

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  
*Виню*

**Винюкова Екатерина Юрьевна**

**Нейропротекторный потенциал триптаминовых производных  
сесквитерпеновых лактонов**

Научная специальность - 1.5.4 Биохимия

**Научный доклад**

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

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

Рецензент: *Солд* к.б.н. Солдатова Юлия Валериевна

**Черноголовка, 2023**

## Актуальность работы

Согласно докладу Всемирной организации здравоохранения от 2019 года, наиболее распространенным нейродегенеративным заболеванием является болезнь Альцгеймера (БА), характеризующаяся потерей нейронов и синаптических связей в коре головного мозга и определённых субкортикальных областях. Несмотря на наличие лекарственных средств, используемых для ослабления симптоматики дегенеративных процессов, количество пациентов с БА продолжает увеличиваться, что делает поиск новых нейропротекторных препаратов одной из важнейших задач современности. В настоящее время считается, что БА является полиэтиологичным заболеванием, в развитии ранних стадий которого участвуют окислительный стресс, митохондриальная дисфункция, протеинопатия и т.д. Одновременная фармакологическая коррекция этих мишеней, вероятно, позволит скорректировать течение заболевания, предотвращая или останавливая его.

В качестве терапевтических агентов для модулирования течения БА можно рассматривать природные соединения, обладающие широким спектром биологической активности, высокой биодоступностью и стабильностью, а также их структурные аналоги. Одним из таких классов соединений являются сесквитерпеновые лактоны. Многие исследования отмечают их противомаларийное, противоопухолевое, антигельминтное и противовоспалительное действие. Также для лактонов выявлен нейропротекторный потенциал, нивелируемый высоким цитотоксическим эффектом.

Создание на основе сесквитерпеновых лактонов бифармакофорных соединений, дополнительно несущих фрагменты физиологически активных аминов, может привести к снижению их токсического действия, повышению метаболической активности и модификации свойств в целом. Биогенные амины, образующиеся эндогенно из аминокислот, обуславливают многие физиологические реакции. Известно, что некоторые из них являются структурными элементами других биомолекул, например, этаноламин входит в состав фосфолипидов, аминопропанол – цианкобаламина. Однако большая часть функционирует в качестве нейромедиаторов, регулируя эмоции, когнитивные процессы, память, внимание и др. Так, триптамин играет роль нейромедиатора и нейротрансмиттера в головном мозге млекопитающих, а его производные обладают психоактивными свойствами и модулируют функционирование ЦНС. Поэтому получение и оценка биологической активности соединений, содержащих

в своей структуре фрагменты различных сесквитерпеновых лактонов и биогенных аминов, может приблизить создание нейропротекторного препарата от БА.

**Цель настоящей работы** заключалась в оценке нейропротекторного потенциала триптаминовых производных сесквитерпеновых лактонов.

#### **Задачи исследования:**

1. Оценить антиоксидантную и митопротекторную активности триптаминовых производных сесквитерпеновых лактонов.
2. Исследовать влияние триптаминовых производных сесквитерпеновых лактонов на процессы, связанные с протеинопатией: агрегацию  $\beta$ -амилоида и активность фермента BACE1.
3. Оценить влияние триптаминовых производных сесквитерпеновых лактонов на выживаемость здоровых клеток НЕК-293 и нейрональноподобных клеток SH-SY5Y.
4. Провести углубленное *in vitro* изучение нейропротекторного потенциала наиболее эффективных соединений.
5. Оценить влияние серотонинового производного изоалантолактона на поведенческие характеристики и когнитивные функции мышей 5xFAD с моделью БА.
6. Провести *ex vivo* определение влияния серотонинового производного изоалантолактона на окислительный стресс в образцах головного мозга *post mortem*.

#### **Научная новизна**

При выполнении исследования была изучена биологическая активность ранее не исследованных соединений. Выявлен ряд производных, содержащих фармакофорные фрагменты сесквитерпеновых лактонов и триптаминоподобных структур, обладающий широким спектром биологической активности, в том числе антиоксидантным и митопротекторным действием, и препятствующий агрегации  $\beta$ -амилоида. Определена наиболее перспективная модификация исходных лактонов, а именно включение в состав молекулы серотонинового фрагмента, позволяющая получить потенциальные полифункциональные лекарственные препараты, воздействующие на несколько мишеней патогенеза БА.

