

# НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-4-3-10

## МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ЭТАНОЛАМИНА – БИС{2-[(2E)-4-ГИДРОКСИ-4-ОКСОБУТ-2-ЕНОИЛОКСИ]-N,N-ДИЭТИЛЭТАНАМИНИЯ} БУТАНДИОНАТА

Ю. И. Сысоев<sup>1, 2</sup>, Е. А. Попугаева<sup>3</sup>, Д. П. Чернюк<sup>3</sup>, И. А. Титович<sup>1</sup>,  
Е. В. Загладкина<sup>1</sup>, В. Ц. Болотова<sup>1</sup>, И. Б. Безпрозванный<sup>3, 4</sup>, С. В. Оковитый<sup>1</sup>

Изучен механизм нейропротекторного действия нового производного этаноламина – бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандионата (ФДЭС) с помощью визуализации дендритных шипиков на конфокальном микроскопе, оценки кальциевого ответа в постсинаптических дендритных шипиках, в условиях устранения экспрессии белка в клетках первичной культуры гиппокампа мыши методом РНК интерференции. Установлено, что возможным механизмом действия ФДЭС является активация нейронального депо-управляемого входа кальция (нДУВК) в постсинаптические дендритные шипики. При дефиците каналов TRPC6 (основных регуляторов нДУВК в нейронах гиппокампа) исследуемое вещество не влияло на вход кальция в нейронах гиппокампа, что свидетельствует о специфичности его действия именно на нДУВК. На модели ишемии головного мозга крыс ФДЭС в сравнении с цитиколином и цитофлавином улучшал показатели краткосрочной памяти (уменьшалось количество ошибок) в тесте “лабиринт Барнс” (Barnes maze) на 71 % ( $p = 0,0023$ ), способствуя воспроизведению информации, полученной за 1 сут до тестирования. Установлено, что в наномолярном диапазоне концентраций ФДЭС обладал нейропротекторными свойствами в первичной культуре клеток гиппокампа, проявляющиеся способностью защищать грибовидные шипики от амилоидной синаптотоксичности на 15 % ( $p < 0,0001$ ), тем самым стабилизируя и усиливая синаптическую передачу. Полученные данные свидетельствуют о том, что ФДЭС представляет интерес для дальнейших исследований в качестве нейропротекторного средства.

**Ключевые слова:** этаноламина производное; цитофлавин; цитиколин; нейропротекция; память; дендритные шипики; культура клеток; крысы.

## ВВЕДЕНИЕ

Дендритные шипики нейронов — ключевые структуры в процессах обучения и памяти. Существует несколько видов шипиков, среди которых так называемые грибовидные отвечают за процессы формирования и хранения памяти. Кроме грибовидных шипиков, выделяют тонкие и пеньковые, отличающиеся от грибовидных размерами и выполняемыми функциями в мозге — так, например, считают, что тонкие шипики принимают участие в процессах обучения. Функции пеньковых шипиков пока остаются неизвестными [5].

Количество грибовидных шипиков снижается, а их морфология значительно изменяется в сторону тонких и пеньковых шипиков при неврологических и психических заболеваниях [12].

Одним из нейродегенеративных заболеваний, сопровождающихся поражением участков мозга, ответственных за формирование мышления, планирования и памяти, является болезнь Альцгеймера (БА). Воздействию при БА подвергается гиппокамп, отвечающий за запоминание и усвоение новой информации. На данный момент БА является наиболее распространенной формой деменции в мире и с каждым годом число больных продолжает расти [4].

Одной из гипотез возникновения БА является “амилоидная гипотеза”, согласно которой базовой причиной заболевания являются отложения бета-амилоида (A $\beta$ ) в головном мозге пациентов, фибриллы которого составляют основу сенильных бляшек. Он имеет различную длину от 39 до 43 аминокислот, что обусловлено тем, что  $\beta$ -секретаза работает “неточно”, разрезая трансмембранный домен APP (amyloid precursor

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО “Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет Минздрава России”, Россия, 197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 14А

<sup>2</sup> Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет, Россия, Санкт-Петербург

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Россия, 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29

<sup>4</sup> Юго-западный медицинский центр университета Техаса, Даллас, Техас, США

protein, белок предшественник амилоида). Установлено, что наиболее токсичным и склонным к агрегации является бета-амилоид длиной 42 аминокислоты. Бета-амилоид способен самопроизвольно агрегировать и существовать в ткани мозга больного не только в форме мономеров и фибрилл, но и в виде олигомеров, которые в свою очередь являются наиболее патогенными образованиями, вызывающими разрушение синаптических контактов [16]. На модели амилоидной синаптотоксичности *in vitro* при обработке первичной культуры клеток гиппокампа синтетическими олигомерными пептидами A $\beta$ 42 была обнаружена селективная элиминация грибовидных шипиков [14].

Еще одной гипотезой, объясняющей развитие БА, является кальциевая гипотеза развития нейродегенеративных заболеваний. При БА наблюдается перенасыщение кальцием внутриклеточных депо, в частности, эндоплазматического ретикулаума (ЭПР) нервных клеток головного мозга. Избыток кальция является токсичным для клеток и, чтобы защитить себя, нейроны запускают протекторные механизмы, направленные на восстановление содержания внутриклеточного кальция, которые со временем становятся патологическими для нейронов. В частности, в ответ на избыток кальция в ЭПР-нейронах при БА, наблюдается снижение сигнального пути депо-управляемого входа кальция (ДУВК), направленного на “закачку” кальция из внеклеточного пространства внутрь клетки —  $I_{CRAC}$ . Это приводит к дестабилизации и уменьшению числа синаптических контактов и значительной потере грибовидных и увеличению числа тонких и пеньковых шипиков [23]. Определение молекулярной идентичности каналов, осуществляющих нейрональный ДУВК (нДУВК), продемонстрировало, что в нейронах гиппокампа мыши тройной комплекс STIM2-ORAI2-TRPC6 выполняет роль нДУВК. Согласно полученным на мышинных моделях данным, вещества, активирующие путь нДУВК-TRPC6, могут быть потенциальными терапевтическими агентами при БА [18].

