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность и практическая значимость работы, сформулированы цели исследования и показана его научная новизна.

В литературном обзоре рассмотрены основные гипотезы механизмов патогенеза БА, а также проанализирована роль митохондрий в развитии нейродегенеративных заболеваний. Проанализированы механизмы запуска процесса скачка митохондриальной проницаемости (СМП) и выделены основные потенциальные мишени действия митохондриально-направленных нейропротекторов. Приведены сведения о существующих лекарственных средствах, используемых при лечении больных с БА, и об основных тенденциях развития данной группы препаратов. Обсуждены имеющиеся к настоящему моменту данные литературы о биологической активности и о применении гамма-карболинов и их производных.

В заключительной части главы сделаны выводы и обоснован выбор объектов и методов исследования.

Экспериментальная часть содержит описание используемых объектов и методов их исследования.

Экспериментальные животные

Для опытов *in vitro* использовали самцов нелинейных беспородных белых крыс, массой 200-300 г в возрасте 3.5 – 4 месяца. Помимо этого, были использованы 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_{Sw}FILon,PSEN1*M146L*L286V)6799Vas/J). Эти мыши были предоставлены сотрудниками лаборатории генетического моделирования нейродегенеративных процессов ИФАВ РАН. Мышей использовали в возрасте 7-8 месяцев.

Животные содержались в условиях стандартного вивария с 12-ти часовым световым режимом и свободным доступом к воде и пище. При выделении митохондрий печени крыс, животные переводились на голодную диету за 24 часа до начала эксперимента. Все манипуляции с животными проводились в соответствии с решениями комиссии по Биоэтике ИФАВ РАН.

Соединения

Тетрагидро- γ -карболины и их соли (гидрохлориды) были синтезированы в лаборатории синтеза физиологически активных веществ ИФАВ РАН.

Выделение субклеточных фракций

При изучении влияния тетрагидро- γ -карболинов на митохондрии использовали препараты изолированных митохондрий печени, неочищенной синаптосомально-митохондриальной фракции (p2) и очищенных на градиентах Перколл несинаптосомальных митохондрий мозга крыс. Все виды фракций получали по стандартным методикам дифференциального центрифугирования. Определение выхода митохондрий проводили при помощи определения белка в препаратах микробиуретовым методом. Для сохранения функциональной активности митохондрии хранили при 4°C и использовали в течение 3-4 часов с момента выделения.

Трансмембранный потенциал митохондрий измеряли по флуоресценции потенциал-зависимого индикатора сафранина O в 96-луночных планшетах на многофункциональном анализаторе Victor3 компании "PerkinElmer". Регистрировали флуоресценцию при λ_{ex} 485 нм / λ_{em} 590 нм.

Действие соединений на скачок митохондриальной проницаемости (СМП) оценивали по их влиянию на набухание митохондрий. Процесс набухания митохондрий регистрировали спектрофотометрически в 96-луночных планшетах при 530 нм на планшетном анализаторе Victor3 компании "PerkinElmer". Действие соединений исследовали как на препаратах энергизованных митохондрий (в присутствии субстратов дыхательной цепи митохондрий), так и на препаратах деэнергизованных митохондрий (в условиях ингибирования дыхательной цепи

митохондрий). В качестве индукторов неспецифической проницаемости использовали растворы хлорида кальция и атрактилозида.

Кальциевую емкость несинапсосомальных митохондрий мозга определяли спектрофлуориметрически с использованием непроникающего кальциевого зонда четвертого поколения – Calcium Green-5N (CaG5N). Измерения проводили в 24-луночных и 96-луночных планшетах на анализаторе Victor3 компании “PerkinElmer”. Измерения проводили в 3 различных режимах: режиме единственной добавки, режиме болюсов и режиме насоса. При скрининге активности структурных аналогов димебона оценивали их действие на кальциевую ёмкость митохондрий при добавлении раствора хлорида кальция в режиме болюсов.

Конформационные изменения переносчика адениновых нуклеотидов (ANT) оценивали спектрофотометрически по методике Halestrap A.P. при 530 нм на планшетном анализаторе Victor3 компании “PerkinElmer”. Смотрели действие атрактилозида и катионов кальция на конформацию ANT в присутствии димебона и циклоспорина А.

Образование активных форм кислорода митохондриями оценивали при помощи флуоресцентного зонда 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина диацетата. Флуоресценцию регистрировали в 96-луночных планшетах на планшетном анализаторе Victor3 компании “PerkinElmer” при λ_{ex} 485 нм / λ_{em} 535 нм.

Перекисное окисление липидов в гомогенатах мозга крыс оценивали по накоплению ТБК-реактивных продуктов спектрофотометрически на планшетном анализаторе Victor3 компании “PerkinElmer”.

Исследование нейротоксичности и нейропротекторных свойств тетрагидро- γ -карболинов. Нейроны получали из коры мозга новорожденных крыс (1-2 сут) способом трипсинизации. Также использовали гранулярные клетки новорожденных крыс, полученные аналогичным методом. Эксперименты проводились на 8-10 суточных культурах. Нейротоксичность индуцировали, добавляя к культуре клеток глутамат (Глу) или трет-бутилгидроксипероксид (тБГП). Выживаемость нейронов определяли с помощью МТТ теста по методике Niks и Otto.

Анализ и статистическую обработку всех полученных данных проводили с помощью программ OriginPro 8, Microsoft Excel 2007 и Statistica 5.5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Действие димебона на пору скачка митохондриальной проницаемости

В присутствии субстратов дыхательной цепи димебон снижает скорость открытия пСМП независимо от типа используемого субстрата как на митохондриях мозга, так и на митохондриях печени крыс (рис. 2). Степень ингибирования СМП в присутствии димебона не различается значительно в зависимости от источника митохондрий. Несмотря на различия между процессами СМП в митохондриях печени и мозга, димебон является модулятором пСМП, а его ингибирующая способность не меняется.

Также оценивали действие димебона на СМП деэнергизованных митохондрий. В условиях модели деэнергизованных митохондрий окислительное фосфорилирование заблокировано и невозможен активный транспорт кальция в митохондриальный матрикс, при этом кальций свободно диффундирует в/из митохондрий. В данных условиях димебон, в отличие от циклоспорина А, не способен ингибировать СМП, вызванный катионами кальция, как в митохондриях мозга, так и в митохондриях печени крыс.

