

На правах рукописи

Неганова Маргарита Евгеньевна

**ПРОИЗВОДНЫЕ АЛКАЛОИДА СЕКУРИНИНА И
ИЗОАЛАНТОЛАКТОНОВ В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ
НЕЙРОПРОТЕКТОРОВ**

Специальность 02.00.10 – биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Черноголовка 2012

Работа выполнена в лаборатории нейрoхимии ФАВ Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологически активных веществ Российской академии наук.

Научный руководитель: кандидат химических наук
ШЕВЦОВА Елена Феофановна

Официальные оппоненты: доктор химических наук
МИЛАЕВА Елена Рудольфовна

кандидат химических наук
БОБРОВ Михаил Юрьевич

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук
Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН

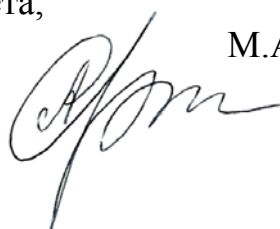
Защита диссертации состоится «28» февраля 2012 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 002.102.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологически активных веществ Российской академии наук по адресу:

142432, Московская обл., г.Черноголовка, ул. Северный проезд, д. 1.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологически активных веществ Российской академии наук.

Автореферат разослан «24» января 2012 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



М.А. Афанасьева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Общее увеличение продолжительности жизни, связанное с успехами медицины в лечении сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний все в большей степени выводит на верхние строчки в статистике смертности нейродегенеративные заболевания. В основе своей нейродегенерация представляет прогрессивно нарастающий процесс гибели анатомически обособленной группы нервных клеток головного мозга, функциональное предназначение которой определяет клинические проявления соответствующего конкретного заболевания. Таким образом, основой патогенеза таких широко распространенных заболеваний как болезни Альцгеймера и Паркинсона, а также целого ряда менее известных расстройств является *нейродегенеративный процесс*, локализованный в том или ином отделе центральной нервной системы.

Исследование как общих механизмов нейродегенерации, так и специфических механизмов развития различных нейродегенеративных заболеваний имеет огромное значение для поиска путей их фармакологической коррекции. Существуют многочисленные данные, свидетельствующие о роли митохондрий и окислительного стресса в развитии нейродегенерации. Более того, эти два явления, первоначально считавшиеся независимыми и относящимися к разным уровням организации живой клетки, оказались глубоко взаимосвязанными и, в известной мере, взаимно порождают друг друга. Данный вывод поставил в практическую плоскость решение задачи о целенаправленном фармакологическом воздействии на вышеуказанные элементы ранних стадий нейродегенерации, что послужило фундаментальной предпосылкой для постановки настоящей работы.

Современная индустрия лекарственных средств имеет в качестве научной базы многоуровневую систему биологических исследований. Начальным звеном этой системы является первичный скрининг

(тестирование) химических соединений на биологическую активность. На основании полученных данных делаются предварительные выводы о возможных механизмах биологического действия новых химических веществ, намечаются пути их дальнейшей направленной химической модификации с целью оптимизации биологической активности.

Полученные таким образом химические структуры вновь проходят стадию первичного скрининга на простых лабораторных экспресс-моделях биологической активности. Затем по результатам этих анализов отбираются так называемые вещества-лидеры, обладающие оптимальными полезными свойствами. В дальнейшем отобранные вещества проходят ряд дополнительных этапов скрининга на последовательно усложняющихся биологических моделях.

Одним из плодотворных подходов к поиску лекарственных средств является химическая модификация природных соединений с последующей проверкой их биологической активности. В ИФАВ РАН в лаборатории природных соединений был синтезирован ряд новых производных на основе природного алкалоида секурина и изоалантолактонов.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы был поиск потенциальных нейропротекторов в ряду новых синтетических производных алкалоида секурина и изоалантолактонов.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать антиоксидантные свойства в ряду производных алкалоида секурина и изоалантолактонов на модели перекисного окисления липидов гомогената мозга крыс.
2. Определить механизмы антиоксидантного действия, изучаемых веществ.
3. Исследовать влияние производных природного алкалоида секурина и изоалантолактонов на функциональные характеристики митохондрий.

4. Исследовать нейропротекторную активность веществ-лидеров на различных клеточных моделях нейротоксичности.
5. Провести первичную оценку веществ-лидеров в экспериментах *in vivo*.

Научная новизна работы. Впервые был проанализирован ряд новых производных природного алкалоида секуринина и изоалантолактонов и изучена их биологическая активность. Найдены соединения, которые проявляют антиоксидантные свойства - активно ингибируют ПОЛ в гомогенате мозга крыс и этот эффект связан как с хелатированием ионов железа, так и с радикалсвязывающими свойствами полученных аддуктов. При изучении влияния веществ на функциональные характеристики митохондрий и выживаемость клеток в условиях клеточной токсичности выявлено вещество – лидер алломаргаритарин (АМ), проявляющее мито- и цитопротекторные свойства.

Практическая значимость работы. Результаты работы могут быть использованы для:

-Анализа взаимосвязи структура-активность при планировании работ по химическому синтезу новых химических структур на основе природных соединений с нейропротекторной активностью

-Выбора наиболее перспективных соединений из ряда исследуемых аддуктов для последующего углубленного изучения и оптимизации структуры для создания эффективных нейропротекторных препаратов.

Апробация результатов исследования. Результаты работы были представлены на Всероссийской конференция молодых ученых и III школе им. Академика Н.М. Эмануэля (Москва, 2008), на 4-м международном симпозиуме по достижениям в области молекулярных механизмов нейродегенеративных заболеваний (the 4th European Society for Neurochemistry Conference on Advances in Molecular Mechanisms of Neurological Disorders, Ляйпциг, Германия, 2009), на 5-м международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Крым, Украина, 2009), на 6-й Всероссийской конференции «Химия и

технология растительных веществ» (Санкт-Петербург, 2010), на международном симпозиуме по патофизиологии, активным формам кислорода и азота (“International Symposium on the Pathophysiology of Reactive Oxygen and Nitrogen Species ”. Саламанка, Испания, 2010), на 21 Съезде физиологического общества имени И.П.Павлова (Москва – Калуга, 2010), на 3-м Всероссийском, с международным участием, конгрессе студентов и аспирантов «Симбиоз-Россия 2010» (Нижний Новгород, 2010), на 6-м международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (устный доклад, Судак, Крым, Украина, 2010).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 19 печатных работ, в том числе 4 статьи в периодических изданиях, соответствующих Перечню ВАК, и 15 работ в сборнике материалов докладов научных конференций.

Структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, методов и материалов, результатов и обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 125 страницах и включает 31 рисунок и 6 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 249 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Для экспериментов *in vitro* использовались самцы нелинейных беспородных крыс, весом 200-220 г. В опытах *in vivo* – самцы мышей линии CD1, весом 20-25 г. Животные содержались в условиях стандартного вивария с 12-ти часовым световым режимом и свободным доступом к воде и пище (в случае выделения митохондрий печени у крыс изымался корм за 24 часа до эксперимента). Все манипуляции с животными проводились в соответствии с решениями комиссии по Биоэтике ИФАВ РАН.

Приготовление гомогената мозга крыс. Декапитацию заранее наркотизированных CO₂ животных проводили с помощью гильотины. Мозг гомогенизировали в ледяном растворе 120 mM KCl/ 20mM HEPES. Для

получения субклеточной фракции гомогенат мозга центрифугировали при 1500g и далее работали с супернатантом.

Выделение митохондрий. Митохондрии мозга крыс получали центрифугированием в градиенте плотности Перколла по методу Sims N.R. Определение белка в препаратах митохондрий и гомогенате мозга крыс проводили микробиуретовым методом. Стандартная митохондриальная фракция содержала 8-10мг белка на мозг. Митохондрии хранили при 4°C. Функциональная активность митохондрий мозга крыс сохранялась в течение 2,5-4 часов.

Оценка антиоксидантной активности. Антиоксидантную активность исследовали на модели перекисного окисления липидов (ПОЛ) гомогената мозга крыс. Уровень ПОЛ определяли по модифицированному для проведения в плащечном формате ТБК-тесту.

Определение Fe^{2+} - хелатирующей активности. Fe^{2+} -хелатирующую активность определяли по модифицированной методике Gulcin. Метод основан на конкуренции исследуемого вещества с известным хелатором железа феррозином, образующим окрашенный комплекс с Fe^{2+} с пиком поглощения 562нм.

Определение антирадикальной активности. Антирадикальную активность оценивали: 1) по уровню восстановления стабильного свободного радикала дифенилпикрилгидразила (ДФПГ) 2) по методу CUPRAC, основанному на оценке восстанавливающей активности исследуемого вещества в отношении комплекса неокупроина с Cu^{2+} . В качестве референтного соединения использовали известный антиоксидант – тролокс, данные рассчитывали в относительных его единицах и выражали в тролокс-эквивалентах (ТЭ).

Определение степени ингибирования липоксигеназы. Определение степени ингибирования фермента липоксигеназы проводили спектрофотометрически по образованию продукта окисления линолевой кислоты при λ_{max} 234 нм.

Изучение скачка митохондриальной проницаемости (СМП). СМП исследовали, измеряя спектрофотометрически уменьшение оптической

плотности суспензии митохондрий при 540 нм. Проба содержала 0,2 мг белка/мл изолированных митохондрий мозга крыс. Инициаторами СМП служили хлористый кальций или синтетический пептид β -амилоид 25-35 (А β) фирмы Bachem. Каждый эксперимент проводился в трех повторностях. Скорость набухания оценивали по тангенсу угла наклона наиболее крутого участка кривой зависимости A_{540} от времени и представляли в процентах от контроля.

Измерение мембранного потенциала митохондрий. Мембранный потенциал митохондрий измеряли спектрофотометрически с использованием потенциал-зависимого индикатора сафранина А в кювете спектрофотометра Beckman DU 640 при 25°C и постоянном перемешивании.

Оценка кальциевой емкости митохондрий. Кальциевую ёмкость митохондрий определяли путем измерения концентрации внешнего кальция в суспензии митохондрий (0,2 мг белка в мл) с помощью металлохромного индикатора арсеназо III (50 мкМ) при дробном добавлении к митохондриям низких подпороговых концентраций кальция.

Клеточные модели нейротоксичности. Нейроны получали из коры мозга новорожденных крыс (1-2 сут) способом трипсинизации с последующим пипетированием. Эксперименты проводились на 8-10 суточных культурах. Нейротоксичность индуцировали добавляя к культуре клеток Fe^{3+} , глутамат (Глу) или А β . Выживаемость нейронов определяли с помощью МТТ теста по методике Niks и Otto.

Методы, использованные для первичной *in vivo* характеристики веществ-лидеров (оценка токсичности, влияние на развитие судорог в различных моделях эпилепсии и т.д.) подробно описаны в разделе материалы и методы диссертационной работы.

Анализ и статистическую обработку всех полученных данных проводили с помощью программ Origin 7.5, Microsoft Excel 2010 и Statistica 5.5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследуемые соединения. Для химической модификации были выбраны алкалоид секуринин (СКР), выделяемый из секуринеги ветвистой (*Securinega suffruticosa* (Pall.) Rehd), и сесквитерпеновые лактоны – изоалантолактон (ИАЛ) и эпоксиизоаланталактон (эИАЛ), выделяемые из девясила высокого (*Inula helenium* L.) (табл.1). Широкий спектр биологической активности указанных соединений, включая разнообразные нейротропные эффекты, позволяет рассматривать их в качестве перспективных предшественников, на основе которых с помощью направленной химической модификации могут быть созданы новые высокоэффективные соединения, обладающие нейропротекторными свойствами.

Исходные соединения содержат активированную двойную связь, по которой легко присоединяются *N*-нуклеофилы (реакция Михаэля). В качестве аддентов использовали амины (например, 4-(4-метоксифенил)пиперазин) и природные алкалоиды, содержащие первичную или вторичную аминогруппу, – триптамин, эфедрин, анабазин, сальсолин и др. Реакции лактонов с *N*-нуклеофилами протекают в мягких условиях и отличаются высокой стереоселективностью. В случае СКР для образования только одного стереоизомера требуется катализ кислотой Льюиса. На основе СКР были синтезированы аддукты 4-5, на основе ИАЛ – 6-18, на основе эИАЛ – 19-22 (табл.1.).