#### **Степень достоверности результатов и апробация работы**

Достоверность исследования подтверждается выполнением экспериментов на высоком научно-методическом уровне с использованием современных физико-химических методов анализа. Используемые методы соответствуют поставленным задачам, а проведенный статистический анализ подтверждает

достоверность полученных результатов. Основное содержание работы изложено в 2 статьях в журналах, рекомендованных ВАК. Отдельные результаты исследования были апробированы на Шестой Междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» (Нижний Новгород, 2020), XVI международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для Медицины и Психологии» (Судак 2020), а также IX и X конференциях Молодых Учёных ИФАВ РАН (Черноголовка, 2019 и 2020).

### Публикации

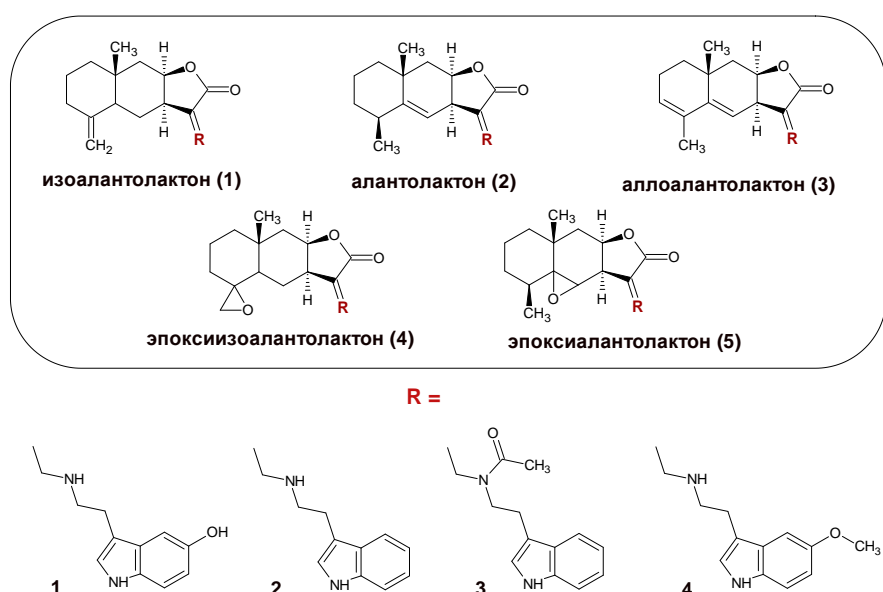
По материалам ВКР опубликовано 6 работ, из них 2 статьи по теме ВКР в реферируемых в научных журналах, индексируемых Web of Science и Scopus или входящих в перечень ВАК, 4 тезисов докладов на конференциях.

### Личный вклад автора

Все результаты, представленные в докладе по основным результатам ВКР, получены непосредственно автором или при его участии. Эксперименты *in vivo* проведены совместно с м.н.с. Александровой Ю.Р. Постановка задач и обсуждение полученных результатов проводилось совместно с научным руководителем Негановой М.Е.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

Исследуемые соединения были синтезированы в Лаборатории природных соединений ФИЦ ПХФ и МХ РАН под руководством Ключкова С.Г. К исходным сесквитерпеновым лактонам по активированной двойной связи в ходе реакции Михаэля присоединялись триптаминоподобные аминокислоты с образованием исследуемых соединений, представленных на рисунке 1.



**Рисунок 1.** Структурная формула исследуемых соединений.

### Оценка антиоксидантной и митопротекторной активности

В качестве модулируемых мишеней были выбраны окислительный стресс (ОС) и митохондриальная дисфункция (МД), вклад которых в развитие ранних стадий БА отмечается многими исследователями. В основе ОС лежит дисбаланс окислительно-восстановительных реакций, в норме участвующих в физиологических процессах. Нарушение их запускает патофизиологические процессы, участвующие в развитии многих заболеваний, в том числе и БА. Поэтому одним из требований к выбору соединений-хитов среди триптаминовых производных сесквитерпеновых лактонов является наличие антиоксидантной активности (АОА), определяемой в условиях нашего эксперимента по уровню ингибирования перекисного окисления липидов (ПОЛ) гомогената мозга крыс, используемого в качестве тест-системы. Для ускорения времени реакции использовали  $\text{FeSO}_4$ , ионы  $\text{Fe(II)}$  которого катализируют образование свободных радикалов в ходе реакции Фентона, или трет-бутилгидропероксид (*t*-ВНР), применяемый в качестве стандартного пероксидного соединения.

Другим критерием отбора потенциальных нейропротекторных соединений служило наличие митопротекторной активности, регистрируемой в используемых тестах как отсутствие влияния на мембранный потенциал ( $\phi_m$ ) и ингибирование  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированного набухания митохондрий, предшествующего запуску апоптотической гибели клетки по внутреннему пути. Влияние на данные характеристики оценивали с использованием флуоресцентной потенциал-чувствительной метки сафранина А и по изменению оптической плотности суспензии изолированных митохондрий печени крыс соответственно. Результаты, полученные в этих тестах, представлены в таблице 1.