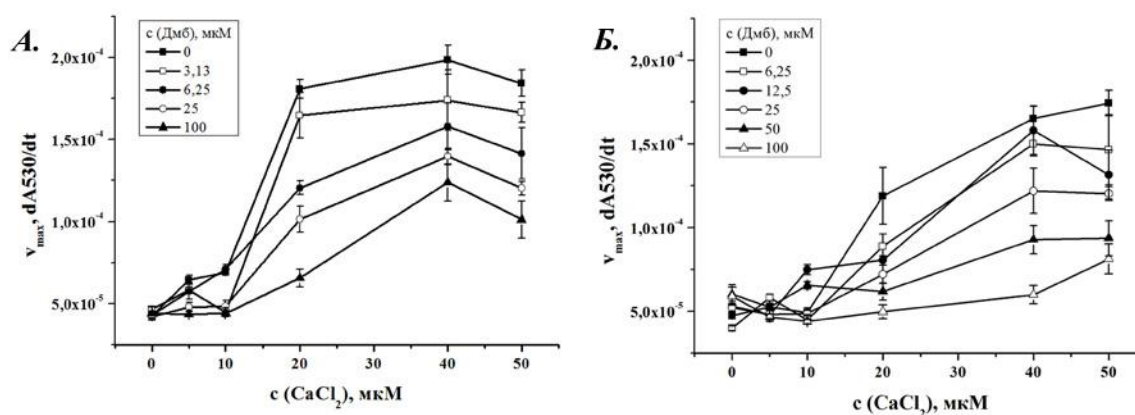


Рисунок 2. Действие димебона на кальций-индуцированное набухание митохондрий мозга (А) и печени (В) крыс при энергизации субстратом комплекса II ДЦ и ингибировании комплекса I.

Нами было показано, что на изолированных митохондриях мозга крыс на модулирующую СМП активность димебона, в отличие от циклоспорина А, не оказывает влияние добавление экзогенного АДФ. Поэтому анализировали зависимость ингибирования СМП димебоном от активности переносчика адениновых нуклеотидов, который либо играет регуляторную роль в процессе образования пСМП,

либо принимает непосредственное участие в формировании пор. Димебон не способен ингибировать СМП, вызванный добавлением 200 мкМ атрактилозида - специфического ингибитора переносчика адениновых нуклеотидов (рис. 3). Однако в присутствии 5 мкМ атрактилозида – концентрации, достаточной для полного ингибирования переносчика и для его перевода в ц-конформацию, димебон снижает скорость открытия пСМП, вызванного катионами Ca^{2+} (рис. 3).

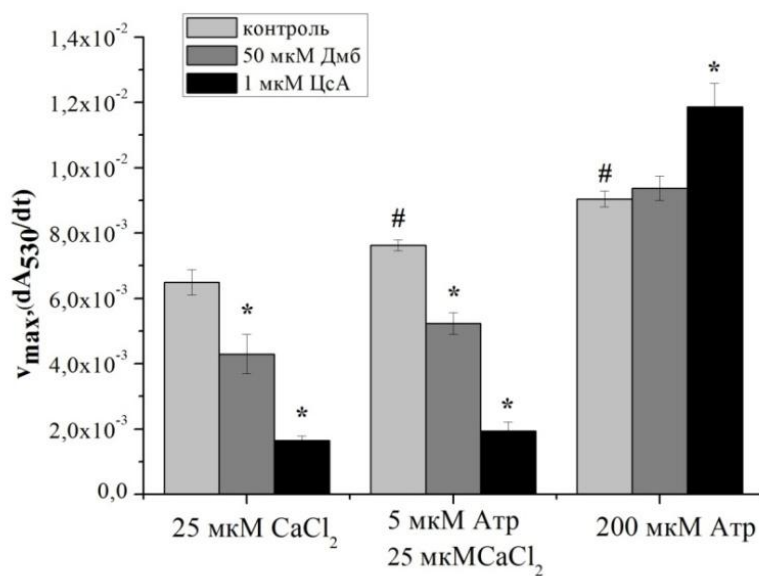


Рисунок 3. Действие димебона и циклоспорина А на набухание митохондрий мозга крыс в присутствии атрактилозида (Атр). * - $p < 0.05$ по сравнению с контролем в присутствии того же индуктора СМП. # - $p < 0.05$ по сравнению с Ca^{2+} -индуцированным СМП.

Атрактилозид в концентрации 5 мкМ не вызывает открытия пСМП, но потенцирует Ca^{2+} -индуцированное открытие пСМП. Степень ингибирования димебоном и циклоспорином А не меняется при добавлении атрактилозида, значения скорости набухания увеличиваются пропорционально увеличению скорости контрольных проб.

В отличие от ЦсА, димебон не оказывает влияния на конформационное равновесие переносчика адениновых нуклеотидов (рис.4). Ни димебон, ни циклоспорин А не способны смещать устанавливающееся в присутствии атрактилозида и катионов Ca^{2+} стационарное равновесие между конформациями ANT в митохондриях. Однако циклоспорин А, в отличие от димебона, снижает скорость

установления нового стационарного равновесия конформаций ANT в присутствии атрактолозида. Полученные данные свидетельствуют о том, что димебон не оказывает влияния на сам конформационный переход ANT, и косвенно – на то, что его СМП-направленное действие не зависит от конформации ANT.

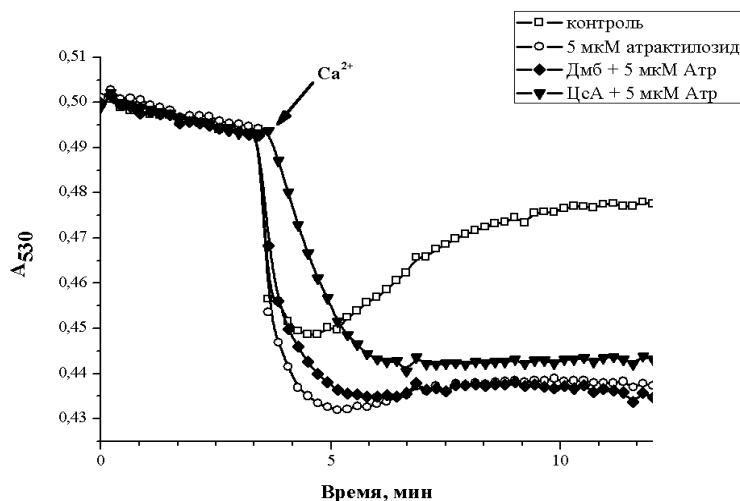


Рисунок 4. Действие димебона и циклоспорина А на конформационные изменения переносчика адениновых нуклеотидов.