Антиоксидантные свойства производных секуринина и изоалантолактонов. Антиоксидантные свойства исследуемых веществ оценивали по уровню ингибирования иницированного ПОЛ гомогената мозга крыс. В качестве инициаторов ПОЛ использовали Fe^{3+} и *трет*-бутилгидропероксид (т-БГП). Установлено, что исходные соединения не проявляют антиоксидантной активности либо усиливают интенсивность Fe^{3+} -индуцированного ПОЛ, проявляя прооксидантные свойства. В то же время,

большинство синтетических аддуктов, полученных на основе исходных соединений, эффективно подавляют Fe^{3+} -индуцированное ПОЛ (табл.1). При этом наибольшей активностью обладают аддукты на основе триптамина (табл.1, соединения СКР-5272 (4), ИАЛ-5272 (6), эИАЛ-5272 (19)). При иницировании ПОЛ т-БГП исследуемые соединения так же проявили антиоксидантную активность, но в меньшей степени. Данное обстоятельство косвенно свидетельствовало о том, что антиоксидантная активность данных соединений может быть связана с их железохелатирующей способностью.

Для более углубленного изучения механизма, лежащего в основе антиоксидантного действия исследуемых веществ, мы произвели оценку их железохелатирующей и антирадикальной активности в модельных химических системах. Большинство изученных соединений (14 из 19) проявили выраженную Fe^{2+} -хелатирующую активность. Меньшее количество соединений проявили антирадикальную активность: 9 из 19 по ДФПГ-тесту; 3 из 19 по CUPRAC-тесту (табл.1). Это согласуется с предположением о том, что антиоксидантная активность большинства из изученных соединений связана с их железохелатирующей способностью.

В пользу указанного вывода свидетельствуют также результаты анализа взаимосвязи между структурой исследуемых соединений и их Fe^{2+} -хелатирующей способностью, которая оказалась напрямую связанной с наличием вторичного атома азота. Включение указанного атома в циклическую структуру с переходом в третичное состояние приводит к исчезновению хелатирующего эффекта у соответствующих соединений (табл. 1, соединения СКР-154 (5), ИАЛ-290 (14), ИАЛ-292 (17), эИАЛ-165 (20), эИАЛ-290 (21)).

Таблица 1. Антиоксидантные свойства производных секуринина и сесквитерпеновых лактонов.

Исходные соединения	№	шифр	формула	% инг.ПОЛ 0,1мМ вещества (индуктор -Fe ³⁺)	% инг.ПОЛ 0,1мМ вещества (индуктор - т-БГП)	Fe ²⁺ хелатирующая активность (%) 0,1мМ вещества	Антирадикальная активность (%) 0,1мМ вещества	
	Исходные соединения	1	L12 (СКР)		---	< 10	---	< 10 %
2		L01 (ИАЛ)		---*	---	---	---	
3		L04 (эИАЛ)		---*	---	---	---	
СКР-анalogи	4	СКР -5272a (АМ)		85,6±4,5 (IC ₅₀ = 65,9±8)	19,2±4,8	49,3±3,7	12±0,53	
	5	СКР -154		---*	---*	---	---	
ИАЛ-анalogи	6	ИАЛ-5272		65,7±16,3 (IC ₅₀ = 31,2±11)	---	85,5±4,3 (EC ₅₀ = 30,6±3,2)	---	
	7	ИАЛ -5488		65,4±5,4 (IC ₅₀ =13,9±1,1)	---	81,5±2,6 (EC ₅₀ =40,2±2,9)	---	
	8	ИАЛ -Т2		85,4±1,4 (IC ₅₀ = 4,2±2,4)	39,8±4,7	25,4±5,1	35,3±0,9	
	9	ИАЛ -Т4		86,2±1,8 (IC ₅₀ = 3,9±0,4)	32,5±3,1	34,7±0,7	28,2±0,7	
	10	ИАЛ -Т6		81,6±1,2 (IC ₅₀ = 5,0±1,0)	22,4±5,4	42,7±3,1	14,7±2,9	
	11	ИАЛ -Т7		86,9±17,4 (IC ₅₀ = 4,3±0,4)	46,9±6,4	32,4±2,5	19,4±0,4	
	12	ИАЛ -Т8		97,3±0,2 (IC ₅₀ = 7,7±0,6)	31,4±2,5	39,7±0,9	< 10	
	13	ИАЛ -165		17,07±5	---	38,4±3,1 (EC ₅₀ > 100мкМ)	---	
	14	ИАЛ -290		47,5±1,8	10±0,5	---	< 10	
	15	ИАЛ -181		33,1±27,4	---	53,7± 3,9 (EC ₅₀ =86,8±1,9)	< 10	
	16	ИАЛ -288		34,9±8,9	12,4±4,2	---	68,9±2,1	
	17	ИАЛ -292		---	---	---	---	
	18	ИАЛ -3077		---*	---*	62,3±15 (EC ₅₀ = 45±14,6)	---	
	эИАЛ-анalogи	19	эИАЛ -5272		65,5±3,4 (IC ₅₀ =31,9±10, 1)	---	59,8±4,3 (EC ₅₀ =83,02±4,3)	---
		20	эИАЛ -165		23,8±4,7	13,4±2,2	59,9±1,9 (EC ₅₀ =74,6±4,8)	---
		21	эИАЛ -290		35,1±4,9	13,4±1,8	---	---
		22	эИАЛ -181		11,2±2,01	---	35,6±2,8	---

(---*) - активирование процесса, (---) - отсутствие эффекта.

Таким образом, соединения, обладающие металлхелатирующими свойствами, эффективно снижают ПОЛ, индуцированное Fe^{3+} , блокируя процесс на стадии инициирования реакции Фентона.

Вместе с тем, нельзя исключать вклад антирадикального механизма в антиоксидантное действие некоторых из исследуемых веществ. Об этом свидетельствует как эффект ингибирования ПОЛ, индуцированного т-БГП, так и небольшая антирадикальная активность в ДФПГ- и CUPRAC тестах.

Как видно из рисунка 1, только аддукты с триптамином проявили активность сравнимую с тролоксом в тесте CUPRAC. При этом одно из соединений, аддукт секуринина и триптамина алломаргаритарин (АМ) был в 1,67 раза активнее эталона.