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

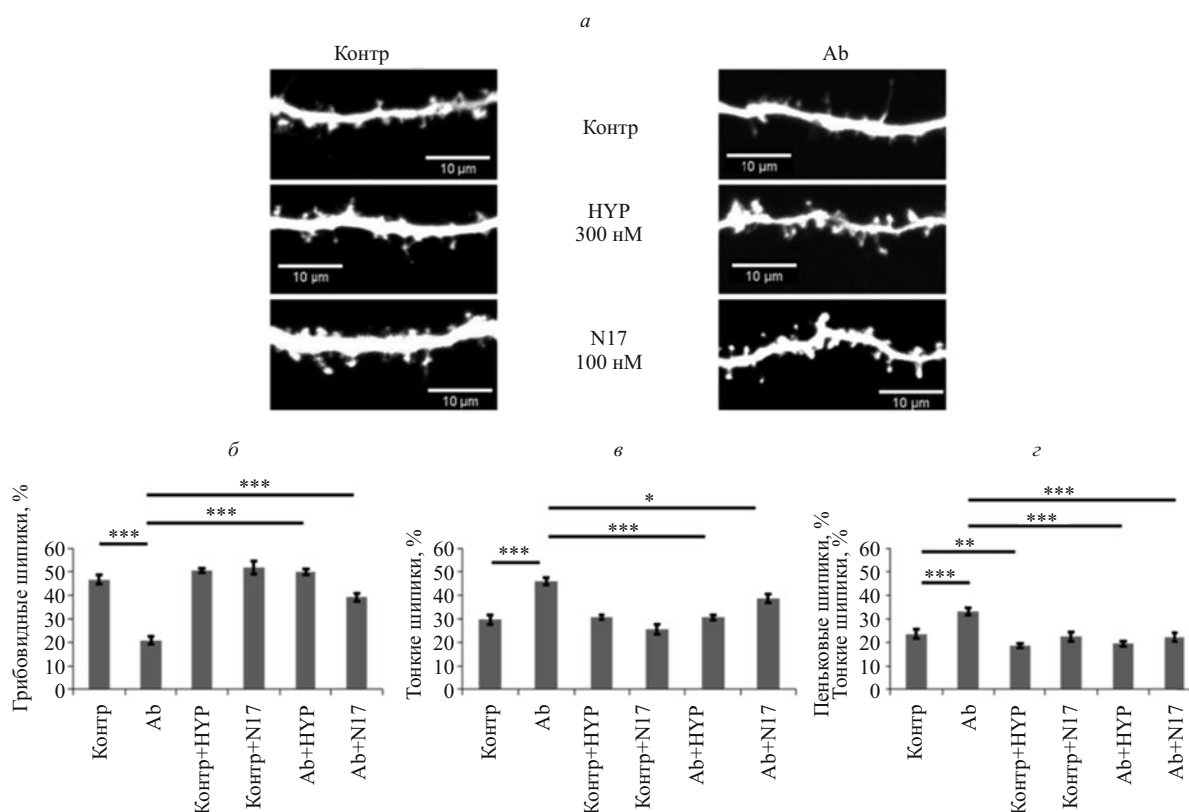
Анализ морфологии дендритных шипиков в первичной культуре гиппокампа в присутствии/отсутствии бета-амилоида (Ab) в программном обеспечении NeuronStudio (CNIC) [15], позволяет оценить нейротекторные свойства исследуемого вещества, а именно — способность препарата защищать постсинаптические дендритные грибовидные шипики от амилоидной токсичности. В настоящем эксперименте первичная культура гиппокампа мыши на 7 день культивирования в условиях *in vitro* (day of *in vitro* cultivation, DIV) трансфецировали плазмидой, экспрессирующей флуоресцентный белок TD-Tomato, для визуализации морфологии шипиков. На DIV12-13 клетки обрабатывали синтетическими Ab42 в концентрации 100 нМ (#20276, AnaSpec, Fremont, USA) или оставляли необработанными (контроль, рис. 1). На

4 сут влияние бета-амилоида на формирование грибовидных шипиков анализировали на конфокальном микроскопе (Thorlabs, США) (DIV15-16). Положительным контролем служил гиперфорин (HYP) — специфичный активатор каналов TRPC6, способный защищать грибовидные шипики от амилоидной токсичности активацией нДУВК [18]. Гиперфорин в концентрации 30 нМ и ФДЭС в концентрации 100 нМ добавляли в культуру клеток за 16 ч до фиксации.

Исследовали влияние ФДЭС на нДУВК, поддерживающий стабильность грибовидных шипиков и снижающий проводимость  $I_{CRAC}$  в присутствии Ab. Первичную культуру гиппокампа мыши на 7 день культивирования (DIV7) трансфецировали плазмидой, экспрессирующей генетически-кодированный кальциевый индикатор (GEC1) GCamp5.3 (Addgeneplasmid # 31788, США). На DIV12-13 клетки обрабатывали синтетическими Ab42 или оставляли необработанными (контроль, рис. 2). Способность исследуемых соединений активировать постсинаптический нДУВК анализировали на DIV15-16. Влияние Ab на нДУВК оценивали по амплитуде пика кальциевого ответа в условных единицах (у.е.). Время инкубации нейронов составляло 30 мин при комнатной температуре в бескальциевой среде, концентрация соединений (гиперфорин и ФДЭС) — 300 нМ. Концентрации блокаторов кальциевых каналов D-AP5, нифедипина, CNQX составляли 10, 50, 10 мкМ, соответственно, концентрация ТТХ и тапсигаргина составляла 1 мкМ. По истечении времени инкубации в бескальциевую среду добавляли 10 мМ  $Ca^{2+}$ .