Таким образом, впервые было обосновано, что димебон не взаимодействует непосредственно с основными компонентами модельной пСМП, по крайней мере в том ее составе, в каком она образуется в рассмотренных в настоящей работе условиях. Действие димебона на пСМП может зависеть от дыхательной активности митохондрий, либо быть направлено на регуляцию кальциевого гомеостаза.

Влияние димебона на кальциевый гомеостаз митохондрий

Эффективность димебона по отношению к процессам накопления и выброса кальция митохондриями зависит от используемой экспериментальной модели. В литературе описано 3 варианта добавления кальция в систему с изолированными митохондриями: в режиме однократного пульса, в режиме болюсов и в режиме насоса. В настоящей работе было впервые произведено сравнение действия димебона на кальциевую емкость митохондрий в условиях различных экспериментальных методов определения кальциевой емкости митохондрий. Димебон не вызывает достоверного увеличения кальциевой емкости митохондрий при добавлении раствора хлорида кальция в режиме насоса. С другой стороны, димебон увеличивает кальциевую емкость митохондрий в режимах болюсов и однократного пульса независимо от того, какой субстрат дыхания митохондрий использован (рис. 5).

Известно, что на молекулярном уровне передача сигналов с участием кальция имеет дискретный характер, поскольку требуются очень высокие значения концентрации катионов кальция для запуска тех или иных кальций-зависимых процессов. Также известно, что при БА уровень внутриклеточного свободного Ca^{2+} повышен, поэтому принципиально важно для поддержания когнитивных функций и для повышения общей жизнеспособности нейронов увеличение устойчивости митохондрий к новым пульсам Ca^{2+} на фоне повышенного содержания данного катиона в среде. Увеличение буферной емкости митохондрий, а точнее - увеличение пороговой концентрации кальция для индукции СМП, потенциально снижает риск индукции апоптоза при функциональной активности нейронов.

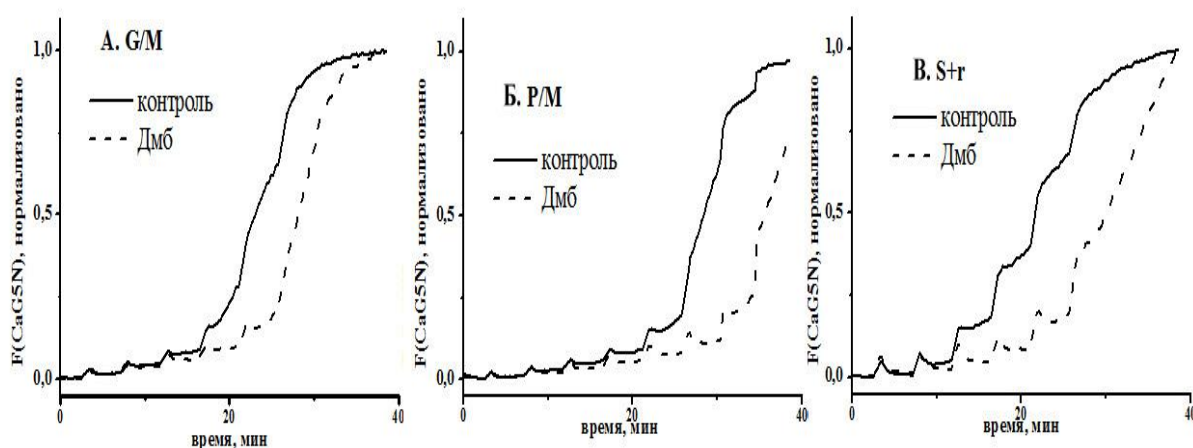


Рисунок 5. Действие димебона на способность митохондрий мозга накапливать Ca^{2+} в присутствии различных субстратов дыхательной цепи: А – 5 мМ глутамат + 2 мМ малат; В – 5 мМ пируват + 2 мМ малат; С – 5 мМ сукцинат + 1 мкМ ротенон. Представлены результаты типичного опыта.

Помимо того, димебон способен увеличивать кальциевую емкость митохондрий в присутствии бета-амилоида ($A\beta_{1-40}$ и $A\beta_{1-42}$). Добавление бета-амилоида к суспензии митохондрий приводит к снижению их кальциевой емкости. Более того, у трансгенных животных 5xFAD с мутациями, которые приводят к повышенному содержанию $A\beta$, в возрасте 7 месяцев кальциевая ёмкость митохондрий мозга достоверно ($p < 0.05$) ниже по сравнению с контролем дикого типа того же возраста (рис.6А). Димебон достоверно ($p < 0.05$) увеличивает кальциевую емкость митохондрий в присутствии экзогенного бета-амилоида *in vitro*, как и без бета-амилоида. Однако при исследовании действия димебона на митохондрии мозга

5xFAD мышей со значительным уровнем выраженности амилоидной патологии достоверного эффекта димебона на кальциевую ёмкость митохондрий выявить не удалось (рис.6Б).