**Таблица 1.** Влияние исследуемых соединений на процесс ПОЛ и некоторые митохондриальные характеристики

	Ингибирование ПОЛ, %		Механизм антиоксидантной активности		Влияние на митохондрии	
	Инициатор $\text{Fe(II)}$	Инициатор <i>t</i> -ВНР	$\text{Fe(II)}$ -хелатирующая способность, %	Антирадикальная активность, %	Деполяризация $\phi_m$ , %	Ингибирование набухания, %
<b>1</b>	Прооксида nt	–	–	–	–	Провоцирование набухания
<b>1.1</b>	82,34±1,31 ( $\text{IC}_{50}$ = 8,77±0,23 мкМ)	35,02±8,21	–	80,35±0,63 ( $\text{EC}_{50}$ = 12,76±0,06 мкМ)	–	59,18±3,75
<b>1.2</b>	65,38±1,52	40,28±2,05	–	–	49,4±2,17	77,74±10,10
<b>2</b>	–	–	–	–	–	Провоцирование

						е набухания
2.1	67,52±1,51 (IC <sub>50</sub> = 5,02 ± 0,20 мкМ)	–	–	83,39±0,60 (EC <sub>50</sub> = 18,00±1,44 мкМ)	–	51,00±20,00
2.2	64,10±0,46	43,04±2,14	–	–	47,8±3,07	82,03±7,59
2.3	34,02±1,97	40,56±5,63	–	–	–	54,17±7,76
3	–	–	–	–	–	–
3.4	88,14±1,49 (IC <sub>50</sub> = 2,83 ±0,07 мкМ)	50,75±4,54	27,17±0,92	–	–	73,96±6,96
4	–	–	–	–	–	–
4.1	64,61±7,43 (IC <sub>50</sub> = 22,19±2,21 мкМ)	–	–	82,35±0,14 (EC <sub>50</sub> = 10,34±0,67 мкМ)	–	48,00±13,00
4.2	57,37±0,79 (IC <sub>50</sub> = 20,54±0,07 мкМ)	35,64±3,84	–	–	–	58,37±3,06
4.3	–	–	–	–	–	46,35±13,43
4.4	51,35±3,73 (IC <sub>50</sub> = 4,72±0,09 мкМ)	43,29±3,78	59,61±4,07	–	–	75,82±7,81
5	–	–	–	–	–	–
5.2	65,84±2,47 (IC <sub>50</sub> = 18,05±0,07 мкМ)	–	37,38±0,65	–	–	62,50±7,77
5.4	36,79±4,49	36,45±1,02	–	–	57,05±1,44	–

Знаком «–» отмечена активность относительно контроля (1% ДМСО), не превышающая 25% при концентрации исследуемых соединений 100 мкМ.

Как видно из таблицы 1, изоалантолактон (1) и алантолактон (2) провоцируют набухание митохондрий. Кроме того, лактон 1 способствует развитию состояния ОС, усиливая интенсивность процесса ПОЛ. Аллоалантолактон (3), эпоксиизоалантолактон (4) и эпоксиалантолактон (5) не влияют на оцениваемые параметры. Среди синтезированных производных подавляющее большинство обладает АОА. Соединения, содержащие фрагмент серотонина (1.1, 2.1. и 4.1), ингибируют ПОЛ, инициированный ионами Fe(II) и *t*-ВНР, на 64 – 82% и не более чем на 35% соответственно. Также для них выявлена способность препятствовать деградации митохондрий, а именно ингибировать Ca<sup>2+</sup>-индуцированное набухание на 48 – 59% без изменения разности потенциалов мембраны.

Модификация исходных лактонов путем присоединения радикала 2 (1.2, 2.2, 4.2 и 5.2) привела к появлению способности препятствовать развитию каскада реакций ПОЛ на 57 – 65% и не более чем на 43% при активации процесса Fe(II) и *t*-ВНР соответственно, а также снижению Ca<sup>2+</sup>-индуцированного набухания на 58

– 82 %. Однако для 1.2 и 2.2 было зафиксировано изменение проницаемости мембраны, а именно ее деполяризация на  $47,8 \pm 3,07\%$  и  $49,4 \pm 2,17\%$  соответственно, что позволяет предположить о наличии у них цитотоксического эффекта.

