

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ПРОБЛЕМ
ХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК
(ФИЦ ПХФ И МХ РАН)**

На правах рукописи



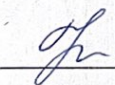
Александрова Юлия Романовна

**Новые мультитаргетные гидроксамовые кислоты
с Сар-группой природного происхождения
для лечения болезни Альцгеймера**

Научная специальность - 1.5.4.Биохимия

Научный доклад

**Об основных результатах научно-квалификационной работы
(диссертации)**

Научный руководитель:  к.х.н. Неганова Маргарита Евгеньевна

Рецензент:  к.б.н. Болтнева Наталья Павловна

Черноголовка, 2023

Актуальность работы.

Одной из стратегически важных задач здравоохранения является улучшение качества жизни населения и вывод на рынок новых лекарственных средств, востребованных для терапии социально-значимых патологий, в первую очередь, нейродегенеративных заболеваний. По оценкам Всемирной организации здравоохранения к 2030 году в мире количество пациентов с различными формами нейродегенеративных заболеваний достигнет 70 млн. Ввиду того, что методы лечения данных патологий до сих пор остаются ограниченными, приоритетным направлением современной биомедицинской химии является разработка более эффективных подходов с целью получения лекарственных средств нового поколения, оказывающих влияние на несколько ключевых звеньев патогенеза заболеваний.

Гидроксамовые кислоты известны как один из перспективных классов химических соединений, обладающих широким спектром биологической активности. Уже более трёх десятков лет гидроксамовые кислоты являются одним из перспективных классов химических соединений с доказанным противоопухолевым потенциалом. На сегодняшний день Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов одобрено использование трёх представителей данного класса для лечения кожной и периферической Т-клеточной лимфомы и множественной миеломы - вориностат, панобиностат и белиностат. Кроме того, в последние годы показана успешность использования гидроксамовых кислот и в терапии нейродегенеративных заболеваний за счёт способности препятствовать нейрональной гибели и восстанавливать когнитивные функции. Однако, несмотря на многочисленные попытки создания терапевтических средств на основе гидроксамовой кислоты, до сих пор отсутствуют высокоэффективные нейропротекторные агенты, которые могли бы синергетически сочетать в себе свойства, модулирующие патологические каскады, без потери эффективности в отношении ключевых мишеней действия соединений данного класса - гистоновых деацетилаз.

В связи с этим всестороннее исследование биологической активности ранее не описанных гидроксамовых кислот различных хемотипов является перспективным направлением получения новых многоцелевых потенциальных лекарственных препаратов противоопухолевой или нейропротекторной направленности.

В качестве биомишеней, на которые могут воздействовать такие соединения, рассматриваются в первую очередь металлоферменты класса гистоновых деацетилаз как основные звенья эпигенетической регуляции, а также компоненты редокс-системы, участвующие в процессах, связанных с окислительным стрессом, и митохондрией. В связи с этим поиск в ряду гидроксамовых кислот потенциальных лекарственных средств с запрограммированными свойствами по отношению к специфическим терапевтическим мишеням и процессам, лежащим в основе патогенеза нейродегенеративных заболеваний человека, является актуальным и перспективным направлением на стыке фундаментальных наук и здравоохранения, которое характеризуется высокой значимостью.

Цель и задачи исследования.

Поиск потенциальных полифункциональных нейропротекторных агентов среди гидроксамовых кислот линейной структуры с Сар-группой природного происхождения.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить ряд задач:

1. Выполнить комплексный *in vitro* анализ биологической активности гидроксамовых кислот линейной структуры с Сар-группой природного происхождения по способности проявлять: (1) антиоксидантные свойства, ингибирующее действие в отношении (2) фермента гистондеацетилаза 6 (HDAC6) и (3) процесса агрегации патологических форм β -амилоидного пептида 1-40 и 1-42.

2. Провести *in vivo* исследование нейропротекторных свойств соединений-лидеров среди гидроксамовых кислот линейной структуры с Сар-группой природного происхождения - на трансгенных животных линии 5xFAD, моделирующих болезнь Альцгеймера.

3. По окончании *in vivo* серии экспериментов выполнить посмертный анализ образцов головного мозга животных экспериментальных групп - определить уровень малонового диальдегида и восстановленной формы глутатиона, функционирование комплексов дыхательной цепи митохондрий, а также количество β -амилоидных отложений.

Научная новизна работы.

В рамках выполнения научно-квалификационной работы впервые был проведен комплексный *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo* анализ биологической активности ряда ранее не описанных гидроксамовых кислот с линейной структурой. Помимо получения новых фундаментальных знаний о возможных механизмах фармакологического действия перспективных субстанций на основе гидроксамовой кислоты на молекулярном и клеточном уровнях, вовлечённых в патогенез нейродегенеративных патологий, работа имеет выраженный практический результат. По итогам изучения биологической активности соединений определены вещества с высоким терапевтическим потенциалом. Данные соединения могут быть как основой для дальнейшей химической оптимизации с целью разработки эффективных полифармакофорных препаратов, так и самостоятельными единицами, рекомендованными для дальнейших исследований в доклинических испытаниях и последующего практического использования в фармацевтической отрасли.

Методология и методы исследования. В основу методологического подхода, использованного в данной работе, положены современные методы *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo* анализа, включающие комплексное применение биохимических, гистологических,

гистохимических, поведенческих и статистических методик, а также анализа описанных в литературе экспериментальных данных ведущих авторов в области биомедицинской химии и фармакологии.

Степень достоверности и апробация результатов работы.

Объективность и достоверность полученных результатов подтверждены использованием современного научного оборудования, валидированных и актуальных методов, а также корреляцией с литературными данными и высоким рейтингом опубликованных научных работ. Анализ результатов проведен с применением различных приемов статистической обработки и привлечением достаточного числа биологических и аналитических повторностей. Выводы, сформулированные по результатам научно-квалификационной работы, соответствуют поставленным задачам.

Результаты работы представлены на российских и международных научных конференциях, в том числе в виде устных и стендовых докладов на Конгрессе молодых ученых ИТМО (Санкт-Петербург, 2019); 10th Anniversary World Congress on Targeting Mitochondria (Berlin, 2019); European Neuropsychopharmacology (Copenhagen, 2019); Международные научно-практические фестивали «Молодая наука в классическом университете» (Иваново, 2019-2020); 4 и 5-я Российская конференции по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2019, 2021» (Екатеринбург, Волгоград, 2019, 2021).

Работа выполнена в соответствии с планами научно-исследовательских работ Лаборатории биохимии патологических процессов ФИЦ ПХФ и МХ РАН (в.н.с., к.х.н. М.Е. Неганова) с 2019 по 2022 гг. при финансовой поддержке РНФ (проекты №19-73-10195 и №22-23-00995), а также стипендий Президента и Правительства Российской Федерации на 2022/23 учебный год (приказы Минобрнауки №736 от 8 августа 2022 г. и №750 от 10 августа 2022 г.).

Публикации.

Основное содержание работы опубликовано в 9 печатных работах, среди которых 4 статьи, опубликованные в зарубежных научных изданиях, рецензируемых международными базами реферативных данных Scopus и Web of Science. Получен один патент Российской Федерации.

Личный вклад автора.