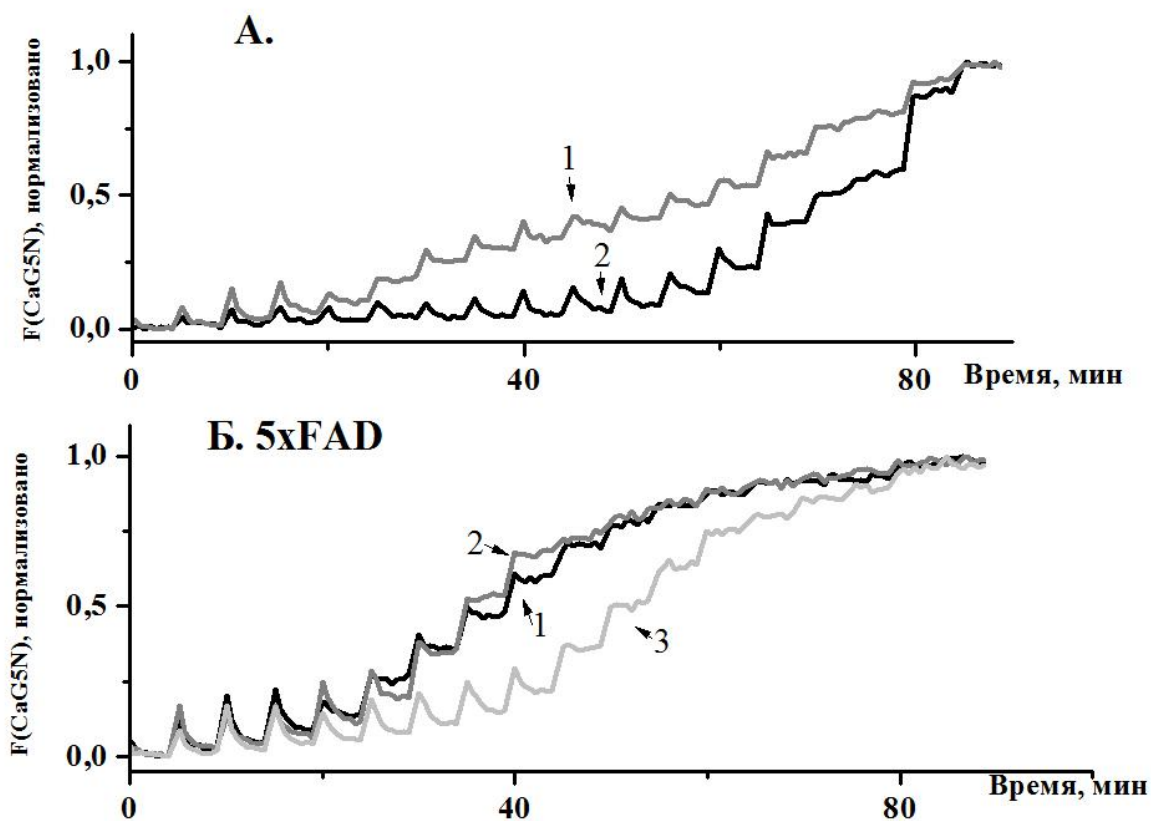


Рисунок 6. Кальциевая ёмкость митохондрий мозга 5xFAD мышей. А. Сравнение кальциевой ёмкости митохондрий мозга модельных БА 5xFAD мышей (1) и мышей дикого типа (2). Б. Действие димебона (2) и циклоспорина А (3) на кальциевую ёмкость митохондрий мозга 5xFAD мышей в сравнении с контролем (1). Приведены характерные кривые. Значение флуоресценции нормировано на максимальный сигнал.

Влияние димебона на перекисное окисление липидов (ПОЛ) гомогената мозга крыс

Ранее в лаборатории нейрохимии ИФАВ РАН было показано, что на митохондриях печени крыс димебон способен снижать уровень ПОЛ, инициированного тБГП. Чтобы оценить действие димебона на редокс процессы в мозге, в данной работе было исследовано его влияние на процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гомогенатах мозга крыс. В качестве инициаторов перекисного окисления использовали трет-бутилгидропероксид (т-БГП) –

непосредственный источник свободных радикалов, и $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – катализатор реакции Фентона.

Было установлено, что димебон ингибирует ПОЛ, вызванное т-БГП, лишь в концентрациях выше 500 мкМ. При этом димебон ингибироваЛ ПОЛ не более чем на 20% (рис. 7А). При использовании в качестве инициатора ПОЛ соли железа димебон снижал ПОЛ в концентрациях свыше 200 мкМ. Степень ингибирования ПОЛ в присутствии димебона при этом не превышала 35% (рис. 7Б).

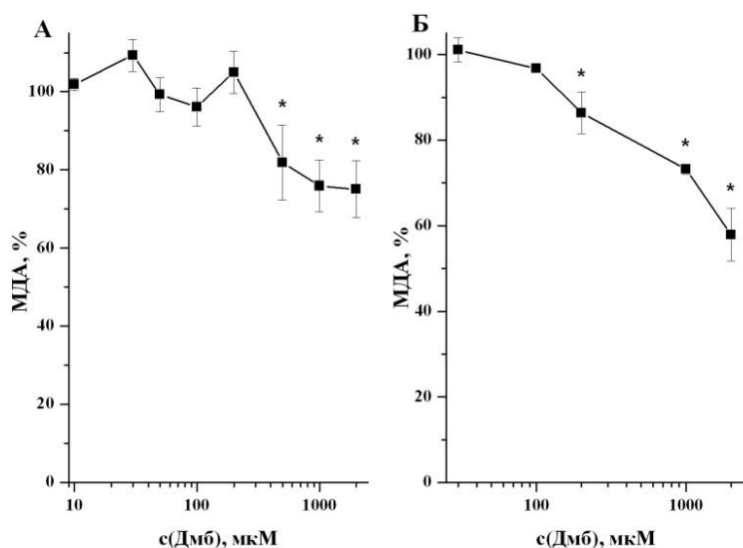


Рисунок 7. Действие димебона на перекисное окисление липидов в гомогенате мозга крыс. А. Инициатор – т-БГП. Б. Инициатор – $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. * - $p < 0.05$ по t -test.

С другой стороны, установлено, что димебон в концентрациях 50-100 мкМ существенно снижает самопроизвольное перекисное окисление липидов, то есть в отсутствии внешних индукторов (рис. 8). При этом степень самопроизвольного окисления по истечении 2 часов инкубации гомогенатов мозга при 37°C сопоставима с уровнем т-БГП-вызванного ПОЛ.