Триптаминовые производные 2.3 и 4.3 продемонстрировали антиоксидантную активность, не превышающую 40%, и ингибировали  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированное набухание на 46 – 54%. Соединения 3.4, 4.4 и 5.4 ингибировали процесс ПОЛ на 36,79 – 88,14% при инициации  $\text{Fe(II)}$  и на 36 – 50% при активации *t*-ВНР. Однако их влияние на митохондриальные характеристики отличается: 3.4 и 4.4 препятствуют набуханию митохондрий, сжижая  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированный процесс на 73 – 75%, а 5.4 снижает мембранный потенциал на  $57,05 \pm 1,44\%$ .

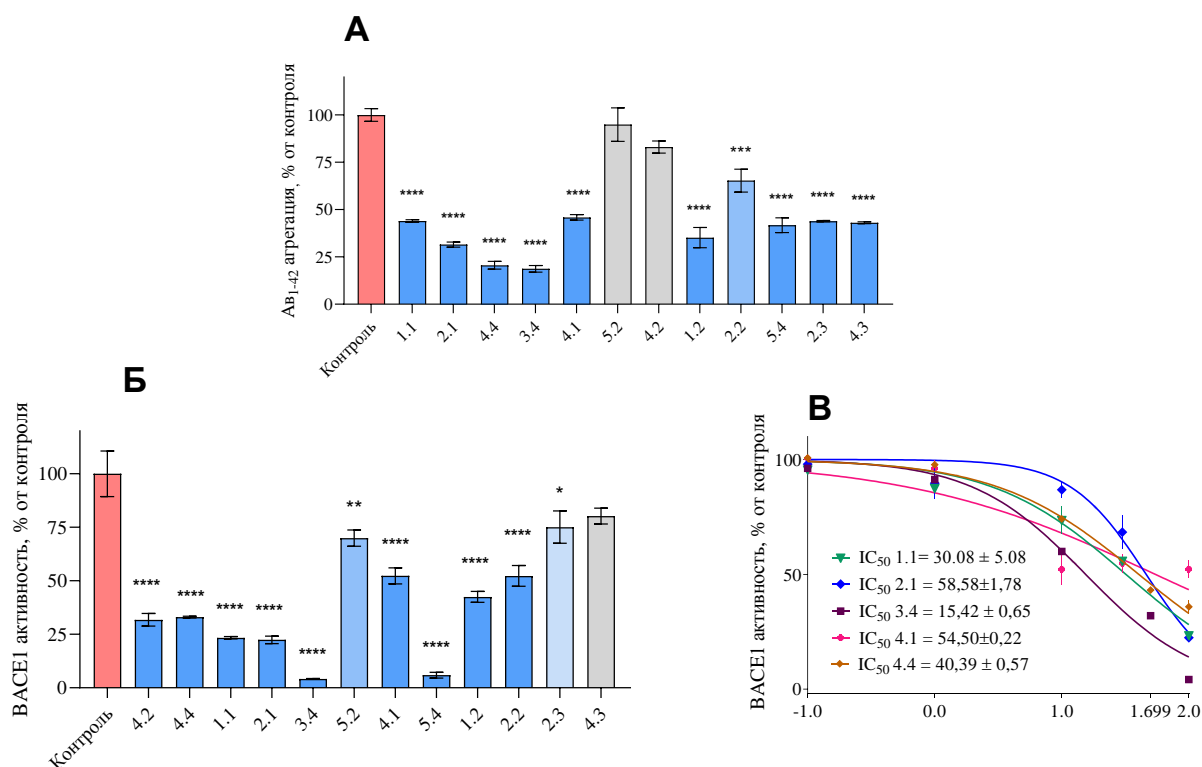
Таким образом, для большинства исследуемых соединений была выявлена способность снижать интенсивность процесса ПОЛ и оказывать защитный эффект в отношении изолированных митохондрий печени крыс.

### **Исследование влияние на процессы, связанные с протеинопатией**

Известно, что протеолитическое расщепление белка-предшественника амилоида секретазы, ведущее в том числе к образованию  $\text{A}\beta$ , а также его дальнейшая агрегация влияют на синаптическую пластичность и память. При этом основную роль в запуске амилоидогенного пути расщепления APP играет  $\beta$ -секретаза 1 (BACE1), ингибиторы которой находятся на разных стадиях клинических испытаний. Влияние на агрегацию  $\text{A}\beta$  и модуляция протеазной активности BACE1 рассматриваются нами в данной работе как необходимые свойства потенциальных нейропротекторных соединений.

Влияние на агрегацию  $\text{A}\beta$  оценивали по изменению флуоресценции тиофлавина Т, специфически взаимодействующего с фибриллами. Как показано на рисунке 2А, большинство исследуемых соединений препятствуют агрегации  $\text{A}\beta_{1-42}$ , являющегося основной формой, ассоциированной с БА. Соединения, содержащие в своей структуре радикалы 1, 3 или 4 в данном тесте были наиболее активны. 4.2 и 5.2 не показали статистически значимой от контроля разницы.