Для изучения специфичности механизма действия ФДЭС в активации TRPC6-нДУВК был использован метод выключения гена TRPC6 с помощью РНК-интерференции. Для этого в культуру клеток гиппокампа мыши на DIV7 ко-трансфецировали 2 плазмидами. Первая кодировала генетически кодированный кальциевый индикатор GCamp5.3. Вторая несла ген, кодирующий интерферирующую РНК (shРНК), выключающую экспрессию гена TRPC6, входящего в состав нДУВК нейронов гиппокампа мыши. Визуализацию кальциевых ответов проводили на DIV15-16 с помощью конфокального микроскопа. Положительным контролем в эксперименте был гиперфорин.

Для оценки влияния изучаемого соединения на функции пространственного обучения и памяти животных с повреждением мозга после односторонней окклюзии среднемозговой артерии проводили их тестирование в тесте “лабиринт Барнес” (Barnes maze). Исследования выполнены на 67 белых беспородных крысах-самцах массой 250 – 300 г, полученных из ФГУП ПЛЖ “Рапполово” (Ленинградская область). Во всех экспериментальных группах было по 10 – 18 животных. Эксперименты проводили в соответствии с Приказом Минздрава РФ от 01.04.2016 г. № 199н “Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики” после одобрения биоэтической комиссии СПХФУ.



**Рис. 1.** ФДЭС обладает нейропротекторными свойствами, защищая грибовидные шипики от амилоидной токсичности, в концентрации 100 нМ: *а* — репрезентативные микрофотографии каждой исследованной группы гиппокампальных нейронов трансфицированных плазмидой TD-Tomato; *б* — содержание грибовидных шипиков в экспериментальных группах; *в* — содержание тонких шипиков в экспериментальных группах; *з* — содержание пеньковых шипиков в экспериментальных группах, количественный анализ морфологии дендритных шипиков в программном обеспечении NeuronStudio.

Представлены результаты 1 эксперимента. Всего было выполнено 3 повтора эксперимента. В каждой экспериментальной группе было исследовано  $30 \pm 2$  нейрона. Результаты представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Результат считался статистически значимым при  $p < 0,05$ . Сокращения: Контр — контрольная группа; Ab — бета-амилоид; НУР — гиперфорин; N17 — ФДЭС;

\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$  по сравнению с контролем и по сравнению с группой в присутствии Абета 42 (Ab). 100 % соответствует сумме грибовидных, тонких и пеньковых шипиков на 1 дендрите.

Крыс содержали в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе со свободным доступом к воде. Все опытные и контрольные животные были взяты из одной партии и прошли карантин в течение 14 сут.

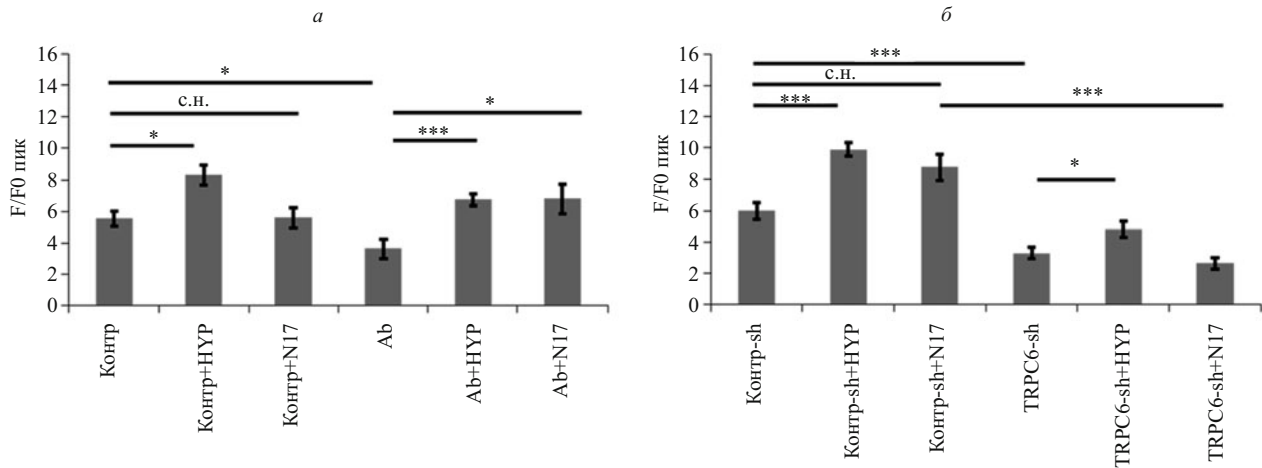
Тест “лабиринт Барнс” чувствителен к нарушениям у грызунов с гиппокампальными повреждениями. В основе теста лежит физиологически обусловленное стремление лабораторных грызунов (в данном случае крыс) избегать ярко-освещенного открытого пространства при поиске “норки” (targetbox). Эксперимент проводили на установке “Лабиринт Барнс для крыс” (ООО “НПК Открытая наука”, Россия).