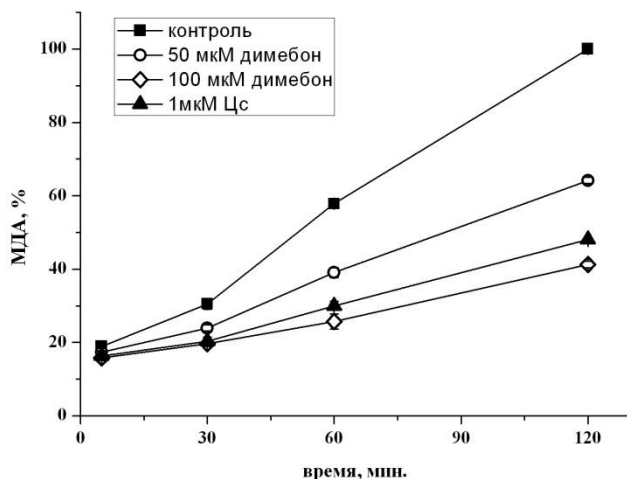


Рисунок 8. Перекисное окисление липидов в гомогенате мозга крыс в отсутствие индукторов. За 100% принимали концентрацию ТБК-реактивных продуктов в гомогенатах мозга через 120 минут инкубации при 37°C.

Таким образом, димебон, не являясь прямым антиоксидантом, способен подавлять перекисное окисление липидов в мозге.

Поиск потенциальных нейропротекторов в ряду структурных аналогов

димебона

С целью поиска новых потенциальных мультитаргетных нейропротекторов, обладающих также когнитивно-стимулирующим действием, в лаборатории синтеза физиологически активных веществ ИФАВ РАН было синтезировано 30 новых структурных аналогов димебона, содержащих фармакофорный тетрагидро- γ -карболиновый фрагмент. Нами была разработана совокупность методик для поиска потенциальных нейропротекторных препаратов по их влиянию на функции митохондрий. Все методы были адаптированы для проведения скрининга в планшетном формате. Для первичного скрининга использовали соединения в концентрации 30 мкМ, исходя из диапазона эффективных концентраций димебона на препаратах изолированных митохондрий и литературных данных для большой совокупности препаратов.

Синтезированные соединения отличаются заместителями у атома азота пиррольного цикла, а также заместителями в положении 2- и 8-тетрагидро- γ -карболиновой системы. В зависимости от природы заместителя у атома азота пиррольного цикла было условно выделено 3 группы соединений: монофторированные структурные аналоги димебона (группа 1), трифторметилсодержащие аналоги (группа 2) и амидоэтилкарболины (группа 3). В настоящей работе использовали гидрохлориды тетрагидро- γ -карболинов.

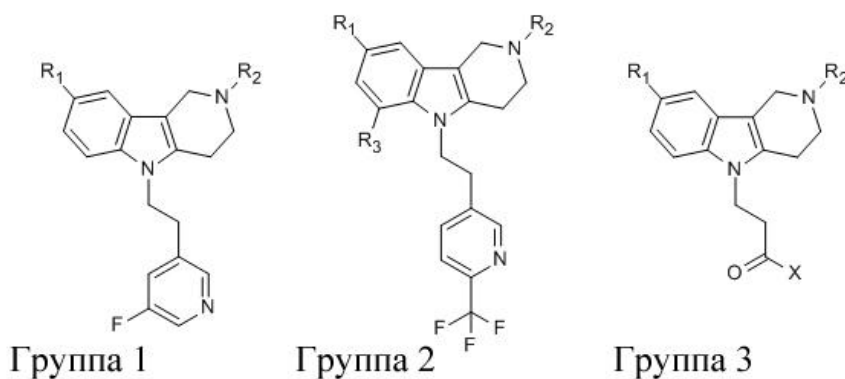


Рисунок 9. Общие структурные формулы исследованных классов аналогов димебона.

Все соединения были получены в виде гидрохлоридов.

Соединения группы 1 являются водорастворимыми, растворимость соединений групп 2 и 3 в воде значительно ниже, поэтому в работе предварительно готовили их растворы в ДМСО. При этом содержание ДМСО не превышало 1% при добавлении растворов соединений к биологическим объектам.

Скрининг биологической активности модифицированных пропионамидными кластерами тетрагидро- γ -карболинов

С целью поиска новых нейропротекторов, действующих на митохондрии мозга, были синтезированы структурные аналоги димебона - гидрохлориды N-замещенных 3-(1,2,3,4-тетрагидропиридо[4,3-b]индол-5-ил)пропионамидов (таблица 1).

Таблица 1. Структуры аналогов димебона группы 3.

Шифр	R ₁	R ₂	X
3-1a	H	C ₂ H ₅	-NH-5-Cl-Pyridin-2-yl
3-1b	CH ₃	CH ₃	-NH-5-Cl-Pyridin-2-yl
3-2b	CH ₃	CH ₃	-NH-3-Cl-C ₆ H ₄
3-2g	H	C ₂ H ₅	-NH-3-Cl-C ₆ H ₄
3-3a	H	CH ₃	-NH-3-OCH ₃ -C ₆ H ₄
3-3g	H	C ₂ H ₅	-NH-3-OCH ₃ -C ₆ H ₄
3-4a	H	CH ₃	-NH-3-CH ₃ -C ₆ H ₄
3-4b	CH ₃	CH ₃	-NH-3-CH ₃ -C ₆ H ₄
3-5b	CH ₃	CH ₃	-OC ₂ H ₅

Все вещества этой группы, за исключением соединения 3-1a, не оказывали существенного влияния на митохондриальный потенциал как при энергизации митохондрий субстратами комплекса I, так и комплекса II. Следовательно, данные соединения не оказывают разобщающего действия на дыхательную цепь митохондрий и не являются митотоксичными.

Соединения группы 3 (за исключением 3-5b) достоверно ($p < 0.05$) снижали скорость Ca²⁺-индуцированного набухания митохондрий мозга крыс. Скорость набухания митохондрий уменьшается в ряду 3-5b > 3-1a > димебон > 3-2g = 3-3a = 3-3g \geq 3-4a = 3-4b > 3-1b > 3-2b > ЦсА. Соединение 3-5b, в молекуле которого вместо ариламидного заместителя содержится алкоксикарбонильный заместитель, связанный с тетрагидро- γ -карболиновым фрагментом через этильный мостик, не оказывало влияния на скорость Ca²⁺-индуцированного набухания митохондрий. На основании

этого был сделан вывод, что наличие ароматической группы, присоединенной через линкер к γ -карболиновой группировке, также принципиально важно для ингибирования СМП. Данное предположение было подтверждено при исследовании влияния на СМП N-замещенных-тетрагидро- γ -карболинов, содержащих алкиновую группировку (пропаргильную). Степень ингибирования СМП в присутствии исследованных амидоэтилкарболинов зависела от природы заместителей в карболиновом цикле, и вида ароматической группы, присоединенной к фармакофору через этильный мостик. Так, соединения, содержащие в положении 8 метильный заместитель, проявили большую степень ингибирования по сравнению с остальными веществами.