Определение темы работы, цели и задач исследования проводились автором совместно с научным руководителем к.х.н. Негановой Маргаритой Евгеньевной. Разработка методологических подходов к решению поставленных задач, непосредственное проведение экспериментов по исследованию биологической активности соединений, а также анализ и обсуждение полученных результатов и их оформление в виде научных публикаций и докладов проведены автором лично, либо при непосредственном участии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для изучения нейропротекторной активности синтезированных гидроксамовых кислот с САР-группой природного происхождения были использованы методы *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo*, включающие определение антиоксидантного статуса соединений, влияние на активность HDAC6 и агрегацию β -амилоида, анализ влияния на выживаемость клеточных культур (Нек 293 - клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека; SH-SY5Y - нейробластома человека), а также определение влияния на когнитивные функции трансгенных животных линии 5xFAD с последующим исследованием действия на процессы, связанные с окислительным стрессом и митохондриальной дисфункцией, в образцах мозга *post mortem*.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ НАУЧНО-КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Объект исследования - гидроксамовые кислоты линейной структуры, содержащие фрагменты адамантана и природных соединений

В последнее время успешность использования гидроксамовых кислот показана также в терапии нейродегенеративных расстройств. Наиболее перспективными направлениями разработки новых лекарственных средств являются модификации САР-группы (ключевого фрагмента для распознавания изоформ HDAC) и линкерной области. Это позволяет добиться улучшения профиля ингибирования HDAC за счет повышения сродства к поверхностным группам ферментов и появления новых механизмов действия нейропротекторной направленности.

Для реализации данного подхода в Лаборатории направленных трансформаций природных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук под руководством к.х.н. Е.В. Суслова был получен ряд новых гидроксамовых кислот линейной структуры, содержащих фрагменты адамантана и природных соединений камфана и фенхана в качестве САР-группы, которые были

объединены с линкерами различной природы с амидной группой. Данный подход является перспективным, поскольку как адамантан, так и терпеновые соединения сами по себе продемонстрировали многообещающие фармакологические эффекты. На рисунке 1 представлены общие формулы линейных гидроксамовых кислот.

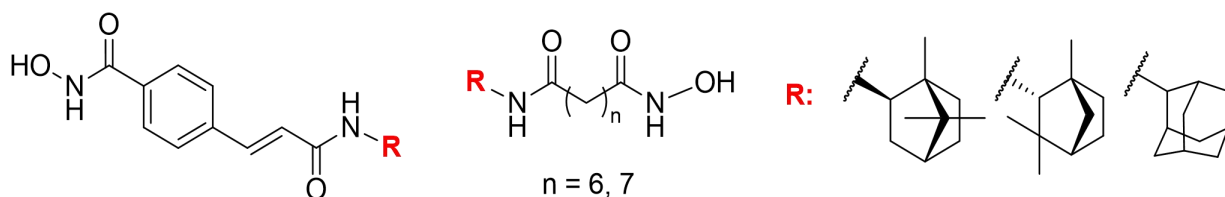


Рисунок 1. Общие формулы гидроксамовых кислот линейной структуры.

***In vitro* исследование нейропротекторного потенциала гидроксамовых кислот, содержащих фрагменты адамантана и природных соединений**

Основной мишенью действия свободных радикалов, сверхпродукция которых наблюдается при болезни Альцгеймера, являются липиды как клеточных мембран, так и мембран органелл. Поэтому важными свойствами для потенциальных нейропротекторов являются как наличие прямой антирадикальной активности для нейтрализации АФК, так и способность ингибировать процесс перекисного окисления липидов.

В качестве модельной системы для изучения антиоксидантной активности гидроксамовых кислот был использован препарат гомогената мозга крыс, содержащий фрагменты клеточных мембран. Для инициирования процесса перекисного окисления липидов использовали ионы двухвалентного железа для запуска реакции Фентона и трет-бутилгидроксипероксид (т-БГП) как прямой источник свободных радикалов. Как показано в таблице 1, большинство гидроксамовых кислот проявило умеренную антиоксидантную активность, при этом для соединений **30** и **34** наблюдалась наиболее выраженная способность ингибировать т-БГП-индуцированное ПОЛ: на $43,24 \pm 1,28\%$ и $44,59 \pm 1,73\%$, соответственно. При оценке антирадикальной активности соединений с помощьюДФПГ-теста было обнаружено, что наиболее выраженными антирадикальными свойствами обладает гидроксамовая кислота **34**, о чём свидетельствует процент активности на уровне $43,34 \pm 1,42 \%$ (таблица 1).

По-видимому, наличие антиоксидантных свойств для синтезированных гидроксамовых кислот может быть связано с включением в состав САР-группы фрагментов адамантана, фенхана и камфана. Из литературных данных известно наличие антиоксидантной активности для ряда производных адамантана. Так, для производного адамантана – мемантина – в литературе описана способность уменьшать окислительное повреждение в коре и гиппокампе мозга крыс – двух важных областях мозга, участвующих в формировании памяти.

Таблица 1. Антиоксидантный статус и HDAC6-ингибирующая способность гидроксамовых кислот.

	% активности *		Антирадикальная активность	IC ₅₀ , μM
	Ингибирование ПОЛ			
	г-БГП	Fe (II)	Ингибирование HDAC6	
26	35,96 ± 1,99	28,39 ± 7,41	22,22 ± 1,40	0,69 ± 0,02
27	30,36 ± 1,98	44,02 ± 1,57	-	4,06 ± 0,48
28	24,02 ± 3,44	28,90 ± 3,38	-	9,44 ± 0,74
29	22,62 ± 4,31	37,91 ± 1,08	-	4,48 ± 0,13
30	43,24 ± 1,28	21,52 ± 2,15	19,70 ± 1,34	0,96 ± 0,01
31	16,27 ± 0,42	26,41 ± 2,58	-	0,74 ± 0,01
32	18,26 ± 4,90	32,91 ± 1,12	20,14 ± 1,28	18,03 ± 1,02
33	20,63 ± 3,92	34,16 ± 1,37	20,32 ± 0,41	4,06 ± 0,39
34	44,59 ± 1,73	19,81 ± 4,83	43,34 ± 1,42	6,52 ± 0,40

Примечание: данные в таблице представлены в виде «среднее ± ОС». Отметка « — » свидетельствует об отсутствии активности у исследуемых веществ ($\leq 10\%$) в том или ином тесте. * - при действии веществ в концентрации 100 μM.

Хорошо известно, что болезнь Альцгеймера характеризуется повышенной активностью и сверхэкспрессией гистоновой деацетилазы 6 (HDAC6), что сопровождается нарушениями в регуляции транскрипции и коррелирует с аккумуляцией β-амилоида, гиперфосфорилированием тау-белка и дегенерацией нейронов.

Для всех гидроксамовых кислот с САР-группой природного происхождения была обнаружена ингибирующая способность по отношению к HDAC6 (таблица 1).

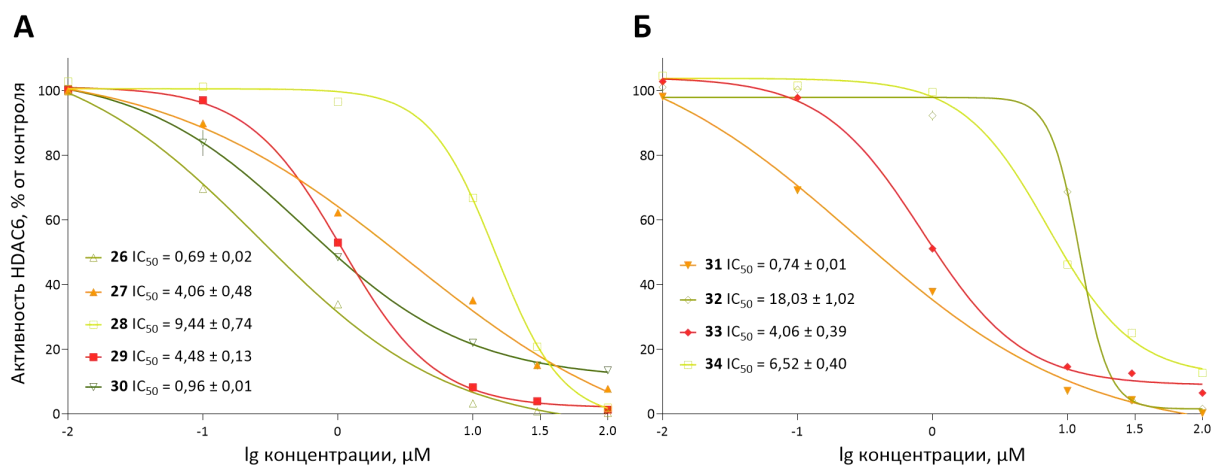


Рисунок 2. Концентрационная зависимость ингибирования гистоновой деацетилазы 6 под действием гидроксамовых кислот **26-30** - А и **31-34** - Б линейной структуры с САР-группой природного происхождения в диапазоне концентраций от 0,01 μM до 100 μM .