При оценке влияния на активность BACE1, определяющей амилоидогенный процесс, было обнаружено, что все триптаминовые производные снижают протеазную активность (рис. 2Б). Для наиболее эффективных ингибиторов вычислили концентрацию  $\text{IC}_{50}$ , которая была расположена в диапазоне 15 - 59 мкМ (рис. 2В).



**Рисунок 2.** Влияние исследуемых соединений в концентрации 100 мкМ на агрегацию Аβ через 24 ч (А) и активность BACE1 (Б). В - Концентрационное влияние на активность BACE1. Концентрация тиофлавина Т составляла 10 мкМ, BACE1 1,0 ЕД/мл. Данные представлены в % относительно контроля (ДМСО ≤ 1%): как среднее ± SEM. Статистически значимые результаты отмечены звездочкой: \*\*\* –  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* –  $p < 0,0001$  (однофакторный дисперсионный анализ с поправкой Даннета).

Таким образом, было выяснено, что все исследуемые соединения в той или иной степени влияют на процессы, связанные с протеинопатией, а именно препятствуют агрегации Аβ и/или снижают активность BACE1, что позволяет предположить перспективность данной группы соединений в качестве потенциальных нейропротекторных агентов.

### Оценка влияния соединений-хитов на выживаемость здоровых клеток НЕК-293 и нейрональноподобных клеток SH-SY5Y

Существенным фактором, ограничивающим применение потенциальных терапевтических агентов, является наличие токсического эффекта. Для исключения цитотоксичных соединений было оценено влияние триптаминовых производных сесквитерпеновых лактонов на жизнеспособность культуры нейронально-подобных клеток SH-SY5Y (нейробластома) и клеток, близких к нормальным НЕК-293 (эмбриональная почка человека) с помощью МТТ-теста (табл. 2).

**Таблица 2.** Влияние триптаминовых производных сесквитерпеновых лактонов на жизнеспособность клеточных линий. Время инкубации 24 часа.

Соединение	IC <sub>50</sub> (мкМ)	
	HEK-293	SH-SY5Y
1.1	>100	>100
2.1	>100	>100
4.1	>100	>100
4.2	>100	70,67 ± 0,78
3.4	85,33 ± 0,18	19,01 ± 2,75
4.4	83,26 ± 1,85	61,26 ± 6,20
5.2	25,70 ± 0,91	18,87 ± 1,18
4.3	83,26 ± 1,85	61,26 ± 6,20
1.2	7,09 ± 0,55	6,94 ± 0,41
2.2	7,98 ± 0,0	7,41 ± 0,16
5.4	>100	74,63 ± 13,14

Было выяснено, что соединения, содержащие в своей структуре радикалы 2, 3 или 4, снижают количество жизнеспособных клеток. Напротив, введение серотониновых производных лактонов (1.1, 2.1 и 4.1) в тест-культуры не влияет на метаболическую активность, регистрируемую по количеству образовавшегося формазана, что свидетельствует о низкой токсичности данных соединений.

Исходя из вышенаписанного, для дальнейшего изучения в качестве полифункциональных потенциальных нейропротекторных соединений были выбраны серотониновых производных лактонов, обладающие антиоксидантной и митопротекторной активностью, а также не влияющие на выживаемость модельных клеточных тест-культур.

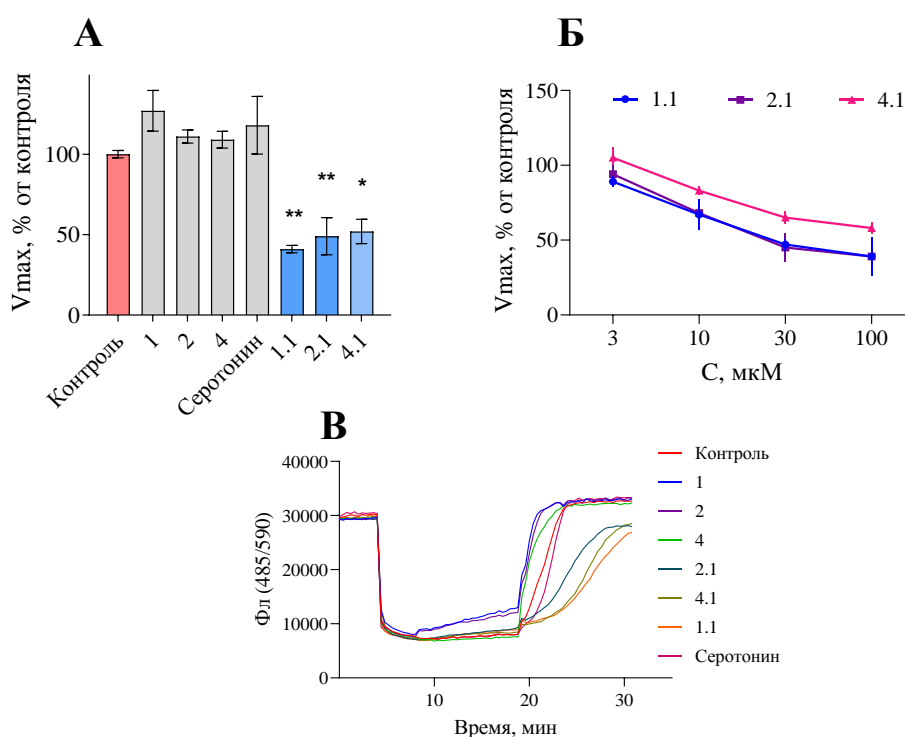
### **Углубленное *in vitro* изучение нейропротекторного потенциала наиболее эффективных соединений**