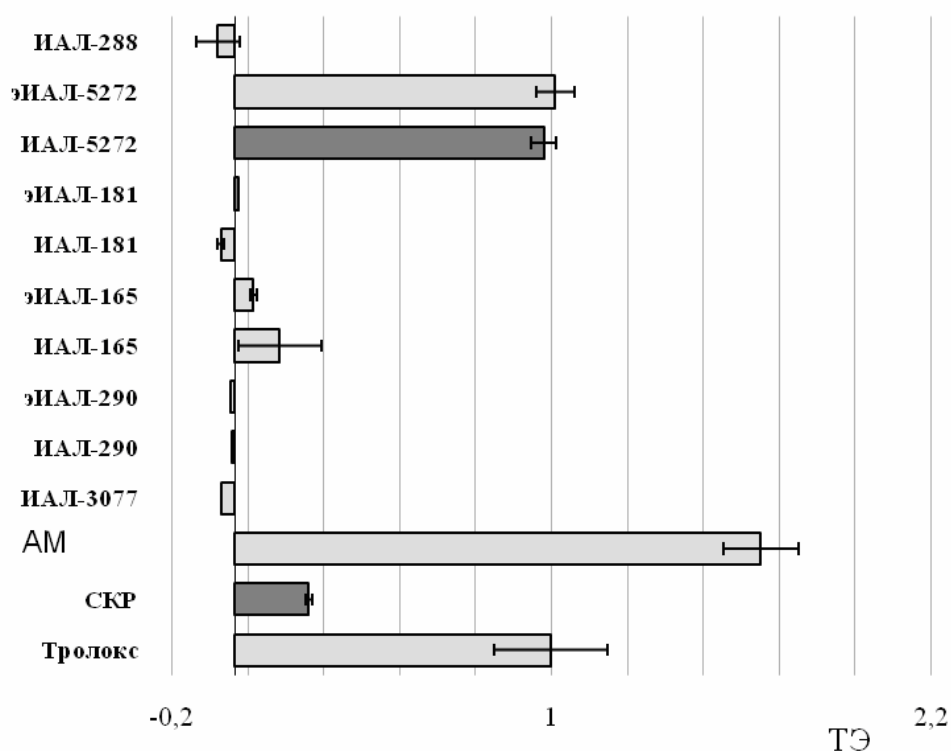


Рисунок 1. Восстановительная способность производных алкалоида секуринина и сесквитерпеновых лактонов в тесте CUPRAC.

Дополнительным вкладом в антиоксидантную активность аддуктов с триптамином может служить обнаруженная нами их способность к ингибированию активности липоксигеназы, фермента запускающего процесс ферментативного ПОЛ (табл.2).

Таблица 2. Способность триптаминовых производных секуринина и лактонов ингибировать активность липоксигеназы.

Вещество	% ингибирования активности липоксигеназы в присутствии 0,1 мМ вещества	IC ₅₀ , мкМ
СКР-5272 (АМ)	44,6 ± 2,5	≥100
ИАЛ-5272	28,6 ± 6,7	--
эИАЛ-5272	65,9 ± 8,7	66,2 ± 6,13

Таким образом, в основе обнаруженной нами антиоксидантной активности изученных производных секуринина и изоалантолактонов могут лежать различные молекулярные механизмы, включающие как выраженную железохелатирующую способность большинства данных веществ, так и прямое антирадикальное действие для ряда триптаминовых аддуктов. С учетом всей совокупности полученных нами экспериментальных данных мы выделили группу триптаминсодержащих аддуктов в качестве наиболее перспективных соединений для дальнейших исследований (СКР-5272 (4), ИАЛ-5272 (6), эИАЛ-5272 (19)).

Известно, что окислительный стресс и накопление концентрации свободного железа являются важными факторами в развитии возраст-зависимых нейродегенеративных заболеваний. Поэтому обнаруженная у исследованных соединений как антиоксидантная активность в целом, так и их железохелатирующая способность могут рассматриваться в качестве перспективных атрибутов потенциальных нейропротекторов.

Изучение влияния исследуемых веществ на функциональные характеристики митохондрий. Митохондрии, в частности СМП, играют ключевую роль в каскадах клеточной гибели, в регуляции кальциевого гомеостаза и в обеспечении энергетической достаточности клеток, что особенно важно для клеток мозга. Ранее было показано, что как окислительный стресс, так и целый ряд известных нейротоксинов, в том числе и Аβ, потенцируют СМП, а применяемые в практике нейроактивные лекарственные препараты с нейропротекторным эффектом способны повысить устойчивость митохондрий к индукции СМП.

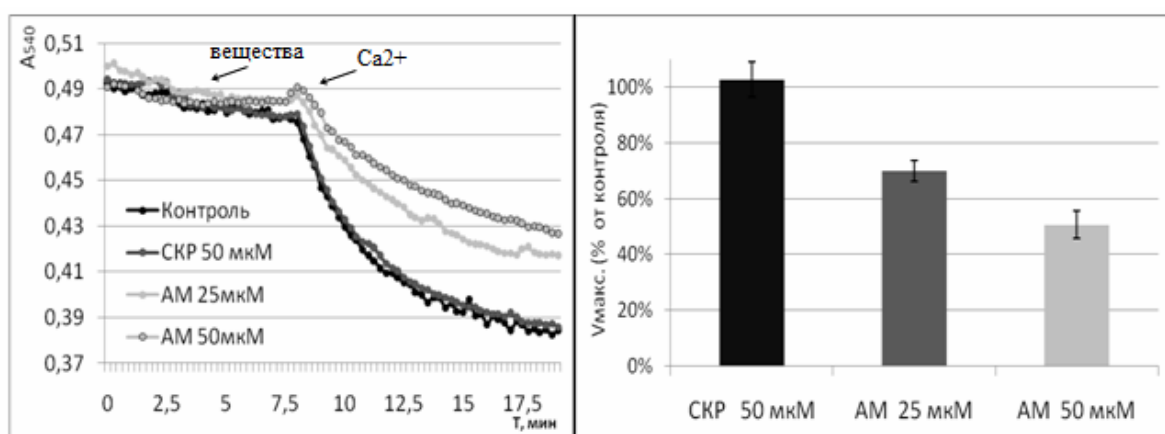
Таким образом, оценка влияния исследуемых соединений на функциональные характеристики митохондрий, включая СМП, может рассматриваться в качестве важной тестовой методики для отбора потенциальных нейропротекторов.

Влияние производных секуринина и изоалантолактонов на митохондрии анализировали по трём основным параметрам:

1. Влияние на кальций-индуцированное «набухание» митохондрий, обусловленное изменением формы митохондрий в результате индукции СМП.
2. Влияние на мембранный потенциал митохондрий.
3. Влияние на кальциевую ёмкость митохондрий.