В течение 4 дней перед моделированием ишемии головного мозга проводили обучение животных. Перед началом обучения каждую крысу помещали в targetbox и оставляли там на 2 мин. Затем животных по очереди помещали в центр лабиринта, накрывая темной коробкой. По истечении 10 с коробку поднимали и записывали поведение крысы в течение 3 мин. За

отведенное время животное должно было найти targetbox, при этом подсчитывали время нахождения норки и количество ошибок. В случае, если крыса не справлялась с заданием, по прошествии 3 мин запись выключали, а испытуемое животное “мягко” подталкивали к targetbox и оставляли там также на 2 мин. Данную процедуру повторяли ежедневно 4 раза в течение 4 дней, интервал между попытками составлял 15 – 20 мин [13].

На 4-й день после обучения у животных под наркозом (внутрибрюшинно хлоралгидрат в дозе 400 мг/кг) моделировали ишемию головного мозга методом односторонней окклюзии среднемозговой артерии по методу J. Koizumi [10].

На 5 и 12 дни животных тестировали в лабиринте Барнс, аналогично тому, как и в предыдущие дни обучения, за тем исключением, что каждой крысе давали только 1 попытку и длительность тестирования составляла 90 с.



**Рис. 2.** Влияние ФДЭС на постсинаптический нейрональный депо-управляемый вход кальция в условиях амилоидной синаптотоксичности и в условиях нокадауна гена TRPC6.

*а* — сравнительный анализ изменения амплитуды нДУВК (F/F0 пик) в исследуемых группах в условиях амилоидной синаптотоксичности. Представлены результаты 1 эксперимента. Всего было выполнено 3 повтора эксперимента. В каждой экспериментальной группе исследовано  $(30 \pm 5)$  дендритных шипиков. Результаты представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Результат считался статистически значимым при  $p < 0,05$ . Сокращения: Контр — контрольная группа; Ab — бета-амилоид; N17 — ФДЭС; \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ , с.н. — статистически незначимый результат при  $p > 0,05$ .

*б* — сравнительный анализ изменения амплитуды нДУВК (F/F0 пик) в исследуемых группах в условиях нокадауна гена TRPC6. Представлены результаты 1 эксперимента. Всего было выполнено 2 повтора эксперимента. В каждой экспериментальной группе было исследовано  $(30 \pm 5)$  дендритных шипика. Результаты представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Результат считался статистически значимым при  $p < 0,05$ . Сокращения: Контр-sh — контрольная группа нейронов, которая была трансфицирована малыми РНК, образующими шпильки (shРНК), некомплементарной ни к одной клеточной РНК; TRPC6-sh — группа нейронов, трансфицированная shРНК, комплементарной к РНК, кодирующей белок TRPC6; N17 — ФДЭС; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ , с.н. — статистически незначимый результат при  $p > 0,05$ .

Исзуемое соединение вводили в дозе 10 мг/кг в физиологическом растворе внутривенно. На основании данных предыдущих экспериментов эта доза была наиболее эффективной при ишемии головного мозга [3]. В качестве препаратов сравнения (ПС) использовали цитофлавин (ООО НТФФ “ПОЛИСАН”, Санкт-Петербург) в дозе 170 мг/кг (по янтарной кислоте), цитиколин (“Ferrer Internacional, S.a.”, Испания) в дозе 500 мг/кг. ФДЭС и ПС вводили внутривенно через 1 ч после реперфузии и далее в одно и то же время в течение 7 дней. Данный режим введения был выбран с целью оценки острых и подострых эффектов изучаемого соединения и ПС. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор в эквивалентных количествах (1 мл/200 г массы тела).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программы GraphPadPrism 7.00. Осуществляли проверку нормальности распределения количественных признаков при малом числе наблюдений с использованием *W*-критерия Шапиро — Уилка, оценивали значимость различий при нормальном распределении количественных признаков с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с пост-хок тестом по Тьюки, а при ненормальном распределении — с помощью непараметрического критерия Краскела — Уоллиса с пост-хок тестом по Данну. При анализе выживаемости и доли животных, нашедших targetbox, достоверность различий между группами оценивали с помощью анализа таблиц сопряженности с использованием критерия

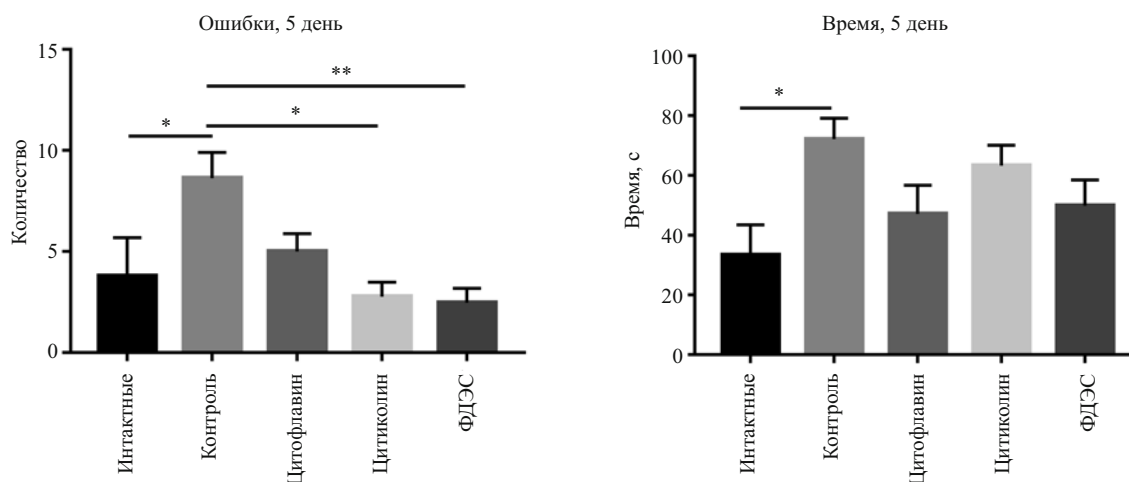
хи-квадрат. Числовые данные, приводимые в таблицах, представлены в виде среднего арифметического ( $M$ )  $\pm$  ошибка среднего ( $m$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### ФДЭС защищает грибовидные шипики от амилоидной токсичности *in vitro*