Изучение влияния соединений группы 3 на кальциевую ёмкость митохондрий мозга крыс показало, что исследуемые соединения следует разделить на три группы по активности (таблица 2). Первую группу составляют соединения, для которых не показано значительного влияния на кальциевую ёмкость митохондрий: 3-3a, 3-3g, 3-4a, 3-5b. Вторая группа соединений (вещества, понижающие кальциевую ёмкость митохондрий) включает в себя единственное соединение 3-1a, которое приводило к деполяризации митохондрий и соответственно, к нарушению транспорта кальция в митохондрии. Особый интерес представляет третья группа – соединения 3-1b, 3-2b, 3-2g, 3-4b, увеличивающие кальциевую ёмкость митохондрий. Таким образом, на данном этапе скрининга среди исследуемых модифицированных пропионамидными кластерами тетрагидро- γ -карболинов были выявлены 4 соединения, более активные, чем исходный препарат димебон.

Таблица 2. Относительный коэффициент кальциевой ёмкости веществ группы 3 (по сравнению с контрольной пробой, содержащей равный объём ДМСО).

Соединение	3-1a	3-1b	3-2b	3-2g	3-3a	3-3g	3-4a	3-4b	3-5b	ЦсА	Дмб
Са-ёмкость	0.9	1.5	1.8	1.4	1.0	1.0	1.0	1.5	1.0	1.9	1.3

Все соединения группы 3 в концентрации до концентрации 400мкМ не оказывали достоверного влияния на ПОЛ в гомогенатах мозга при индукции с помощью т-БГП.

Исходя из структурных особенностей и активности веществ данной группы по отношению к митохондриям, смотрели действие соединений 3-2b, 3-2g и 3-3g на процесс образования активных форм кислорода митохондриями *in vitro*. Соединения в концентрации 30 мкМ не оказывали достоверного влияния на образование АФК митохондриями мозга в присутствии субстратов как комплекса I дыхательной цепи, так и комплекса II (в присутствии ротенона). Была получена тенденция увеличения образования АФК в присутствии соединения 3-2b, в наибольшей степени увеличивающего кальциевую емкость митохондрий. 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. Аналогичным эффектом обладает и исходный препарат – димебон.

Для соединений 3-2b, 3-2g и 3-3g также проводили оценку потенциальной цитотоксичности на первичных культурах нейронов коры головного мозга и на гранулярных клетках мозжечка новорожденных крыс, используя МТТ-тест. Было показано, что в концентрации выше 30 мкМ соединения снижают дегидрогеназную активность в клетках.

Скрининг биологической активности фторсодержащих тетрагидро- γ -карболинов

Проведено исследование биологической активности 19 фторсодержащих структурных аналогов димебона: двенадцати 5-фторпиридинсодержащих аналогов (группа 1, таблица 3) и семи 2-трифторметилпиридинсодержащих аналогов (группа 2, таблица 4). При работе с соединениями первой группы изучали действие на аппарат митохондрий мозга крыс как гидрохлоридов, так и гидробромидов. Однако было показано, что гидробромиды не обладают митонаправленной активностью, в отличие от гидрохлоридов. Поэтому дальнейший скрининг проводили только для гидрохлоридов.

Согласно разработанной схеме скрининга, на первом этапе оценивали действие соединений на явление Ca^{2+} -индуцированного открытия пор скачка митохондриальной проницаемости и на митохондриальный мембранный потенциал. Все вещества группы 1 и группы 2 в концентрациях до 100 мкМ (500 нмоль/мг) не

оказывали существенного влияния на митохондриальный мембранный потенциал как при энергизации митохондрий субстратами как комплекса I, так и комплекса II.

Таблица 3. Структурные формулы монофторированных аналогов димебона.

Структурная формула	Шифр	R ₁	R ₂
	1a	H	CH ₃
	1b	CH ₃	CH ₃
	1c	F	CH ₃
	1d	Cl	CH ₃
	1e	CH ₃	C ₂ H ₅
	1f	Cl	C ₂ H ₅
	1g	H	C ₂ H ₅
	1h	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
	1i	C ₂ H ₅	CH ₃
	1j	CH ₃	-CH(CH ₃) ₂
	1k	CH ₃	C ₃ H ₇
1l	-CH(CH ₃) ₂	CH ₃	

Таблица 4. Структурные формулы CF₃-содержащих аналогов димебона.

Структурная формула	Шифр	R ₁	R ₂	R ₃
	2a	H	CH ₃	H
	2b	CH ₃	CH ₃	H
	2c	F	CH ₃	H
	2d	Cl	CH ₃	H
	2f	Cl	C ₂ H ₅	H
	2m	OCH ₃	CH ₃	H
	2n	F	CH ₃	F

Среди соединений группы 1 были выявлены вещества, не оказывавшие достоверного влияния на процесс индуцированного добавлением раствора хлорида кальция открытия пСМП. Обнаружено, что соединения 1j и 1l, содержащие объемный изопропильный заместитель в тетрагидро-γ-карболиновом фрагменте молекулы. Соединение 1k (содержит *n*-пропильную группу в положении R₂) также не оказывает существенного влияния на процесс Ca²⁺-индуцированного открытия пСМП. Степень ингибирования СМП в присутствии соединения 1g была минимальной (12% ± 1%), соединение 1a не оказывало достоверного влияния на СМП. Таким образом, было предположено, что наличие заместителя в положении R₁- снижает митохондриально

направленную активность тетрагидро- γ -карболинов. Соединения, которые ингибировали набухание митохондрий, обладали количественно близкой к димебону активностью. Наиболее активным являлось соединение 1b.