Гибель нейронов, характерная в том числе и для БА, может наблюдаться вследствие энергетического дефицита, возникающего при дисфункции митохондрий. Нарушение регуляции митохондриальных комплексов, включая электрон-транспортную цепь (ЭТЦ) и АТФ-синтазу, является потенциальным фактором патологии БА. Предполагается, что фармакологическая коррекция энергетического метаболизма позволит предотвратить снижение когнитивных функций.

Ранее нами уже было показано положительное влияние на функциональные характеристики митохондрий печени крыс. Однако цель нашей работы заключается в поиске нейропротекторных соединений, поэтому дополнительно на митохондриях мозга крыс оценили влияние серотониновых производных

сесквитерпеновых лактонов на процесс  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированного набухания, мембранный потенциал и работу комплексов дыхательной цепи.

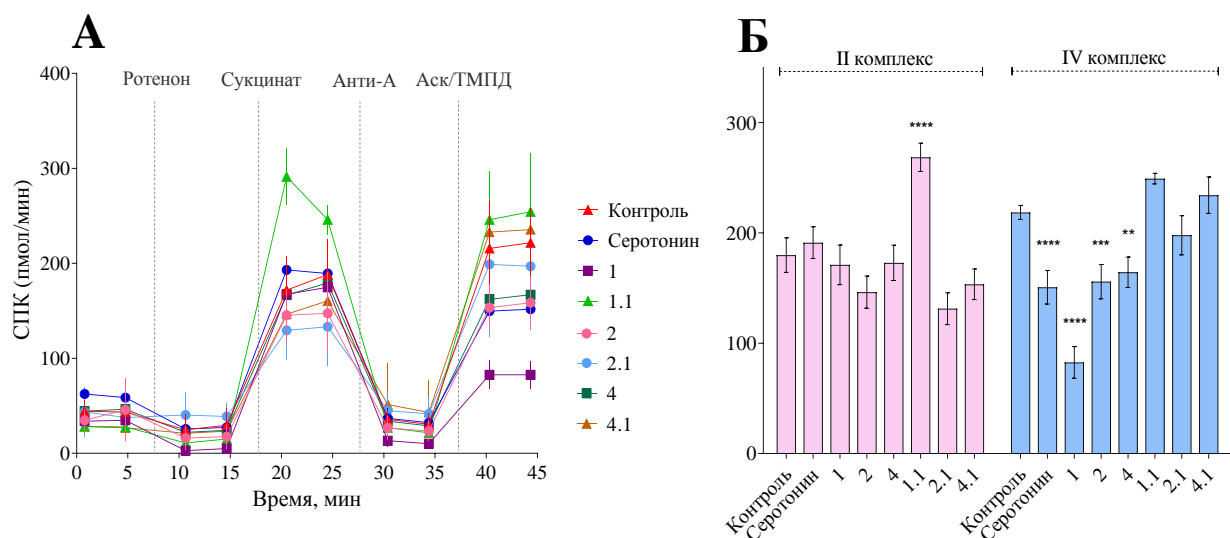
Было установлено, что все серотониновые производные препятствуют деградации митохондрий мозга крыс (рис. 3), что хорошо согласуется с результатами, полученными с использованием в качестве тест-системы органелл печени (табл. 1). Было выявлено концентрационно-зависимое влияние на открытие  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительной митохондриальной поры при оценке набухания (рис. 3Б), что также косвенно подтверждается по сжигению скорости деполяризации мембраны при введении в суспензию митохондрий мозга крыс  $\text{CaCl}_2$  (рис. 3В).