В результате проведенных экспериментов было установлено, что синтетические Ab42 снижают процент грибовидных шипиков с  $(46,7 \pm 2)$  % (контроль) до  $(20,9 \pm 1,6)$  % (рис. 1). Также было отмечено, что Ab42 статистически значимо сдвигает баланс от грибовидных шипиков в сторону тонких шипиков (рис. 1, *в*). Была также замечена статистически значимая тенденция Ab увеличивать процент пеньковых шипиков по сравнению с контрольной группой (рис. 1, *з*). Было обнаружено, что ФДЭС обладает нейропротекторными свойствами, защищая грибовидные шипики от амилоидной токсичности. ФДЭС восстанавливал процент грибовидных шипиков в группе с Ab с  $(20,9 \pm 1,6)$  % до  $(39 \pm 1,6)$  % ( $p = 4,67074 \cdot 10^{-10}$ ) (рис. 1, *б*). Аналогично гиперфорину он снижал процент тонких и пеньковых шипиков в группе с Ab до контрольного уровня (рис. 1, *в, з*). Также было обнаружено, что ФДЭС уменьшает количество пеньковых шипиков с  $(33,2 \pm 1,8)$  % до  $(22,3 \pm 1,3)$  % ( $p = 4,01445 \cdot 10^{-5}$ ) в группе с Ab (рис. 1, *з*). Полученные данные свидетельствуют о том, что ФДЭС способен защитить грибовидные шипики от амилоидной





**Рис. 4.** Количество ошибок и время нахождения в targetbox животных на 5 сут эксперимента (1 день после ишемии), характеризующие кратковременную память.

\* Достоверное отличие ( $p < 0,05$ ); \*\* достоверное отличие ( $p < 0,01$ ).

токсичности и его рабочая концентрация лежит в номолярном диапазоне.

#### **ФДЭС активирует нейрональный депоуправляемый вход кальция в нейронах гиппокампа *in vitro***

Ab снижал амплитуду нДУВК с ( $5,6 \pm 0,5$ ) у.е. до ( $3,6 \pm 0,6$ ) у.е. ( $p = 0,02$ ) (рис. 2, а). Активатор нДУВК, гиперфорин (НУР), восстанавливал амплитуду нДУВК в группе нейронов с Ab с ( $3,6 \pm 0,6$ ) у.е. до ( $6,8 \pm 0,3$ ) у.е. ( $p = 0,0001$ ) (рис. 2, а). ФДЭС восстанавливал амплитуду нДУВК в группе нейронов с Ab с ( $3,6 \pm 0,6$ ) у.е. до уровня контроля в ( $6,8 \pm 0,9$ ) у.е. ( $p = 0,01$ ) (рис. 2, а).

#### **ФДЭС в отсутствие каналов TRPC6 не активирует нейрональный депо-управляемый вход кальция в нейронах гиппокампа**

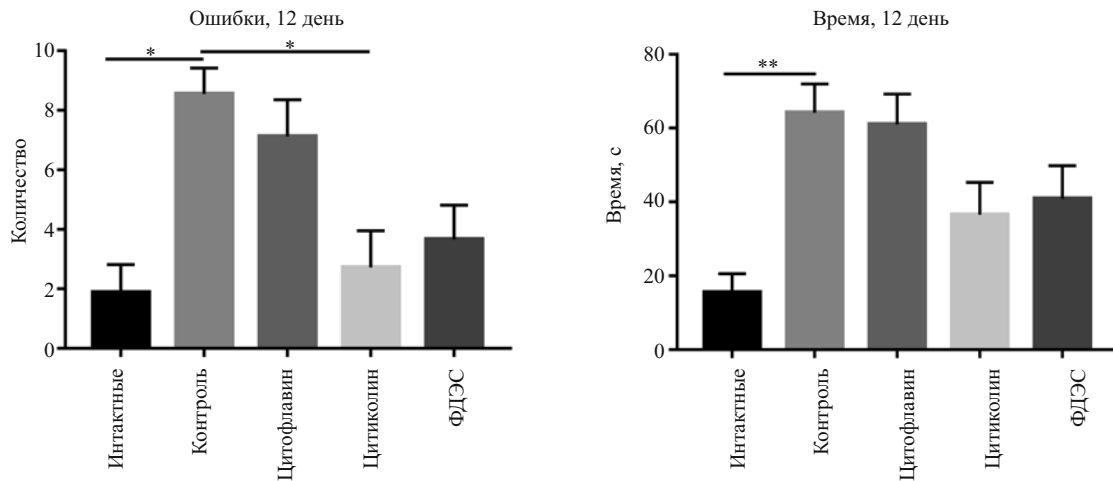
Выключение экспрессии гена TRPC6 в культуре гиппокампа мыши приводило к значительному снижению амплитуды нДУВК с ( $5,98 \pm 0,6$ ) у.е. для контрольной группы (рис. 2, б) до ( $3,3 \pm 0,4$ ) у.е. для группы нейронов с устранившимся геном TRPC6 (рис. 2, б) в среднем в 2 раза ( $p = 0,0002$ ). НУР не способен был восстановить амплитуду нДУВК в условиях подавления TRPC6 до уровня контроля, хотя вызывал статистически значимое повышение амплитуды нДУВК с ( $3,3 \pm 0,4$ ) у.е. до ( $4,8 \pm 0,5$ ) у.е. (рис. 2, б) ( $p = 0,025$ ). Последнее наблюдение объясняется тем, что РНК интерференция не выключает ген полностью, всегда остаются следовые количества белка, которых, вероятно, достаточно для того, чтобы НУР мог активировать нДУВК. ФДЭС также не способен активировать нДУВК в отсутствие TRPC6 (рис. 2, б). Таким образом, в настоящей работе получено экспериментальное подтверждение того, что ФДЭС является активатором TRPC6-зависимого нДУВК.