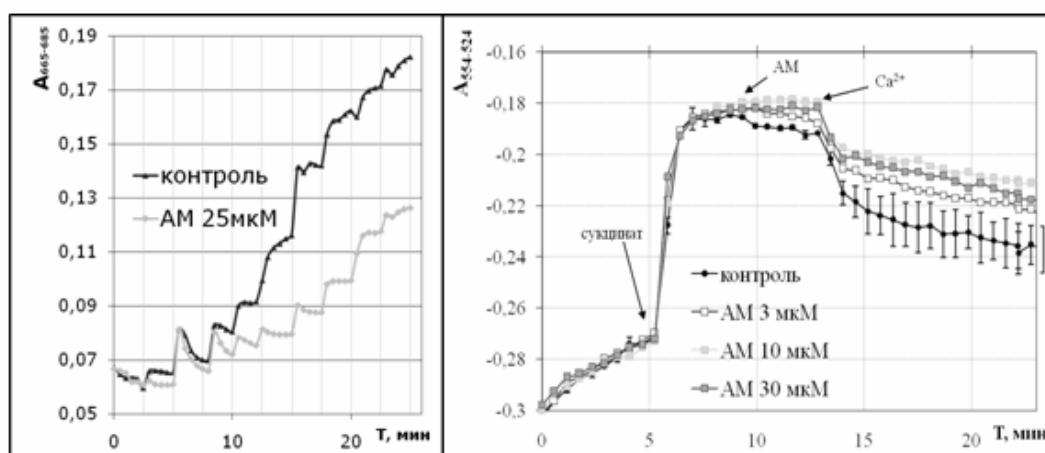
Второй из указанных параметров является наиболее критичным с точки зрения потенциальной цитотоксичности исследуемых веществ. По этой причине вещества, существенно влияющие на мембранный потенциал митохондрий, исключались из дальнейших исследований. Оставшиеся соединения были протестированы по влиянию на устойчивость митохондрий к Ca^{2+} -индуцированному СМП. Среди изученных веществ наибольший интерес представлял триптаминовый аддукт секуринина (СКР -5272а (АМ)), который ранее уже был включен нами в группу наиболее активных антиоксидантов.

Как видно из рисунка 2 АМ: 1) не оказывает влияния на трансмембранный потенциал митохондрий в присутствии субстратов дыхательной цепи (рис.2В), 2) дозозависимо ингибирует Ca^{2+} -вызванное «набухание» митохондрий мозга крыс (рис.2А-Б), 3) увеличивает кальциевую емкость митохондрий (рис.2Г).



А

Б



В

Г

Рисунок 2. Влияние СКР и АМ на функциональные характеристики митохондрий (А, В, Г)-типичные графики кинетики, соответственно: Ca^{2+} -индуцированного набухания митохондрий, трансмембранного потенциала и кальциевой ёмкости митохондрий; (Б) - нормированные значения скорости набухания митохондрий.

Как было показано ранее, Аβ потенцирует Ca²⁺-индуцируемое СМП в изолированных митохондриях печени и мозга крыс. Преинкубация изолированных митохондрий мозга крыс с АМ приводит к эффективному подавлению Аβ-(Ca²⁺)-вызванной индукции СМП (рис.3)

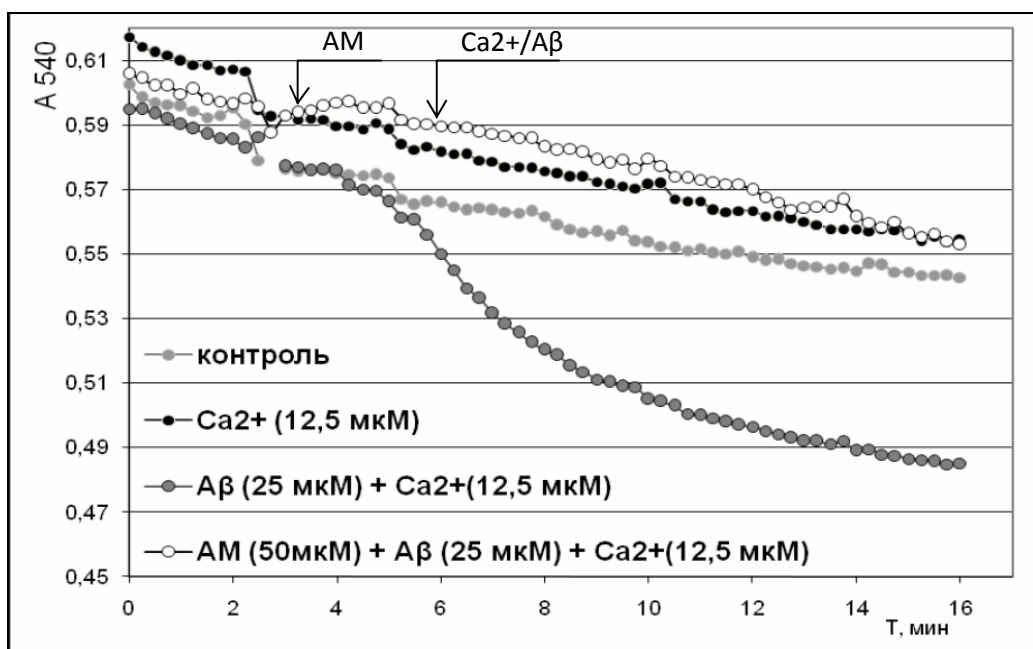


Рисунок 3. Влияние АМ на Аβ-(Ca²⁺)-индуцируемое набухание митохондрий.

По результатам первичного отбора, из широкого ряда синтетических производных природного алкалоида секурина и сесквитерпеновых лактонов было выделено соединение алломаргаритарин, обладающее как высокой антиоксидантной активностью, так и выраженным митопротекторным действием. С учетом того, что данные свойства алломаргаритарина могут обеспечить целенаправленное фармакологическое воздействие на базовые элементы ранних стадий нейродегенерации: окислительный стресс и дисфункцию митохондрий, от этого соединения можно было ожидать высокой нейропротекторной активности.

Изучение нейропротекторных свойств вещества-лидера АМ на клеточных моделях нейротоксичности. Нейропротекторная активность АМ изучалась на первичной культуре нейронов коры головного мозга крыс

при различных видах клеточной токсичности (глутаматная токсичность, железо-индуцированная токсичность и Аβ-индуцированная токсичность).