Было показано, что наибольшую ингибирующую способность по отношению к HDAC6 проявляли соединения **26**, **30** и **31** с линейной углеводородной структурой линкера и содержащие в САР-группе каркасные фрагменты адамантана и камфана. Значения величины IC_{50} HDAC-ингибирующего эффекта данных гидроксамовых кислот находились в субмикромольном диапазоне: $0,69 \pm 0,02 \mu\text{M}$; $0,96 \pm 0,01 \mu\text{M}$ и $0,74 \pm 0,01 \mu\text{M}$, соответственно. Также высокая активность наблюдалась для соединений **27**, **29**, **33** и **34**, о чем свидетельствовали IC_{50} , не превышающие 6,5 μM (рисунок 2 А и Б).

Таким образом, можно предположить, что основной вклад в HDAC6-ингибирующую способность синтезированных гидроксамовых кислот вносит природа линкера, способствующего проникновению цинк-связывающего фрагмента вещества в каталитический центр фермента и тем самым его ингибирования. Очевидно, что наилучшим действием характеризуются соединения с гекса- и гептаметиленовым линкером, имеющие типичное для ингибиторов HDAC6 строение: САР-linker-ZBD.

Целый ряд различных по клинической картине нейродегенеративных заболеваний имеет сходный молекулярный механизм патогенеза, в основе которого лежит патологическая агрегация белков, приводящая к развитию протеинопатии. В нервных тканях пациентов с болезнью Альцгеймера содержатся белковые агрегаты – амилоидные бляшки, образованные склонным к агрегации β -амилоидным пептидом, состоящим из 40-42 аминокислотных остатков. Это делает перспективным поиск соединений, ингибирующих патологическую агрегацию данного белка.

Влияние гидроксамовых кислот на процесс агрегации $\text{A}\beta_{1-40}$ и $\text{A}\beta_{1-42}$ было изучено с помощью метода, основанного на регистрации флюоресценции Тиофлавина Т. На рисунке 3 А, Д показано, что флюоресценция Тиофлавина Т, свидетельствующая об активном образовании фибрилл β -амилоида, быстро увеличивалась в течение первых шести часов, а затем постепенно прогрессировала во время 72-часового инкубационного периода. В то же время предварительная обработка β -амилоидных препаратов 1-40 и 1-42 веществами **30**, **31**, **32**, **33** и **34** приводила к заметному ингибированию фибриллизации данных пептидов в ходе инкубации. Иными словами, все соединения, содержащие адамантовый фрагмент и линкерную часть, проявляли антиагрегационные свойства, при этом наибольшая активность была показана для **30** и **34**. Сравнительным действием обладала гидроксамовая кислота **33**, отличающаяся природой САР-группы. Для этих веществ также были изучены концентрационные зависимости антиагрегационного эффекта (рисунки 3 Б-Г, Е-З): с увеличением концентрации соединений **30**, **33** и **34** эффективность их действия стремительно увеличивалась.

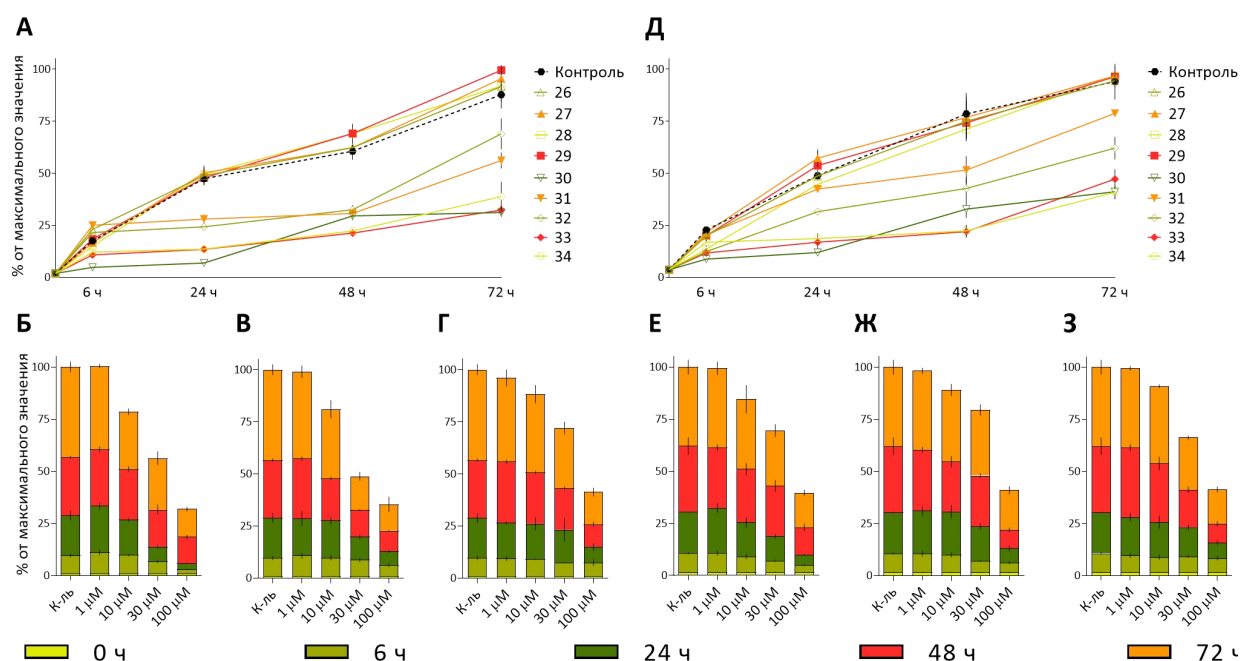


Рисунок 3. Влияние соединений на агрегацию Aβ 1-40 (А-Г) и 1-42 (Д-З). А, Д – концентрация веществ - 100 μМ. Б-Г и Е-З - концентрационные зависимости ингибирования агрегации Aβ₁₋₄₀ и Aβ₁₋₄₂ гидроксамовыми кислотами **30** – Б и Е, **33** – В и Ж, **34** – Г и З. Данные представлены как % агрегации Aβ относительно максимального значения флуоресценции Тиофлавина Т.

Такое действие гидроксамовых кислот может быть связано с влиянием как САР-группы, так и гидроксаматной функции, поскольку ранее аналогичный эффект был обнаружен как для производных адамантана, так и для соединений на основе гидроксамовой кислоты.

Ввиду того, что большинство соединений класса гидроксамовых кислот обладают высокой цитотоксической активностью и в основном используются как противоопухолевые препараты, их использование в качестве лекарственных средств нейропротекторной направленности является ограниченным. Так как цель работы заключалась в поиске агентов для фармакологической коррекции нейродегенеративных заболеваний, необходимым звеном при изучении биологической активности синтезированных гидроксамовых кислот являлось определение их влияния на выживаемость клеточных культур.