#### **ФДЭС улучшает показатели краткосрочной памяти у крыс в тесте “лабиринт Барнс” в 1-е сут после экспериментальной ишемии**

В ходе исследования установлено, что перекрытие кровотока в течение 1 ч по бассейну среднемозговой артерии приводит к ухудшению показателей краткосрочной и долгосрочной памяти у крыс, фиксируемых в тесте “лабиринт Барнс”. У таких животных на следующий день после ишемии наблюдалось достоверное увеличение времени нахождения в targetbox, а также повышение количества ошибок, по сравнению с интактными животными, на 5 и 7 день соответственно (рис. 4, 5). Статистически значимых различий в проценте животных, нашедших targetbox, в дни тестирования между группами интактных и контрольных животных выявить не удалось (табл. 1).

У животных, которым вводили изучаемое соединение, на следующий день после ишемии наблюдали достоверное уменьшение количества ошибок по сравнению с контролем ( $p = 0,0023$ ). Аналогичные результаты наблюдали у группы животных, получивших цитиколин и цитофлавин ( $p = 0,0183$ ). Результаты животных, получивших цитофлавин, по показателю “количество ошибок” достоверно не отличались от таковых цитиколина и ФДЭС, а по показателю “время нахождения в targetbox” были лучше, чем у группы животных, получивших цитиколин (рис. 4).

На 7 сут после окклюзии у крыс, которым вводили изучаемое соединение, не наблюдали достоверного уменьшения количества ошибок и времени нахождения в targetbox, при этом цитиколин достоверно уменьшал количество ошибок у животных с ишемией по сравнению с контролем ( $p = 0,0176$ ). Статистически значимых различий между группами животных, получивших изучаемые вещества, получено не было (рис. 5).



**Рис. 5.** Количество ошибок и время нахождения в *targetbox* на 12 сут эксперимента (7 день после ишемии), характеризующие долговременную память.

\* Достоверное отличие ( $p < 0,05$ ); \*\* достоверное отличие ( $p < 0,01$ ).

Ни ФДЭС, ни ПС не увеличивали процент выживших животных. При этом по показателю нахождения в *targetbox* на 1 сут после ишемии наилучший эффект отмечен у цитофлавина (таблица).

Изучаемое соединение ФДЭС сочетает этаноламинную структуру с бутандиовой и *транс*-этилен-1,2-дикарбоновой кислотами. Принято считать, что производные этаноламина являются субстратами синтеза ацетилхолина — одного из ключевых медиаторов ЦНС [9]. Дикарбоновые кислоты, являясь интермедиами цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), могут оказывать антигипоксическое действие в условиях гипоксии и ишемии головного мозга. Однако для реализации указанных выше механизмов производные этаноламина или же соли ЦТК необходимо вводить в достаточно высоких дозах.

Известно, что на ранних стадиях БА, еще до появления токсичных амилоидных бляшек, происходит потеря синапсов в нейронах при БА. Синапс является ключевым звеном для осуществления нейротрансмиссии или передачи электрохимических сигналов от пресинаптического фрагмента (аксона) к постсинаптическому элементу (дендритный шипик). Основными задачами нейрона является передача, обработка, анализ

и хранение информации. Для осуществления данных задач нейрону нужно “общаться” с окружающими его другими нервными клетками, таким образом, нейрон с нарушенной системой контактов не способен выполнять предназначенные ему функции и, в конечном итоге, погибает.

В данной работе впервые показано, что ФДЭС способен защищать нейроны гиппокампа в условиях амилоидной синаптотоксичности. Он предотвращает потерю грибовидных шипиков на клеточной модели БА, стабилизируя синаптические контакты и предотвращая их потерю в присутствии токсичных форм амилоида. Механизм нейропротекторного действия изучаемого соединения связан с активацией TRPC6-зависимого нейронального депо-управляемый входа кальция. Нарушение этого внутриклеточного сигнального пути было недавно описано в литературе [18]. Снижение активности нДУВК может приводить к нарушению синаптической пластичности, тем самым разрушая связь между нейронами. Вещества, способные восстановить активность нДУВК в нейронах гиппокампа, являются перспективными лекарственными средствами для лечения БА и ассоциированной с БА деменции [18].

На модели лабиринта Барнс изучаемое соединение улучшало показатели краткосрочной памяти у крыс, способствуя воспроизведению информации, полученной за 1 сут до тестирования. У животных уменьшалось количество ошибок, совершаемых во время поиска *targetbox*. Несомненный интерес представляет тот факт, что ни у одной из групп животных, получавших фармакологические вещества, не наблюдалось уменьшения времени поиска *targetbox*. Это может быть связано с тем, что при перекрытии бассейна среднемозговой артерии ишемизируются не только различные области гиппокампа, но и ряд других структур, среди которых моторная кора и полосатое тело [8]. Следова-

**Количество выживших животных от общего числа, а также количество нашедших *targetbox* от числа выживших на 1 и 7 день после ишемии**

Группа	5-й день (1-й после ишемии)		12-й день (7-й после ишемии)	
	выжившие	нашедшие <i>targetbox</i>	выжившие	нашедшие <i>targetbox</i>
Интактные	10/10	8/10	10/10	9/10
Контроль	11/13	6/11	9/13	7/9
Цитофлавин	8/10	7/8	8/10	6/8
Цитиколин	13/16	8/13	11/16	9/11
ФДЭС	15/18	10/15	12/18	10/12

тельно, у крыс с ишемией были не только когнитивные нарушения, но и сенсомоторные, что затрудняло их передвижение к *targetbox*.