Гибель нейронов под действием глутамата (эксайтотоксичность), является одним из основных путей гибели клеток головного мозга при нейродегенерации. Механизмы эксайтотоксической гибели клеток интенсивно исследуются в настоящее время. Существуют экспериментальные данные, подтверждающие значительную роль окислительного стресса, митохондрий и, в частности, СМП в этом процессе.

В условиях нашего эксперимента инкубация клеток коры мозга крыс с 0,025 мМ АМ после токсического воздействия глутамата значительно увеличивает процент выживших клеток, в отличие от СКР (рис.4).

Для ряда нейродегенеративных заболеваний показано накопление в мозге свободных форм железа, с токсическим воздействием которого также может быть связан нейродегенеративный процесс.

В мозге больных болезнью Альцгеймера увеличение аккумуляции свободных ионов железа наблюдается как вне- так и внутриклеточно, что, в частности, обуславливает свободнорадикальные повреждения клеток, нарушение функций митохондрий, и может быть причиной гибели нейронов.

Инкубация клеток коры мозга крыс с 0,1мМ Fe³⁺ вызывает снижение выживаемости клеток на 47%. АМ, в отличие от СКР, достоверно защищает нейроны в культуре клеток коры головного мозга крыс от токсического действия Fe³⁺ (рис.4).

Как было показано ранее, АМ, но не СКР, эффективно предотвращает Аβ-вызванную индукцию процесса СМП, а СКР, в соответствии с имеющимися данными предотвращает Аβ токсичность *in vivo*. При инкубации первичной культуры нейронов коры мозга с 25 мкМ Аβ выживаемость клеток снижается на 26%. СКР не вызывает очевидного увеличения выживаемости нейронов в присутствии Аβ. В присутствии АМ токсический эффект Аβ снижается (рис.4). Этот эффект может быть связан

как с антиоксидантным эффектом АМ, так и его способностью увеличивать устойчивость митохондрий к индукции СМП.

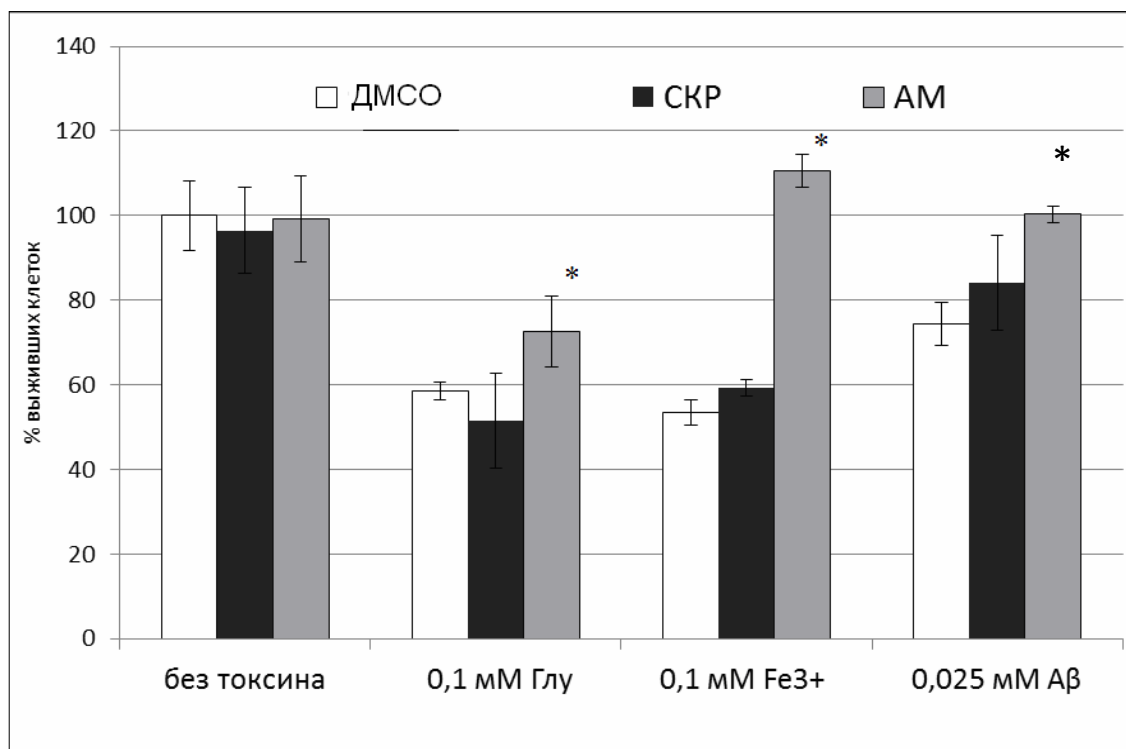


Рисунок 4. Влияние СКР и АМ на выживаемость нейронов при различных моделях нейротоксичности. (* - $p < 0,05$, T-test).

Первичная оценка секуринина и алломаргаритарина в экспериментах *in vivo*. Известно, что СКР является антагонистом ГАМК-А рецептора и применялся, как нейростимулирующий агент при лечении различных заболеваний, в частности, бокового амиотрофического склероза. Но с воздействием на эту же мишень связано и нежелательное побочное действие секуринина – просудорожный эффект, поэтому была поставлена задача проверки возможного просудорожного эффекта триптаминового аддукта секуринина с целью поиска путей дальнейшей оптимизации структуры.

Введение СКР мышам в дозе 20 мг/кг в ДМСО приводит к развитию сильных судорог, в нескольких случаях с летальным исходом. Из усреднённой динамики развития судорожной активности видно, что тяжесть судорог нарастала практически сразу (рис.5). У контрольных мышей,

которым вводили физиологический раствор или ДМСО, отклонений в поведении не было.

При введении АМ в дозе 20 мг/кг в ДМСО судорог не наблюдалось (рис.5). Более того, даже при введении 800 мг/кг АМ ни у одного животного из 10 не наблюдалось развития судорог.