Все соединения группы 2 достоверно ($p < 0.05$) снижали скорость индуцированного добавлением раствора хлорида кальция набухания митохондрий. Скорость набухания митохондрий в присутствии 30 мкМ исследуемых соединений изменяется следующим образом в зависимости от вещества: $2a = 2m > 2b = 2c > 2f = 2n = 2d$. Соединения 2d, 2f, 2n снижают скорость набухания митохондрий в 2 раза. Если оценивать процесс открытия пСМП по v_{max} (кривой изменения оптической плотности при длине волны 530 нм от времени после добавления раствора $CaCl_2$) соединения 2d, 2f, 2n ингибируют его на $(54\% \pm 6\%)$, $(44\% \pm 2\%)$ и $(48\% \pm 2\%)$ соответственно. Стоит отметить, что все наиболее активные соединения содержат атом галогена в качестве заместителя.

На основании данных о действии фторсодержащих структурных аналогов димебона на явление СМП для дальнейшего исследования активности были отобраны соединения 1b, 1e, 1f, 1h, 1i, 1l, 2b, 2d, 2e, 2f, 2n. Было показано, что все отобранные соединения достоверно увеличивают кальциевую ёмкость митохондрий мозга крыс (таблица 5). При этом были выявлены соединения, увеличивающие кальциевую ёмкость в большей степени, чем димебон. В большей степени, чем димебон, увеличивали кальциевую ёмкость соединения 1e, 1i, 1l группы 1 и соединение 2d группы 2. Наиболее активные соединения 1e, 1i, 1l увеличивают кальциевую ёмкость на 50% по сравнению с контролем (в присутствии соответствующего растворителя, используемого для приготовления исходных растворов веществ).

Таблица 5. Относительный коэффициент кальциевой ёмкости (по сравнению с контролем в присутствии соответствующего растворителя).

Соединение	1b	1e	1f	1h	1i	1l	2b	2d	2e	2f	2n
Ca-ёмкость	1.3	1.5	1.3	1.3	1.5	1.5	1.2	1.4	1.3	1.3	1.3

На основании полученных результатов для дальнейшего исследования были отобраны 6 соединений, по 3 из каждой группы, с идентичным строением тетрагидро-

γ -карболинового фрагмента внутри пар (1b, 1e, 1f и 2b, 2e, 2f). Отобранные соединения не оказывали статистически достоверного эффекта на генерацию АФК митохондриями *in vitro* ни при использовании митохондрий мозга, ни при использовании митохондрий печени крыс. Также сравнивали действие этих соединений на индуцированное т-БГП перекисное окисление липидов в гомогенатах мозга крыс. Было показано, что соединения 1b и 2b, как и димебон, в диапазоне концентраций 0.05 – 0.4 мМ не оказывают достоверного влияния на перекисное окисление липидов гомогенатов мозга крыс. Соединения 1e, 2e достоверно ингибировали ПОЛ в концентрациях 0.2 и 0.4 мМ, в то время как соединения 1f, 2f уже в концентрации 0.1 мМ при добавлении их к гомогенату мозга крыс снижали уровень инициированного т-БГП перекисного окисления липидов (рис. 10).

Таким образом, среди исследованных аналогов димебона были выявлены соединения, проявляющие более активное антиоксидантное действие, чем димебон. Способность соединений ингибировать ПОЛ зависит как от типа заместителей в тетрагидро- γ -карболиновой группировке в положениях R₁ и R₂, так и от вида заместителя у атома азота пиррольного цикла. Было показано, что CF₃-содержащие соединения 2e и 2f активнее соответствующих монофторированных аналогов группы 1 - 1e и 1f.

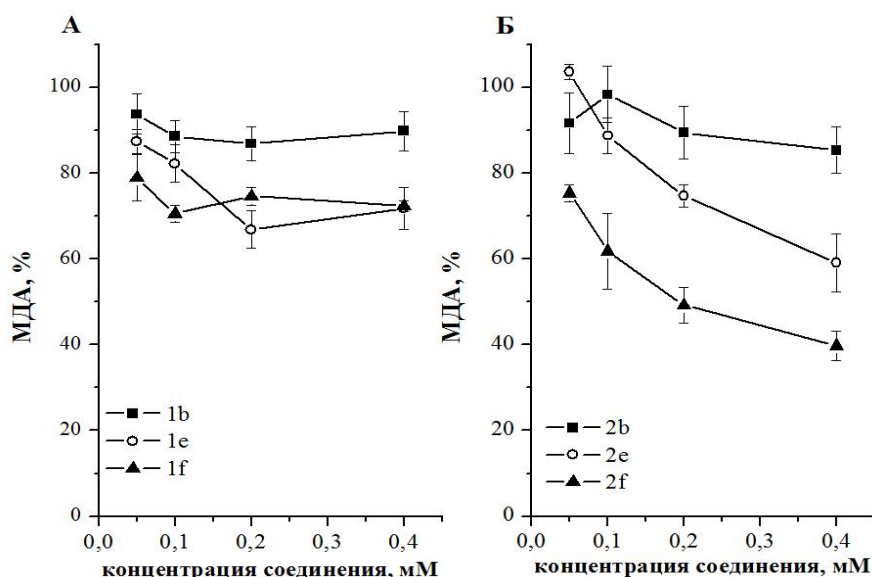


Рисунок 10. Действие соединений на вызванное т-БГП перекисное окисление липидов в гомогенате мозга крыс. А. Соединения 1b (—■—), 1e (—○—), 1f (—▲—) группы 1.

Б. Соединения 2b (—■—), 2e (—○—), 2f (—▲—) группы 2.

Для оценки потенциальной цитотоксичности исследовали действие соединений на первичные культуры нейронов коры головного мозга и мозжечка новорожденных крыс. Было показано, что в концентрации 30 мкМ соединения не влияют на выживаемость клеток, соответствующую общей дегидрогеназной активности клеток (тест МТТ), при инкубации клеток с веществами в течение суток. Соединения группы 1 в концентрации 100 мкМ также не проявляют цитотоксического действия на клетки коры головного мозга новорожденных крыс, в то время как вещества группы 2 при повышении концентрации до 100 мкМ снижают дегидрогеназную активность.

Для соединения 1b была проведена оценка нейропротекторного действия в условиях тБГП-токсичности и глутаматной эксайтотоксичности. Было показано, что соединение 1b в концентрации 10 мкМ достоверно увеличивает выживаемость клеток в использованных моделях нейротоксичности (рис. 11).