В исследованиях долговременной памяти у грызунов с гиппокампальными повреждениями не наблюдали ошибок в тестах, где необходимо было выбрать 1 из 2 или 3 рукавов (коридоров), в то время как более сложные поисково-ориентировочные задачи для них были невыполнимы [11]. Высказано предположение о том, что у грызунов с повреждением гиппокампа пространственная память, в принципе, остается нетронутой, однако заметно нарушается навигационная функция [6]. Другими словами, животные помнят, “где” находится *targetbox*, но не могут вычислить и построить правильный маршрут (“как туда добраться”). Стоит заметить, что аналогичные когнитивные нарушения наблюдаются у крыс не только с повреждением гиппокампа, но и свода (*fornix*) [17]. На основании этих данных можно предположить, что навигационная функция гиппокампа более чувствительна к повреждениям, чем функция памяти, и именно поэтому ФДЭС мог снижать количество ошибок, но не уменьшал время поиска *targetbox*. Кроме того, перекрытие бассейна среднемозговой артерии могло повреждать и свод мозга, в то время как изучаемое соединение оказывало протекторное действие по отношению к гиппокампальным нейронам, что также может объяснить полученные результаты, однако для подтверждения или опровержения данного предположения необходимы дальнейшие морфологические исследования.

Аналогичные результаты получены с цитиколином, вводимым в субстратных дозах, однако, в отличие от ФДЭС, он достоверно уменьшал количество ошибок, совершаемых животными не только на 1 сут после ишемии, но и на 7. На сегодняшний день не проводилось исследований, в которых изучалось бы влияние цитиколина на выживаемость грибовидных шипиков, поэтому рассматривать его механизм действия как принципиально отличный от такового ФДЭС не представляется корректным. Однако, несмотря на разницу в дозе (в 50 раз) между 2 соединениями, функционально они продемонстрировали практически одинаковый эффект. Представляется вероятным, что малая часть вводимого цитиколина может расходоваться на реализацию эффекта, показанного для ФДЭС, остальная — на рассмотренные ранее субстратные механизмы. Имеются отдельные исследования, в которых оценивали эффекты цитиколина в малых дозах. Например, на модели криогенного церебрального отека у кроликов введение цитиколина в дозе 20 мг/кг приводило к снижению ферментативной активности митохондриальной АТФ-азы, восстановлению активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы и ускорению разрешения церебрального отека [7]. Исходя из этого, утверждение о том, что данное лекарственное средство оказывает положительный эффект только в субстратных дозах, не является полностью справедливым.

Эффективность использования цитофлавина при ишемическом инсульте неоднократно показана в условиях эксперимента, однако в данном исследовании впервые показана его эффективность в качестве корректора нарушений краткосрочной пространственной памяти у крыс после перенесенной ишемии.

Ранее было показано, что профилактическая терапия цитофлавином является эффективной для коррекции когнитивных нарушений после применения анестезии. У пациентов, перенесших операцию под общей ингаляционной анестезией десфлураном, применение цитофлавина способствовало более ранней постнаркозной активации и быстрому восстановлению исходного когнитивного статуса [2]. Включение в схему комплексной терапии больных с сахарным диабетом 2 типа цитофлавина обеспечивало более эффективную коррекцию когнитивных нарушений, по сравнению с базисной терапией: наблюдалось улучшение оптико-пространственной деятельности, внимания, абстрактного мышления и памяти. У пациентов, получавших цитофлавин, исследование уровня мозгового трофического фактора (BDNF) в сыворотке крови выявило достоверное его повышение по сравнению с группой базисного лечения [1]. Таким образом, наблюдаемая в настоящем эксперименте положительная динамика при введении цитофлавина крысам, перенесшим ишемический инсульт, совпадает с опубликованными ранее данными о клинической эффективности этого лекарственного средства в качестве корректора когнитивных нарушений различной этиологии.

Таким образом, ФДЭС является активатором нейронального депо-управляемого входа кальция в постсинаптические дендритные шипики нейронов гиппокампа, что позволяет рассматривать его в качестве перспективного соединения для изучения в качестве нейропротекторного средства.

## ВЫВОДЫ

1. ФДЭС обладает нейропротекторными свойствами в первичной культуре клеток гиппокампа мышей. В концентрации 100 нМ ФДЭС вызывает увеличение процента грибовидных шипиков в культуре клеток гиппокампа в условиях амилоидной синаптотоксичности на 14,7 %, ( $35,6 \pm 2,0$ ) %, по сравнению с группой клеток, в отсутствие ФДЭС — ( $20,9 \pm 1,7$ ) %, ( $p < 0,0001$ ).

2. В условиях подавления гена TRPC6, кодирующего экспрессию ионного канала ФДЭС не способен активировать нДУВК в нейронах гиппокампа, что свидетельствует о специфичности данного соединения в активации TRPC6-зависимого нДУВК. Пиковое значение амплитуды кальциевого ответа в клетках гиппокампа с устраненным геном TRPC6 составляет ( $3,73 \pm 0,6$ ) у.е., а добавление ФДЭС не вызывает статистически значимого увеличения амплитуды — ( $4,99 \pm 0,7$ ) у.е. ( $p = 0,122$ ).