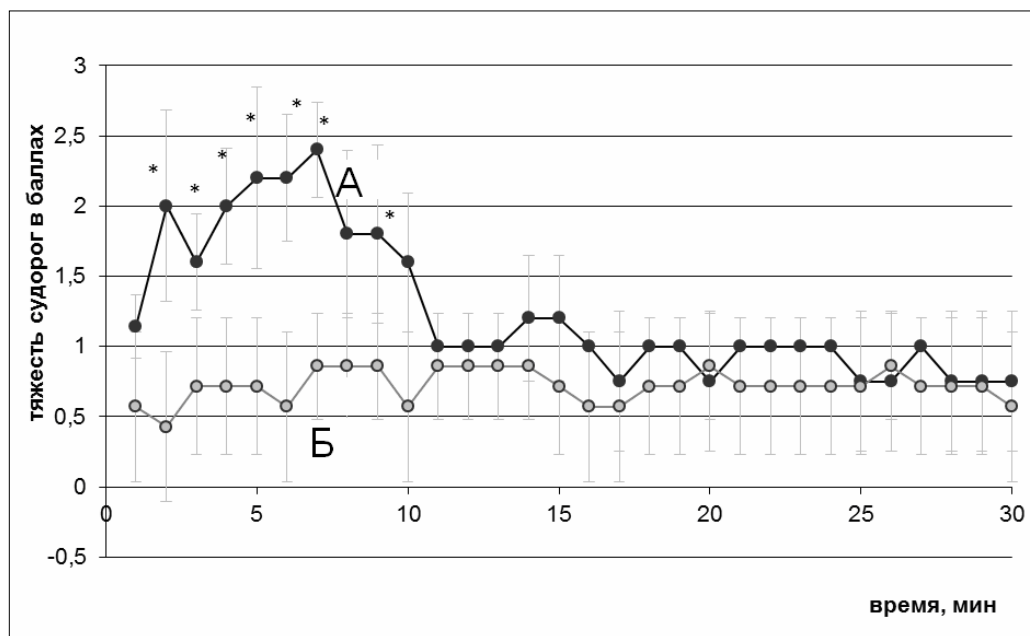


Рисунок 5. Усреднённая динамика развития судорог при введении СКР (n=6) и АМ (n=6) в дозе 20 мг/кг. * - $p < 0,05$ (T-test); ° - $p < 0,05$ (Mann-Whitney U Test). А-СКР 20 мг/кг, Б-АМ 20 мг/кг.

В опытах с моделированием эпилептического статуса также не наблюдалось стимулирования судорожной активности при введении АМ. Более того, АМ увеличивал латентный период возникновения судорог, но не влиял на их длительность в литий-пилокарпиновой модели эпилептического статуса. Внутривенное введение АМ вызывало уменьшение длительности 4 стадии судорог у крыс в литий-пилокарпиновой модели, а также снижало долю высокоамплитудной нерегулярной ЭЭГ-активности во время эпилептического статуса.

При изучении общего токсического действия АМ, вещество (растворенное в ДМСО) вводилось животным (мышам n=10) внутривенно в разных концентрациях (максимально 800 мг/кг) не превышая объем 50 мкл. Патологических изменений в поведении и

физическом состоянии животных не наблюдалось. Введение эквивалентного объёма растворителя также не вело к каким-либо изменениям.

При изучении влияния АМ на некоторые поведенческие характеристики животных (тест «открытое поле», темно-белая камера, подвешивание за хвост) достоверных отличий от поведения контрольных животных не было. Только в тесте «Гексеналовый сон» при введении АМ продолжительность сна достоверно уменьшалась, что может свидетельствовать о связи действия производного с ГАМК-эргической системой или индукции цитохромов печени P450 .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Окислительный стресс и дисфункция митохондрий как патогенетические составляющие ранних стадий нейродегенерации одновременно рассматривались нами в качестве мишеней фармакологического воздействия на нейродегенеративные процессы. В соответствии с этим в основу первичного отбора потенциальных нейропротекторов были положены антиоксидантная и митопротекторная активности. В результате проведенных исследований было выделено соединение, проявляющее одновременно выраженное антиоксидантное и митопротекторное действие — алломаргаритарин. Дальнейшие исследования этого соединения уже непосредственно на моделях клеточной нейротоксичности выявили у него наличие нейропротекторных свойств, что позволило рекомендовать его в качестве основы для создания нейропротекторных препаратов. Результаты данной работы важны не только своей потенциально высокой практической значимостью, но, прежде всего, как подтверждение высокой эффективности впервые реализованного в ее рамках методического подхода к поиску потенциальных нейропротекторов, ориентированного на комплексную фармакологическую коррекцию ранних стадий нейродегенерации.

ВЫВОДЫ

1. Впервые в ряду новых производных алкалоида секуринина и изоалантолактонов были выявлены соединения, обладающие высокой антиоксидантной активностью.
2. Синтезированный новый аддукт секуринина и триптамина - алломаргаритарин - эффективно увеличивает порог чувствительности митохондрий к Ca^{2+} - и $A\beta$ -индуцированному скачку митохондриальной проницаемости, не оказывая влияния на трансмембранный потенциал митохондрий.
3. Алломаргаритарин защищает нейроны коры головного мозга крыс от глутамат-, Fe^{3+} - и $A\beta$ -инициированной токсичности.
4. В отличие от секуринина, АМ не проявляет судорожной активности и общей токсичности *in vivo*.
5. Триптаминовые аддукты секуринина и изоалантолактонов, в частности алломаргаритарин, представляют интерес в качестве основы для разработки новых современных нейропротекторных препаратов с полифункциональным спектром действия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПОЛ – перекисное окисление липидов
 АМ - алломаргаритарин
 ТБК – тиобарбитуровая кислота
 ДФПГ - дифенилпикрилгидразила
 СМП – скачок митохондриальной проницаемости
 А β - бета-амилоид
 МТТ - 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид
 ИАЛ - изоалантолактон
 ЭИАЛ – эпокси-изоалантолактон
 СКР - секуринин
 ГАМК - γ -аминомасляная кислота
 ДМСО – диметилсульфоксид
 ЭЭГ – электроэнцефалограмма

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Klochkov S., Shevtsova E., Afanas'eva S., **Neganova M.**, Serkova T. Stereospecific synthesis and potential neuroprotective activity of alkaloid securinine derivatives//European Neuropsychopharmacology. 2008. 18. p.S514-S515.
2. **Неганова М.Е.**, Блик В.А., Клочков С.Г., Чепурнова Н.Е., Шевцова Е.Ф.. Исследование антиоксидантных свойств нового триптаминового производного секуринина и его влияние на судорожную активность мозга при экспериментальной эпилепсии//Нейрохимия. 2011. 28-3. с.236-243
3. **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 секуринина//Естественные и технические науки. 2011. 5. с.86-90
4. **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 г.Том 152., № 12. с.661-665
5. Клочков С. Г., Афанасьева С. В., Булычев Ю. Н., **Неганова М. Е.**, Шевцова Е. Ф. Синтез и биологическая активность конъюгатов изоалантолактонов с триптамими//Известия академии наук. Серия химическая. 2012. 2.