Таблица 2. Влияние гидроксамовых кислот линейной структуры с САР-группой природного происхождения на выживаемость клеток SH-SY5Y и Нек 293.

	IC ₅₀ цитотоксического эффекта, μМ				
	26	27	28	29	30
SH-SY5Y	51,89 ± 3,56	> 100	> 100	> 100	47,56 ± 7,19

Hek 293	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
	31	32	33	34	
SH-SY5Y	> 100	64,15 ± 4,10	51,96 ± 2,61	59,51 ± 0,42	
Hek 293	49,48 ± 3,43	68,28 ± 2,22	60,2 ± 1,00	> 100	

Как видно из таблицы 2 все исследованные гидроксамовые кислоты проявили незначительный цитотоксический эффект по отношению к клеткам SH-SY5Y и Hek 293, о чем свидетельствуют значения величин IC_{50} более 50 μ M. Следует отметить, что HDAC-ингибирующая активность ряда синтезированных гидроксамовых кислот находилась в субмикромольном диапазоне (рисунок 2), и очевидно, что терапевтическая концентрация веществ будет много ниже значений IC_{50} .

Таким образом, по итогам *in vitro* тестирования наиболее перспективными веществами для исследования нейропротекторной активности *in vivo* были выбраны гидроксамовые кислоты **30** и **34**, которые эффективно ингибировали HDAC6, проявляли A β -антиагрегационные свойства и обладали антиоксидантной активностью без выраженного токсического действия в отношении клеток SH-SY5Y и Hek 293.

***In vivo* исследование нейропротекторного потенциала гидроксамовых кислот, содержащих фрагменты адамантана и природных соединений**

Первоначальным этапом *in vivo* исследования было изучение токсических эффектов соединений-лидеров на клинически здоровых животных – мышах-самцах линии C57BL/6. Введение веществ производили внутрибрюшинно в разных концентрациях (максимально 300 мг/кг). Патологических изменений в поведении и физиологическом состоянии животных при этом не наблюдалось. Введение эквивалентного объема растворителя (10% ДМСО в физиологическом растворе) также не привело к каким-либо нарушениям. Таким образом, полученные результаты сделали возможным проведение экспериментов на животных в выбранной эффективной концентрации.

In vivo нейропротекторный потенциал гидроксамовых кислот **30** и **34** был оценен по их влиянию на общее поведение и когнитивные функции трансгенных мышей-самцов 5x FAD (Tg(APP^{Sw}FILon, PSEN1*^{M146L}*^{L286V}) 6799^{Vas/J}) в возрасте 11 месяцев. Патологический фенотип данной линии мышей включает амилоидные отложения, глиоз, нейродегенерацию, нарушения памяти, накопление внутриклеточного A β и выраженную гибель нейронов, обнаруживаемые при болезни Альцгеймера. В качестве контрольной группы были использованы дикотипные животные того же возраста – мыши-самцы линии C57BL/6.

Гидроксамовые кислоты **30** и **34** были растворены в физиологическом растворе и ДМСО (10%) непосредственно перед использованием и ежедневно вводились животным внутривенно в течение 20 дней в дозе 15 мг/кг. Мышам линии C57BL/6 и животным 5xFAD, не получавшим лечения гидроксамовыми кислотами, вводили растворитель в том же объёме по аналогичному графику. Тестирование начинали на 11 день введения гидроксамовых кислот.

Влияние гидроксамовых кислот на общие поведенческие характеристики животных было изучено в тесте «Открытое поле», где оценивались исследовательская и двигательная активности, а также уровень тревожности. Когнитивно-стимулирующее действие соединений было определено по их влиянию на эпизодическую память в тесте «Распознавание нового объекта» и пространственную память - в тесте «Водный лабиринт Морриса».

При оценке влияния гидроксамовых кислот **30** и **34** на общее поведение мышей не было обнаружено каких-либо отличий в пройденном расстоянии (рисунок 4 А) и средней скорости движения (рисунок 4 Б), а также времени, проведенном в центральной (рисунок 4 В) и периферической областях (рисунок 4 Г) установки между экспериментальными группами, что свидетельствует об отсутствии влияния данных соединений на двигательную активность, ориентировочно-исследовательское поведение и уровень тревожности.

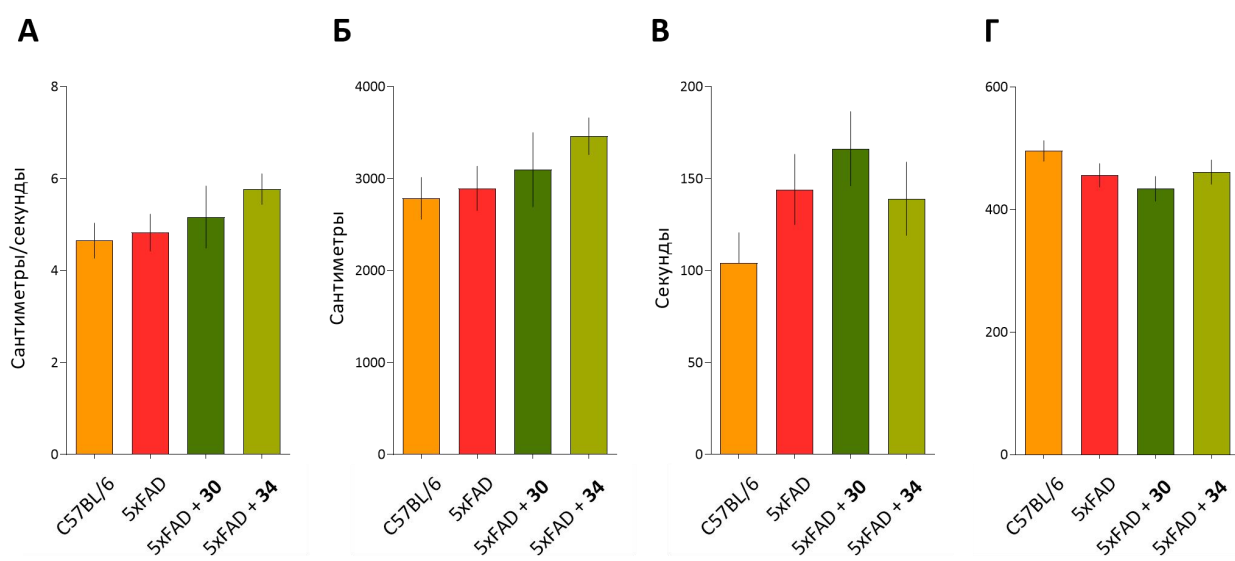


Рисунок 4. Влияние гидроксамовых кислот линейной структуры с САР-группой природного происхождения **30** и **34** на общее поведение трансгенных животных линии 5xFAD в тесте Открытое поле. А-Б – пройденная дистанция и средняя скорость движения как показатели двигательной активности; В-Г – время, проведенное в центральной и периферической областях установки как показатели ориентировочно-исследовательского поведения и уровня тревожности мышей. Данные представлены как среднее \pm ОС (количество животных в каждой группе, n = 8).

При оценке эпизодической памяти животные как дикого типа, так и из группы 5xFAD + 30, показали повышенное предпочтение к исследованию нового объекта в тестовом испытании по сравнению с мышами 5xFAD (рисунок 5).