**Рисунок 3.** А- Нормированные значения скорости  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированного набухания митохондрий мозга крыс (0,5 мг/мл). Б – Концентрационное влияние на набухание митохондрий мозга крыс. Данные представлены в виде % скорости данного процесса относительно контроля (ДМСО  $\leq$  1%): как среднее  $\pm$  SEM. В – влияние на мембранный потенциал митохондрий мозга крыс. Энергизацию митохондрий проводили сукцинатом калия (5 мМ) в присутствии ротенона (1 мкМ). Концентрация исследуемых веществ составляет 30 мкМ (А и В), ионов  $\text{Ca}^{2+}$  12,5 мкМ. Статистически значимые результаты отмечены звездочкой \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$  (однофакторный дисперсионный анализ с поправкой Даннета).

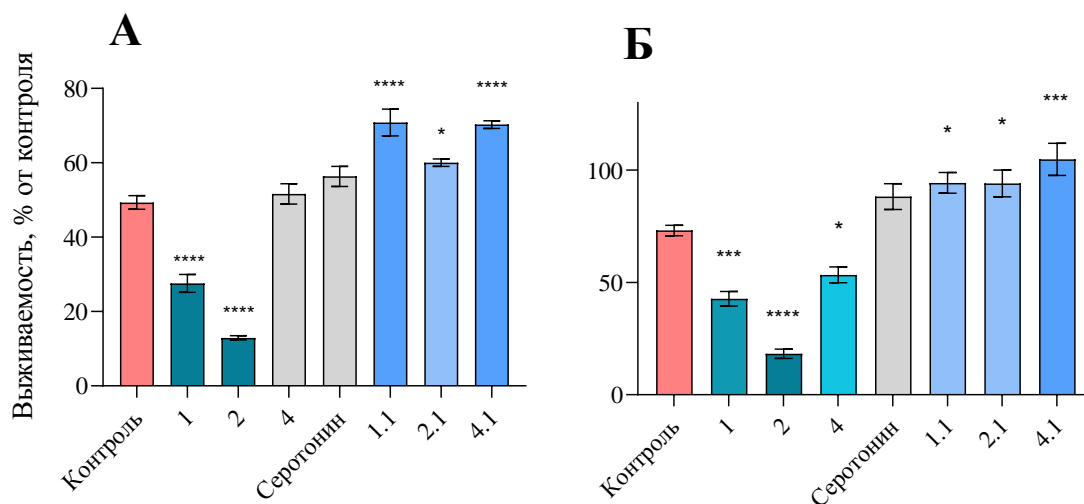
Оценка скорости потребления кислорода при последовательном добавлении модуляторов дыхательной цепи митохондрий показала, что серотониновое производное изоалантолактона 1.1 усиливает дыхание митохондрий за счет стимуляции II комплекса, в то время как для 2.1 и 4.1 не отмечалось достоверных

от контроля отличий. Исходные фармакофорные фрагменты 1, 2, 4 и серотонин (радикал 1) угнетали работу IV комплекса (рис. 4).



**Рисунок 4.** А - Оценка влияния исследуемых соединений на работу комплексов дыхательной цепи по скорости поглощения кислорода изолированных митохондрий мозга крыс (0,5 мг/мл). Концентрация ротенона составляет (2 мкг/мл), сукцината – 2 мкМ, антимицина А – 4 мкМ, аскорбат/ТМПД – 0,5 мкМ. Контрольные пробы содержат ДМСО ( $\leq 1\%$ ). Б – Влияние исследуемых веществ на работу II и IV комплексов дыхательной цепи. Концентрация веществ составляет 30 мкМ. Статистически значимые результаты отмечены звездочкой \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\* –  $p \leq 0,0001$  (двухфакторный дисперсионный анализ с поправкой Бонферонни).

Как известно, в гибели клеток головного мозга при БА также задействована глутамат-индуцированная токсичность, возникающая вследствие aberrантной экспрессии транспортера глутамата. Повышенная концентрация глутамата активирует NMDA- и AMPA-подтипы рецепторов, увеличивая концентрацию цитозольного свободного  $Ca^{2+}$ , являющегося триггером ряда процессов, ведущих к гиперпродукции АФК и гибели клетки по пути апоптоза. В условиях нашего эксперимента для моделирования нейротоксичности в качестве катализатора использовали глутамат (рис. 5А) и пероксид водорода (рис. 5Б). Было выяснено, что инкубация культуры нейробластомы SH-SY5Y в среде роста при глутамат- и  $H_2O_2$ -индуцированной токсичности вызывает снижение выживаемости клеток, а дополнительное введение исходных сесквитерпеновых лактонов 1, 2 и 4 усиливает цитотоксическое действие. Добавление 1.1, 2.1 и 4.1 в среду достоверно защищает клетки от токсического действия как  $H_2O_2$  (рис. 5Б), так и глутамата (рис. 5А).