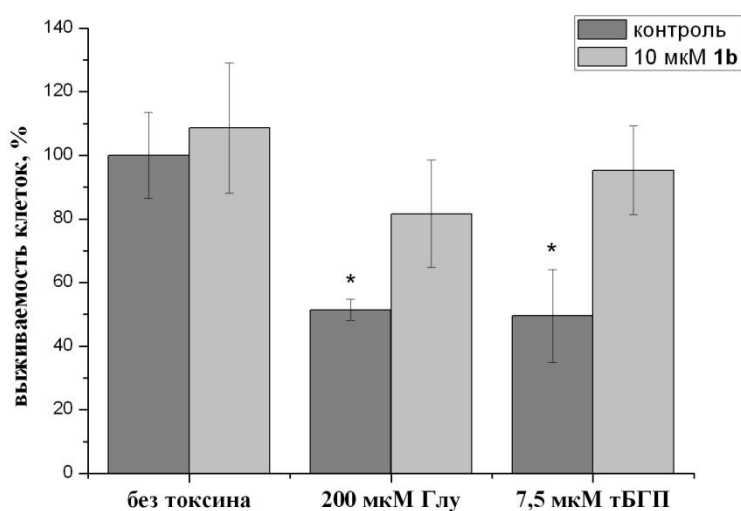


Рисунок 11.

*Действие соединения 1b (10 мкМ) на выживаемость нейронов (МТТ-тест) через 24 часа в условиях нейротоксичности.
* - $p < 0.05$ по t -test.*

Таким образом, соединение 1b способно оказывать нейропротекторное действие как в условиях оксидативного стресса, так и в условиях глутаматной эксайтотоксичности.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Разработана комплексная система скрининга соединений на проявление митопротекторной активности как основа создания мультитаргетных нейропротекторных препаратов. Проведено исследование активности свыше тридцати новых тетрагидро- γ -карболинов с использованием разработанной системы методов скрининга.
2. Впервые установлено, что митохондрии мозга мышей линии 5xFAD (трансгенной модели болезни Альцгеймера) обладают значительно сниженной кальциевой ёмкостью.
3. Обнаружено, что способность димебона увеличивать устойчивость митохондрий мозга крыс к СМП проявляется в условиях энергизации митохондрий, не зависит от присутствия в среде АДФ и не связана с влиянием на конформационные переходы переносчика адениновых нуклеотидов. Димебон одинаково эффективно ингибирует скачок митохондриальной проницаемости *in vitro* как на митохондриях мозга, так и на митохондриях печени крыс.
4. Показано, что в ряду структурных аналогов димебона способность влиять на устойчивость митохондрий к индукции СМП зависит не только от вида заместителей в тетрагидро- γ -карболиновом фрагменте молекулы соединения, но и от группы, связанной с пиррольным атомом азота через этильный мостик. Соединения, содержащие алифатический заместитель, в указанных экспериментах не активны.
5. В ряду структурных аналогов димебона выявлены соединения-хиты, представляющие интерес для дальнейшей разработки в качестве потенциальных лекарственных препаратов с целью лечения нейродегенеративных заболеваний. Соединение-лидер (вещество 1b) передано для доклинических испытаний в рамках Федеральной целевой программы Министерства образования и науки.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. 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. №3. С. 815-819.

2. **Виноградова Д.В.**, Неганова М.Е., Серкова Т.П., Шевцова Е.Ф. Митопротекторные свойства производных гамма-карболинов. Естественные и технические науки. 2013. №6, С.73-78.
3. 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- γ -carboline containing peptide residues". Beilstein Journal of Organic Chemistry. 2014. V.10. pp. 155-162.
4. Shevtsova E.F., **Vinogradova D.V.**, Kireeva E.G., Reddy V.P., Aliev G., Bachurin S.O. Dimebon Attenuates the A β -induced Mitochondrial Permeabilization. Current Alzheimer Research. 2014. V.11. ID 24801220.

Тезисы докладов:

1. E.F. Shevtsova, S.G. Klochkov, **D.V. Vinogradova**, E.G. Kireeva, L.G. Dubova, S.O. Bachurin "Mitochondria as the test system for primary screening of new neuroprotector and drugs toxicity prediction". MipTec - The Leading European Event for Drug Discovery. Basel. 2010.
2. E. Shevtsova, **D. Vinogradova**, E. Kireeva and S. Bachurin "Mitochondria as the target for neuroprotection". 2011. 8 th IBRO Word Congress of Neuroscience. B375.
3. E. Shevtsova, **D. Vinogradova**, E. Kireeva, S. Bachurin. "Importance of targeting mitochondria in the search for new neuroprotectors". European Neuropsychopharmacology. 2011. V.21 Suppl 3. pp.S288-S289
4. **Д.В. Виноградова**, Т.П. Серкова, В.Б. Соколов, Е.Ф. Шевцова. "Влияние Новых Амидосодержащих Гамма-Карболинов На Функциональные Характеристики Митохондрий" Химия, структура и функция биомолекул: материалы IV междунар. науч. конф., Минск, 17-19 октября 2012 г. /Ин-т биоорг. хим. НАН Беларуси, редкол.: С.А.Усанов [и др.]. - Минск, 2012. - С. 33.
5. **Виноградова Д.В.**, Дубова Л.Г., Шевцова Е.Ф. "Действие димебона на неспецифическую проницаемость митохондрий мозга крыс" **БИОЛОГИЯ – НАУКА**

XXI ВЕКА: 17-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых, Пущино, 21 – 26 апреля 2013 г. Пущино, 2013. С.262.

6. **D. Vinogradova**, E.F. Shevtsova, S.O. Bachurin “Evaluation of the effects of gamma-carboline derivatives on the brain mitochondria”. *European Neuropsychopharmacology*. 2013. V.23 Suppl 2. pp.S211.
7. **Д.В. Виноградова**, Е.Г. Киреева, А.Ю. Аксиненко, В.Б. Соколов, Е.Ф. Шевцова, С.О. Бачурин «Поиск нейропротекторов в ряду тетрагидро-гамма-карболинов». Первая Российская конференция по медицинской химии (MedChem Russia-2013) с международным участием (сборник тезисов). Москва, 2013. С.211.