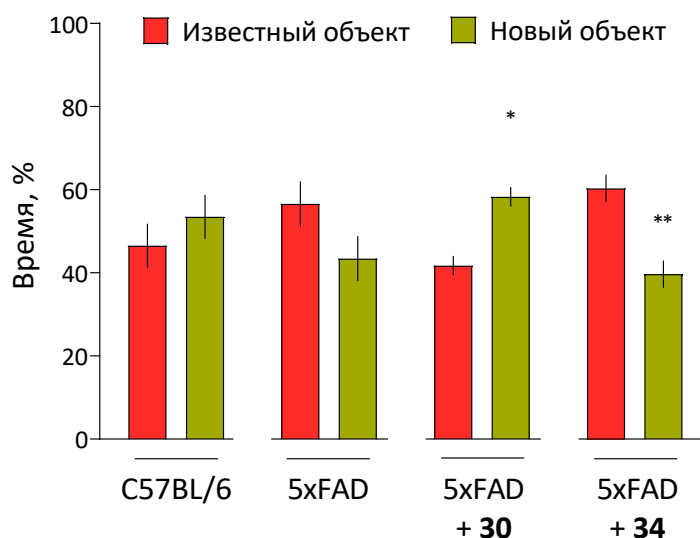


Рисунок 5. Влияние гидроксамовых кислот линейной структуры с САР-группой природного происхождения 30 и 34 на эпизодическую память трансгенных животных линии 5xFAD в тесте «Распознавание нового объекта». Данные представлены в виде процента исследования объекта в течение 10-минутной тестовой фазы как среднее \pm ОС (количество животных в каждой группе, $n = 8$). Время, затраченное на изучение каждого объекта показано как отношение к общему времени к исследованию обоих объектов. * и **, $p < 0,05$ и $p < 0,01$, соответственно, по сравнению с мышами 5xFAD. Статистический анализ был проведен с использованием однофакторного дисперсионного анализа с поправкой Бонферрони.

В то время как для мышей дикого типа разница в этом параметре не была достоверной, мыши, получавшие гидроксамовую кислоту 30, затрачивали значительно больше времени на изучение нового объекта по сравнению с ранее изученным ($p = 0,03$). В то же время у трансгенных животных, не получавших лечения синтезированными соединениями, и у мышей из группы 5xFAD + 34 во время тестового испытания были обнаружены нарушения памяти, что очевидно указывает на проблемы с гиппокамп-зависимым ассоциативным обучением и формированием эпизодической памяти.

Для оценки влияния гидроксамовых кислот 30 и 34 на процесс пространственного обучения трансгенных животных в тесте Водный лабиринт Морриса было зарегистрировано время, необходимое для достижения скрытой под водой платформы. Во время фазы обучения мыши во всех группах, кроме 5xFAD, показали значительное улучшение данного показателя (рисунок 6 А). Так, латентный период поиска платформы трансгенными мышами, не получавшими лечения, в последний день обучения снизился лишь до $50,47 \pm 4,68$ ($p = 0,85$). В свою очередь, как для дикотипных животных, так и для мышей из групп 5xFAD + 30 и 5xFAD + 34 разница между первым и четвертым днём развития была достоверной и

уменьшилась с $53,33 \pm 3,68$ до $34,58 \pm 4,19$ ($p = 0,003$) - для клинически здоровых мышей; с $53,76 \pm 2,79$ до $34,28 \pm 4,32$ ($p = 0,001$) - для 5xFAD + 30; с $53,46 \pm 2,75$ до $38,63 \pm 3,01$ ($p = 0,016$) - для 5xFAD + 34. Более того, у мышей, получавших лечение соединением 30, было выявлено снижение данного показателя уже на третий день обучения ($p = 0,031$), что очевидно, свидетельствуют о способности гидроксамовых кислот восстанавливать нарушения в процессе обучения трансгенных животных 5xFAD.

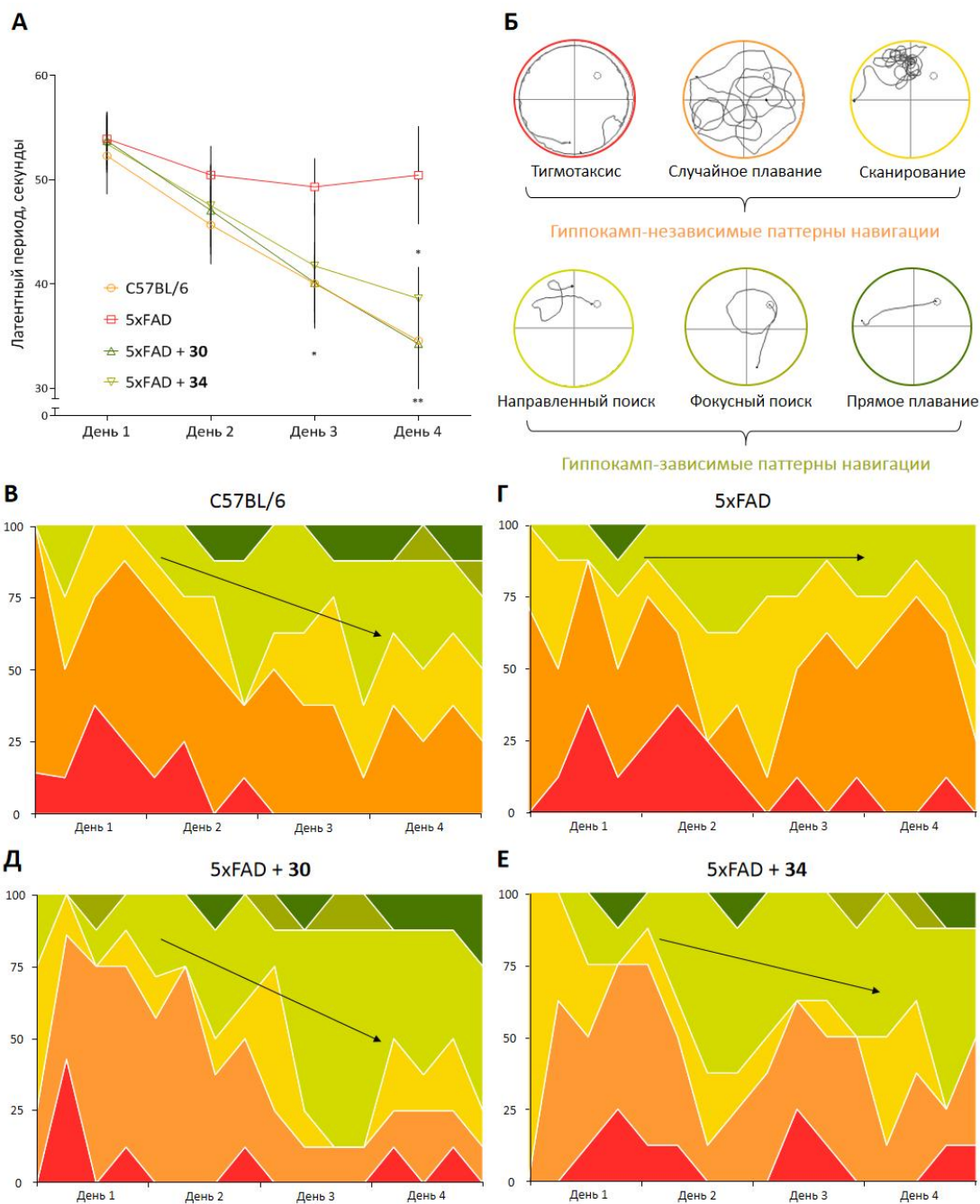


Рисунок 6. Влияние гидроксамовых кислот линейной структуры с САР-группой природного происхождения на пространственное обучение мышей 5xFAD. А – латентный период поиска скрытой платформы. Данные представлены как среднее \pm ОС ($n = 8$). * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$ vs День 1. ANOVA, поправка Бонферрони. Б – поисковые паттерны платформы. В, Г, Д и Е – когнитивные карты животных на этапе обучения в водном лабиринте Морриса.