3. На модели окклюзии среднетазовой артерии у крыс изучаемое соединение при разовом внутривенном введении в дозе 10 мг/кг уменьшает количество ошибок, совершаемых животными во время тестирования в лабиринте Барнс на следующий день после ишемии, в среднем на 71 % ( $p = 0,0023$ ). Преимущественное влияние оказывается на воспроизведение, а не на запоминание информации, поскольку между окклюзией и тестированием животные не обучались.

## ЛИТЕРАТУРА

1. И. В. Гацких, О. Ф. Веселова, И. Н. Брикман и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **78**(11), 21 – 25 (2015).
2. А. Ю. Новиков, В. А. Ковалев, Н. В. Виничук и др., *Ж. неврол. и псих.*, **117**(6), 28 – 31 (2017).
3. И. А. Титович, Ю. И. Сысоев, В. Ц. Болотова, С. В. Оковитый, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **80**(5), 73 – 76 (2017).
4. Н. А. Язуина, Ю. К. Комлева, А. Б. Салминаидр, *Неврол. ж.*, **17**(5), 32 – 37 (2012).
5. J. N. Bourne, K. M. Harris, *Cur. Opin. Neurobiol.*, **17**(3), 381 – 386 (2007).
6. R. E. Clark, N. J. Broadbent, L. R. Squire, *Hippocampus*, **15**(2), 260 – 272 (2005).
7. F. Cohadon, M. Rigoulet, B. Guerin, M. Vandendriessche, *Nouv. Presse Med.*, **8**(19), 1589 – 1591 (1979).
8. H. Kanemitsu, T. Nakagomi, A. Tamura, et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **22**(10), 1196 – 1204 (2002).
9. H. Kewitz, O. Pleul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**(7), 2181 – 2185 (1976).
10. J. Koizumi, Y. Yoshida, T. Nakazawa, G. Ooneda, *Jpn. J. Stroke*, **8**(1), 1 – 8 (1986).
11. T. Maviel, T. Durkin, F. Menzaghi, B. Bontempi, *Science*, **305**(5680), 96 – 99 (2004).
12. P. M. Penzes, *Nat. Neurosci.*, **14**(3), 285 – 293 (2011).
13. M. W. Pitts, *Bio-protocol*, **8**(5), e2744 (2018).
14. E. Popugaeva, E. Pchitskaya, A. Speshilova, et al., *Mol. Neurodegener.*, **10**(37), 1 – 13 (2015).
15. A. Rodriguez, D. B. Ehlenberger, D. L. Dickstein, et al., *PLoS One*, **3**(4), e1997 (2008).
16. M. T. Taber, R. N. Wright, T. F. Molski, et al., *Biochem. Behav.*, **80**(3), 521 – 528 (2005).
17. I. Q. Whishaw, J. C. Cassel, L. E. Jarrad, *J. Neurosci.*, **15**(8), 5779 – 5788 (1995).
18. H. Zhang, S. Sun, L. Wu, et al., *J. Neurosci.*, **36**(47), 11837 – 11850 (2016).

Поступила 03.04.19

## MECHANISM OF ACTION OF THE NEW ETHANOLAMINE DERIVATIVE BIS{2-[(2E)-4-HYDROXY-4-OXOBUT-2-ENOYLOXY]-N,N-DIETHYLETHANAMINIUM}BUTANEDIOATE

Yu. I. Sysoev<sup>1,2</sup>, E. A. Popugaeva<sup>3</sup>, D. P. Chernyuk<sup>3</sup>, I. A. Titovitch<sup>1</sup>, E. V. Zagladkina<sup>1</sup>, V. C. Bolotova<sup>1</sup>, I. B. Bezprozvanny<sup>3,4</sup>, and S. V. Okovityi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, ul. Prof. Popova 14, St. Petersburg, 197376 Russia

<sup>2</sup> Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia

<sup>3</sup> Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, ul. Politechnicheskaya 29, St. Petersburg, 195251 Russia

<sup>4</sup> UT Southwestern Medical Center at Dallas, Dallas, Texas, United States

The mechanism of neuroprotective action of a new ethanolamine derivative, bis{2-[(2E)-4-hydroxy-4-oxobut-2-enoyloxy]-N,N-diethylethanaminium}butanedioate (FDES), was studied by means of dendritic spines visualization in a confocal microscope, calcium imaging in postsynaptic dendritic spines, and knockdown of protein expression in primary mice hippocampal cells culture by RNA interference. It was established that a possible mechanism of FDES action is related to the activation of neuronal store-operated calcium entry (nSOCE) into postsynaptic dendritic spines. During knockdown of the TRPC6 channels (the main regulators of hippocampal SOCE), the hippocampal culture FDES did not activate calcium entry into hippocampal neurons, which indicated the specificity of FDES action on nSOCE. On the model of cerebral ischemia, FDES in comparison to reference agents (citicoline and cytoflavin) improved short-term memory of rats in the Barnes maze test (reduced the number of errors by 71%,  $p = 0.0023$ ) with respect to data received 24 h before the test. In the nanomolar dose range, FDES was found to demonstrate neuroprotective properties in primary hippocampal culture, as manifested in the ability to protect mushroom spines from amyloid synaptotoxicity by 15% ( $p \leq 0.0001$ ), which resulted in stabilizing and enhancing synaptic transmission. The obtained results indicate that FDES is of interest for further investigation as a neuroprotective agent.

**Keywords:** ethanolamine derivative; cytoflavin; citicoline; neuroprotection; memory; dendritic spines; cell culture; rats.