Тезисы докладов:

1. **Неганова М.Е.**, Шевцова Е.Ф., Клочков С.Г. Поиск эффективных антиоксидантов и митопротекторов в ряду производных природных алкалоидов//Доклады и тезисы к конференции: Окисление, окислительный стресс, антиоксиданты: Всероссийская конференция молодых ученых и III школа им. Академика Н.М. Эммануэля. Москва, 1-3 октября 2008г. – М.: РУДН. 2008. 260с.
2. **Неганова М. Е.**, Шевцова Е.Ф. Нейропротекторная активность производного секуринина L-12-5272//Тезисы к конференции : Фестиваль молодых ученых , аспирантов и студентов «Молодая наука в классическом университете». Иваново. Изд. Ивановский Государственный Университет. 2008. 26с.
3. **Neganova M.E.**, Serkova T.P., Shevtsova E.F., Klochkov S.G., Afanas'eva S.V. Securinine as potential scaffold for effective neuroprotectors//Journal of Neurochemistry Volume 110 Issue s1. Pages 1 - 116 (July 2009). Special Issue: Abstracts of the 4th European Society for Neurochemistry Conference on Advances in Molecular Mechanisms of Neurological Disorders, 11-14 July 2009, Leipzig, Germany
4. Klochkov S.G., Bachurin S.O, Shevtsova E.F., Bravova I.M., Novikova O.V., **Neganova M.E.** Flavonoid contents, antioxidant and neuroprotective activity in extracts of plants of Russian flora//African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines (AJTCAM). 2009. 6. p.374
5. Klochkov S.G., Afanaseva S.V., **Neganova M.E.**, Shevtsova E.F. New tryptamine derivatives of natural alkaloid securinine: synthesis and biological properties//Abstract of International Conference on Medicinal Chemistry - 45e Rencontres Internationales de Chimie Therapeutique "Interfacing Chemical Biology, Drug Discovery and Selection", Orleans, France. July 1-3, 2009. p.83

6. **Неганова М.Е.**, Шевцова Е.Ф., Клочков С.Г. Свойства триптаминовых производных природного алкалоида секуринина//Сборник тезисов пятого международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии». Судак, Крым, Украина., 3-13 июня 2009г. 97с.
7. Клочков С.Г., Шевцова Е.Ф., Афанасьева С.В., **Неганова М.Е.** Митопротекторная активность новых аминопроизводных алкалоида секуринина//Труды Международной конференции «Актуальные проблемы химии природных соединений», Ташкент, 18–19 марта 2009 г. стр. 37
8. Клочков С.Г., Шевцова Е.Ф., **Неганова М.Е.**, Афанасьева С.В.. «Поиск эффективных нейропротекторов в ряду производных природных алкалоидов». В кн. «Фундаментальные науки – медицине» (тезисы докладов. Конференции и семинары по научным направлениям Программы в 2009 году). Фирма «Слово». Москва. 2009. Стр. 118.
9. Афанасьева С.В., **Неганова М.Е.**, Шевцова Е.Ф., Клочков С.Г.. «Триптаминовые производные природных сесквитерпеновых лактонов как потенциальные антиоксиданты и митопротекторы» //В кн. «Тезисы докладов «Химия и полная переработка биомассы леса. Сателлитные конференции: VI Всероссийская конференция «Химия и технология растительных веществ». Симпозиум некоммерческого партнерства институтов РАН «ОрХиМед» «Разработка лекарственных и физиологически активных соединений на основе природных веществ». Молодежная конференция-школа «Физико-химические методы изучения состава отходов химической переработки древесины и растительного сырья». Санкт Петербург (пос. Репино)., 14-18 июня 2010 г. С. 308.
10. Klochkov S.G., Shevtsova E.F., Afanasyeva S., **Neganova M.** Antioxidant Activity and Influence of Derivatives of Natural Alkaloids and Lactones on Mitochondrial Function// In “International Symposium on the Pathophysiology of Reactive Oxygen and Nitrogen Species (book of abstracts)”. Salamanca (Spain), 19-21 May 2010. P. 230.
11. Блик В.А, **Неганова М. Е.**, Клочков С.Г., Шевцова Е. Ф., Чепурнова Н. Е. Сравнительные эффекты секуринина и его производного на судорожную активность у мышей. XXI Съезд физиологического общества имени И.П.Павлова. Тезисы докладов. Москва - Калуга 19-25 сентября 2010г. стр.-16
12. **Неганова М.Е.**, Болкунов А.В., Кохан В.С., Ванькин Г.И., Виноградова Д.Е., Шевцова Е.Ф. Психотропное действие нового триптаминового производного природного алкалоида секуринина. Шестой международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии». Тезисы докладов. Судак, Крым, Украина, 3-13 июня 2010 г., стр. 64
13. **Неганова М. Е.**, Блик В.А , Клочков С.Г. , Афанасьева С.В, Чепурнова Н. Е. , Шевцова Е.Ф. Влияние нового производного природного алкалоида секуринина на развитие судорог в разных моделях эпилепсии. III Всероссийский, с международным участием, конгресс студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия 2010». Тезисы докладов. Нижний Новгород 24 - 28 мая 2010 года. стр. 25
14. **Неганова М.Е.**, Шевцова Е.Ф., Клочков С.Г., Афанасьева С.В., Серкова Т.П. Нейропротекторные свойства производных природного алкалоида секуринина. Шестой международный междисциплинарный конгресс нейронаука для медицины и психологии. Тезисы докладов. Судак, Крым, Украина, 3-13 июня 2010 г., стр. 87
15. Klochkov S., Shevtsova E., Ermatova A., Novikova O., Bravova I., **Neganova M.** LC-ESI-MS/MS analysis and screening of Russian plant extracts as a tool for discovery of new potential neuroprotectors. European Neuropsychopharmacology. 24 ESNP Congress, Paris, France, p-289