Также важным подходом в изучении поведения животных в водном лабиринте Морриса является анализ стратегий поиска скрытой платформы в течение всего периода обучения (рисунок 6 Б). Его суть заключается в постепенном переключении гиппокамп-независимой эгоцентрической навигации на гиппокамп-зависимую аллоцентрическую при поиске платформы животными во время фазы обучения. Чаще всего эгоцентрические паттерны наблюдаются в первые дни помещения животного в установку, когда мышь демонстрирует стереотипную последовательность шаблонов поиска скрытой платформы, ориентируясь только на проксимальные, внутренние сигналы. Затем по мере обучаемости начинает включаться гиппокамп-зависимое аллоцентрическое ориентирование с добавлением различных векторов движения и использованием дистальных сигналов (визуальных подсказок, расположенных у бортиков бассейна). Таким образом, поведение животного в водном лабиринте зависит как от эгоцентрической, так и от аллоцентрической стратегий поиска, причем вклад последней возрастает с помещением животных с различных начальных точек маршрута и повторением испытаний, что характеризует успешность гиппокамп-зависимого пространственного обучения.

При анализе стратегий поиска платформы животных было обнаружено, что в отличие от дикотипных животных (рисунок 6 В) у трансгенных мышей линии 5xFAD, не подвергавшихся лечению, наблюдалось сохранение преимущества использования гиппокамп-независимой эгоцентрической навигации вплоть до четвертого дня обучения (рисунок 6 Г). Это подтверждает известные данные о том, что патологический фенотип данной линии животных характеризуется нарушениями в функционировании нейронов гиппокампальной области и свидетельствует об отсутствии эффективного обучения. В свою очередь гидроксамовая кислота **30** привела к нормализации данной ситуации и успешному формированию аллоцентрической когнитивной карты (рисунок 6 Д) подобно таковой у животных из контрольной группы. Для мышей, получавших лечение соединением **34**, наблюдалась схожая тенденция, но в меньшей степени (рисунок 6 Е).

Кроме того, в последний день эксперимента в водном лабиринте Морриса во время фазы тестирования без платформы было изучено влияние гидроксамовых кислот на формирование пространственной памяти. В качестве показателей успешного формирования памяти были зарегистрированы латентный период и количество входов в область платформы, а также время, проведенное в верном (квадрант, в котором во время периода обучения была расположена платформа) и противоположном верному квадрантах.

Как показано на рисунках 7 А и Б, введение гидроксамовой кислоты **30** достоверно снижало латентный период для входа в зону платформы ($p = 0,01$) и увеличивало количество входов в зону платформы ($p = 0,04$) у мышей, моделирующих болезнь Альцгеймера, до уровня животных дикого типа. В свою очередь улучшение параметров пространственной памяти также наблюдалось у животных 5xFAD + **34** - было обнаружено значительное снижение времени нахождения в противоположном верному квадранте по сравнению с животными 5xFAD, не получавшими лечение ($p = 0,01$) (рисунок 7 Г).

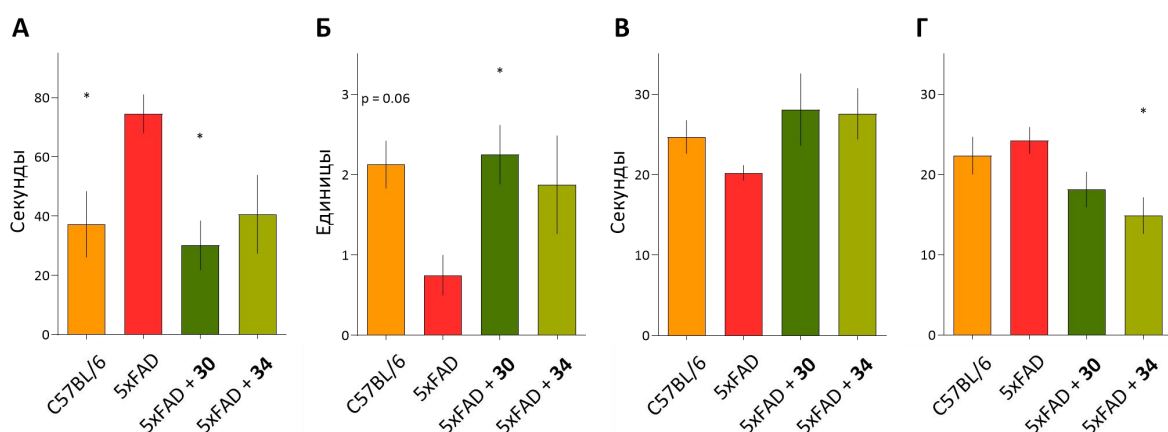


Рисунок 7. Влияние гидроксамовых кислот линейной структуры **30** и **34** на пространственную память мышей 5xFAD. А – латентный период входа, Б – количество входов в зону платформы; время пребывания в В – верном, Г – противоположном верному квадрантах. Данные представлены как среднее \pm ОС (n=8). * $p < 0,05$ vs 5xFAD. ANOVA, поправка Бонферрони.

***Ex vivo* исследование нейропротекторного потенциала гидроксамовых кислот, содержащих фрагменты адамантана и природных соединений**

После экспериментов *in vivo* у мышей всех экспериментальных групп был произведен забор образцов головного мозга для определения в них показателей окислительного стресса, таких как уровень МДА, свидетельствующий об интенсивности перекисного окисления липидов, общий пул глутатиона, как маркер работы эндогенной антиоксидантной системы, а также работу комплексов дыхательной цепи митохондрий и отложения патологического β -амилоидного пептида.

При исследовании влияния гидроксамовых кислот на работу собственной антиоксидантной системы защиты было обнаружено, что у трансгенной линии мышей наблюдались патологические изменения в глутатионовой редокс-системе, что выражалось в достоверном снижении общего глутатиона до $7,03 \pm 0,60$ нмоль/мг белка при $11,10 \pm 0,59$ нмоль/мг белка у животных дикого типа ($p < 0,0001$, рисунок 8 А). В то же время для мышей, получавших лечение гидроксамовой кислотой **30**, была выявлена тенденция к восстановлению данного показателя ($p = 0,08$ по сравнению с 5xFAD). Очевидно, описанные нарушения глутатионового звена антиоксидантной системы у 5xFAD мышей могут вызывать дисбаланс в функционировании всей антиоксидантной системы, в частности, активацию процесса перекисного окисления липидов, который рассматривается в качестве основного молекулярного механизма, участвующего в окислительном повреждении клеточных структур. Так, для трансгенных животных была обнаружена интенсификация данного процесса, о чём свидетельствовало увеличение уровня МДА ($p < 0,05$ по сравнению с дикотипными мышами). В свою очередь для исследуемых соединений влияния на данный показатель не было обнаружено (рисунок 8 Б и В).

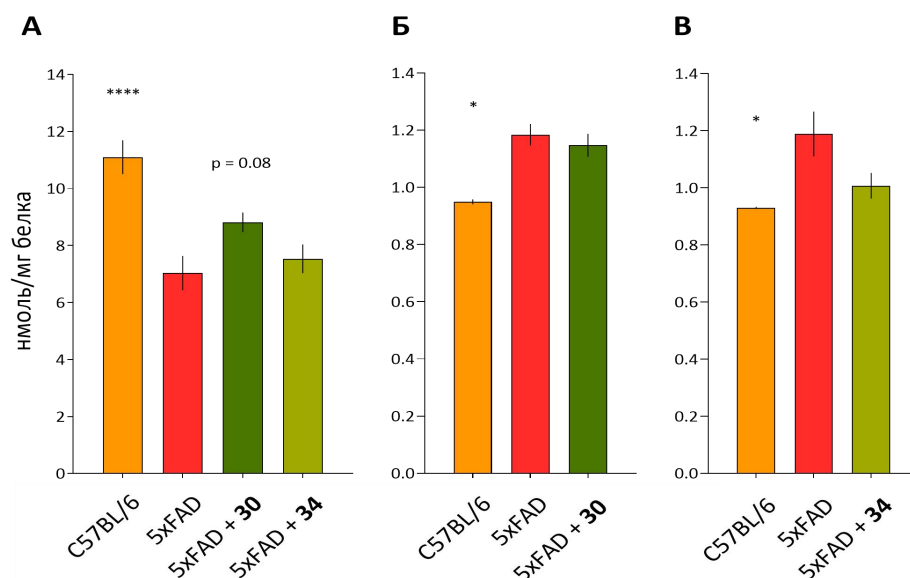


Рисунок 8. *Ex vivo* анализ уровней глутатиона и МДА в мозге мышей после *in vivo* экспериментов. А – содержание восстановленной формы глутатиона (GSH) и Б, В – уровень МДА в образцах головного мозга животных из групп 5xFAD + 30 и 5xFAD + 34, соответственно. Данные представлены как среднее \pm ОС. *, ****, $p < 0,05$ и $p < 0,0001$, соответственно, по сравнению с 5xFAD. Статистический анализ был проведен с использованием однофакторного дисперсионного анализа с поправкой Даннета.

Для исследования функционирования митохондрий головного мозга животных экспериментальных групп был использован анализатор клеточного метаболизма Seahorse Bioanalyzer (Seahorse Bioscience, США). Анализ работы комплексов дыхательной цепи показал, что после введения сукцината и аскорбата/ТМПД органеллы трансгенных животных потребляли меньше кислорода, чем митохондрии мышей дикого типа. Однако данный показатель был повышен у животных, получавших лечение гидроксамовыми кислотами. Так, после введения сукцината скорость потребления кислорода органеллами мышей из группы 5xFAD + 30 увеличилась со $119,07 \pm 25,51$ пмоль/мин до $251,00 \pm 10,45$ пмоль/мин, а после введения аскорбата – с $308,78 \pm 59,54$ пмоль/мин до $422,67 \pm 14,61$ пмоль/мин (9 А).

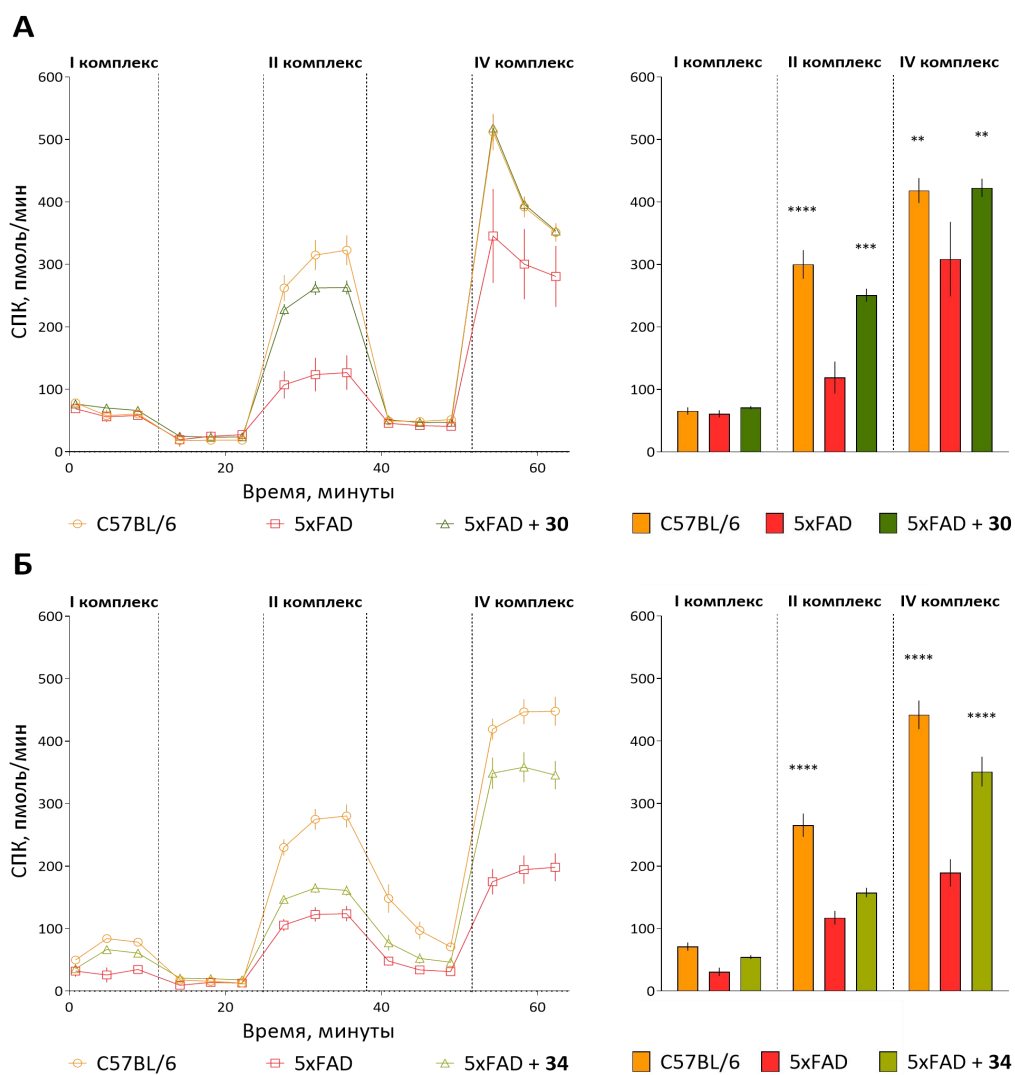


Рисунок 9. *Ex vivo* анализ работы комплексов электрон-транспортной цепи митохондрий мозга мышей после *in vivo* экспериментов для гидроксамовой кислоты **30** - А и **34** - Б. Концентрация ротенона – 2 мкМ, сукцината калия – 2 мкМ, антимицина А – 4 мкМ, аскорбата/ГМПД – 0,5 мкМ. Данные представлены как среднее \pm ОС. **, ***, ****, $p < 0,01$, $p < 0,001$ и $p < 0,0001$, соответственно, по сравнению с 5xFAD. Статистический анализ был проведен с использованием однофакторного дисперсионного анализа с поправкой Даннета.

В то же время для соединения **34** был показан аналогичный эффект в отношении стимуляции IV комплекса митохондриальной дыхательной цепи (рисунок 9 Б).

При окраске срезов головного мозга мышей флуоресцентным красителем Конго красным во всех группах 11-месячных трансгенных мышей наблюдались положительно окрашенные ядра зрелых амилоидных бляшек (рисунок 10 А).

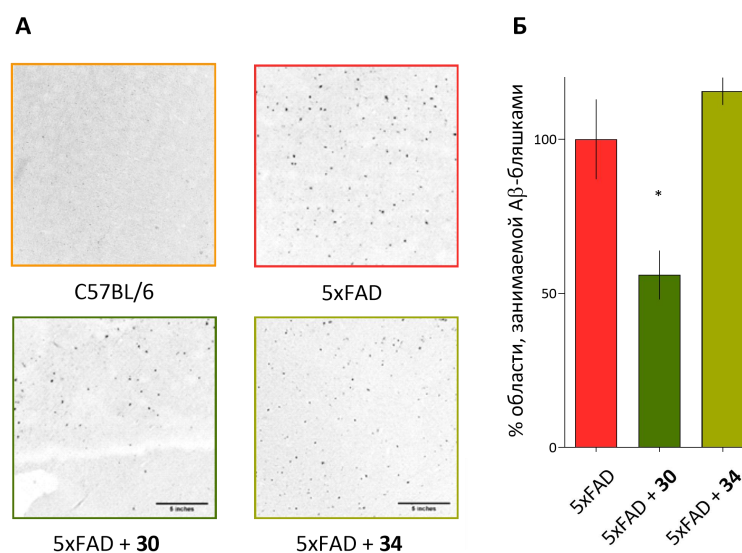


Рисунок 10. *Ex vivo* анализ площади амилоидных бляшек в образцах головного мозга трансгенных мышей после *in vivo* экспериментов. А – микрофотографии срезов мозга мышей, окрашенных красителем Congo Red для визуализации отложений Аβ. В – процент площади, покрытой амилоидными бляшками, в срезах мозга мышей по отношению к мышам 5xFAD, принятым за 100%. Данные представлены как среднее значение ± ОС. *, $p < 0,05$ по сравнению с 5xFAD. Статистический анализ был проведен с использованием однофакторного дисперсионного анализа с поправкой Даннета.

Однако, количественная оценка выявила значительно более низкое содержание включений у животных, получавших гидроксамовую кислоту **30**. Это соединение приводило к выраженному снижению Конго красных положительных отложений - на 45% ($p = 0,03$) по сравнению с мышами 5xFAD, не получавшими лечения (рисунок 10 В). Хотя этиология болезни Альцгеймера до сих пор полностью не изучена, накоплены убедительные доказательства корреляции между накоплением Аβ и когнитивными нарушениями. Очевидно, значительное улучшение когнитивной функции у мышей из группы 5xFAD + **30** коррелирует со снижением отложений Аβ.

Таким образом, по совокупности действия на основные патологические процессы, участвующие в патогенезе болезни Альцгеймера, гидроксамовая кислота **30**, содержащая фрагмент адамантана и природных соединений, может рассматриваться в качестве потенциального мультифункционального нейропротекторного соединения.

ВЫВОДЫ

1. Полученные в рамках *in vitro* серии экспериментов результаты и проведенный анализ зависимости «структура-активность» позволил обнаружить среди линейных гидроксамовых кислот с Сар-группой природного происхождения два соединения-

лидера - **30** и **34**, обладающие антиоксидантными свойствами, эффективно ингибирующие активность фермента гистондеацетилаза 6, препятствующие агрегации патологических форм β -амилоидного пептида 1-40 и 1-42 и не оказывающие выраженного токсического действия.

2. *In vivo* исследование нейропротекторной активности соединений-лидеров показало, что обнаруженный для гидроксамовой кислоты **30**, содержащей в структуре фрагмент адамантана, комплексный тип нейропротекторной активности обуславливает наиболее выраженную способность восстанавливать когнитивные дисфункции мышей 5xFAD, моделирующих болезнь Альцгеймера.
3. В ходе *ex vivo* анализа образцов головного мозга животных обнаружено, что адамантансодержащая гидроксамовая кислота **30** подавляет окислительные процессы, снижая уровень малонового диальдегида и увеличивая содержание эндогенного антиоксиданта глутатиона, восстанавливает работу комплексов дыхательной цепи митохондрий и снижает количество амилоидных включений в мозге трансгенных мышей.
4. Выявленные соединения-лидеры, обладающие мультитаргетным действием, могут рассматриваться в качестве перспективных субстанций для дальнейшего продолжения работ в области создания лекарственных препаратов на основе гидроксамовых кислот при поиске потенциальных терапевтических средств для борьбы с болезнью Альцгеймера.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Статьи в рецензируемых журналах - 4

1. Neganova, M.E. Novel Multitarget Hydroxamic Acids with a Natural Origin CAP Group against Alzheimer's Disease: Synthesis, Docking and Biological Evaluation / M.E. Neganova, **Yu.R. Aleksandrova**, E.V. Suslov, E.S. Mozhaitsev, A.A. Munkuev, D. Tsypyshev, M.M. Chicheva, A. Rogachev, O. Sukocheva, K.P. Volcho and S.G. Klochkov // *Pharmaceutics*. – 2021. – V. 13. – P. 1893. doi: 10.3390/pharmaceutics13111893.
2. Neganova, M.E. Promising molecular targets for pharmacological therapy of neurodegenerative pathologies / M.E. Neganova, **Yu.R. Aleksandrova**, V.O. Nebogatikov, S.G. Klochkov and A.A. Ustyugov // *Acta Naturae*. – 2020. – V. 12. – № 3. – P. 60-80. doi: 10.32607/actanaturae.10925.
3. Neganova, M.E. Histone modifications in epigenetic regulation of cancer: Perspectives and achieved progress / M.E. Neganova, S.G. Klochkov, **Yu.R. Aleksandrova** and G. Aliev // *Seminars in Cancer Biology*. – 2020. – V. 83. – P. 452-471. doi: 10.1016/j.semcancer.2020.07.015.

4. Neganova, M.E. The Hydroxamic Acids as a Potential Anticancer and Neuroprotective Agents / M.E. Neganova, S.G. Klochkov, **Yu.R. Aleksandrova** and G. Aliev // Current Medicinal Chemistry. – 2021. – V. 28. – № 39. – P. 8139-8162. doi: 10.2174/0929867328666201218123154 (Scopus, Web of Science, IF 4.740, Q1).

Тезисы российских и международных конференций - 5

1. Neganova M.E., Klochkov S.G., **Aleksandrova Y.R.**, Yandulova E.Yu., Semakov A.V. Complex approach in studying the neuroprotector potential of natural compounds derivatives. Neuroscience for Medicine and Psychology. 2020. doi: 10.29003/m1175.sudak.ns2020-16/344-345.
2. Неганова М.Е., Клочков С.Г., **Александрова Ю.Р.** Перспективный класс полифункциональных биологически активных соединений на основе гидроксамовых кислот. Сборник тезисов докладов Шестой Междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии». 27-30 сентября 2020 года. С. 76.
3. **Александрова Ю.Р.**, Суслов Е.В., Можайцев Е.С., Мункуев А.А., Клочков С.Г., Неганова М.Е. Нейропротекторный потенциал гидроксамовых кислот на основе природных скаффолдов. Сборник тезисов докладов Шестой Междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии». 27-30 сентября 2020 года. С. 130.
4. **Александрова Ю.Р.**, Суслов Е.В., Можайцев Е.С., Мункуев А.А., Неганова М.Е. Гидроксамовые кислоты – ингибиторы гистондеацетилазы препятствуют агрегации бета-амилоида. Сборник тезисов докладов Юбилейной Десятой Конференции Молодых Учёных ИФАВ РАН. 14 декабря 2020 года. С. 3.
5. Неганова М.Е., **Александрова Ю.Р.**, Суслов Е.В., Можайцев Е.С., Мункуев А.А., Волчо К.П., Клочков С.Г. Нейропротекторный потенциал гидроксамовых кислот, содержащих в качестве САР-группы природные фрагменты. 5-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2021»: материалы конференции, Волгоград, 16–19 мая, 2022 / Европейская Федерация Медицинской химии; Министерство науки и высшего образования Российской Федерации; Российская академия наук [и др.]. – Волгоград: Издательство ВолгГМУ, 2021. с. 65. doi: 10.19163/MedChemRussia2021-2021-65.

Патенты - 1

1. № 2783995 - 4-(3-((2-Адамантил)амино)-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-N-гидроксибензамид - новое средство для лечения болезни Альцгеймера. Неганова М.Е., **Александрова Ю.Р.**, Мункуев А.А., Суслов Е.В., Волчо К.П., Салахутдинов Н.Ф.