**Рисунок 5.** Защитный эффект серотониновых производных лактонов 1.1, 2.1 и 4.1 в концентрации 1 мкМ при глутамат – индуцированной (100 мМ) (А) и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – индуцированной (50 мкМ) (Б) токсичности. Данные представлены в виде % данного процесса относительно контроля (ДМСО ≤ 1%): как среднее ± SEM. Статистически значимые результаты отмечены звездочкой. \* – p<0,05; \*\*\* – p<0,001; \*\*\*\* – p<0,0001 (однофакторный дисперсионный анализ с поправкой Даннета).

В совокупности эти данные свидетельствуют о наличии нейропротекторного потенциала серотониновых производных сесквитерпеновых лактонов. Их углубленное *in vitro* изучение позволило выявить 1.1, содержащее в своей структуре фармакофорные фрагменты изоалантолактона и серотонина, как соединение-лидер, проявляющее полифункциональное действие.

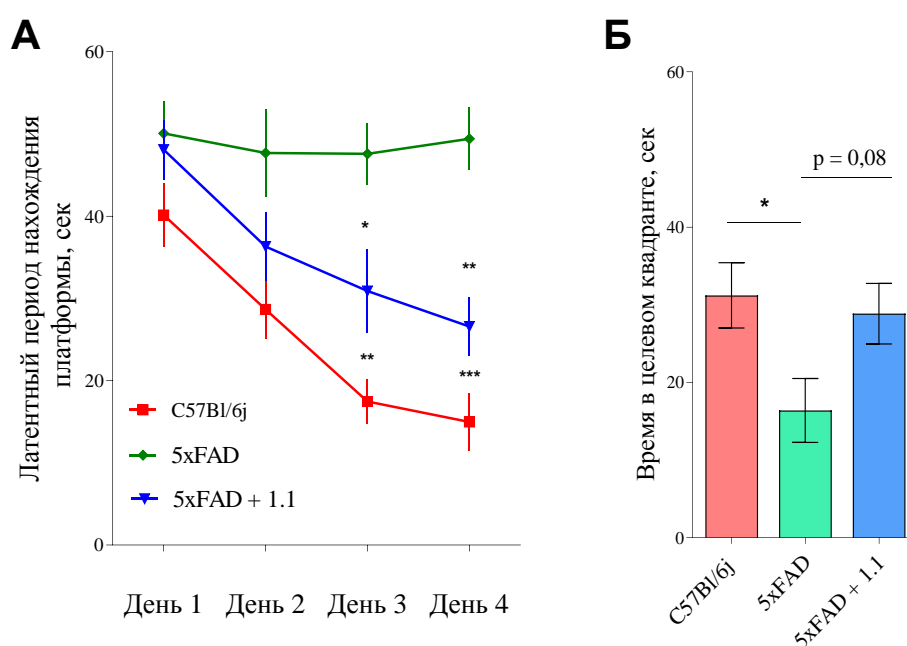
### **Оценка влияния серотонинового производного изоалантолактона на поведенческие характеристики и когнитивные функции животных, моделирующих БА**

Наблюдение и регистрацию токсического влияния 1.1 проводили на мышах дикого типа (линия C57Bl/6j) при внутрибрюшинном введении в различных концентрациях (максимум 100 мг/кг). В течение первых 30 минут после введения, затем с интервалами в 1 час в течение 4 часов, после чего один раз в день в течение 5 дней оценивали наличие клинических признаков. Патологических изменений в поведении животных после введения 1.1 не было зарегистрировано. Введение эквивалентного объема растворителя (10% ДМСО в NaCl) также не вызывало видимого токсического эффекта.

Тест открытое поле, являющийся одной из стандартных методик для оценки общего состояния нервной системы животных, позволяет оценить влияние на основные аспекты поведения, помогая выявить потенциальные нейропротекторы. Результаты, полученные нами в данном тесте, позволили сделать вывод, что

введение 1.1 в концентрации 15 мг/кг/день в течение 20 дней мышам 5xFAD, моделирующим БА, и животным линии C57Bl/6j не приводит к изменению общих поведенческих характеристик. Статистически значимых различий в показателях тревожности, двигательной активности, а также ориентировочно-исследовательского поведения мышей дикого типа и 5xFAD не было выявлено.

Влияние на обучение и пространственную память оценивали с помощью водного лабиринта Морриса, являющего одним из общепринятых методов для проведения нейроповеденческого тестирования. Данный тест позволяет определить воздействие на процессы формирования и консолидации памяти, нарушение которых отмечается при БА (рис. 6).



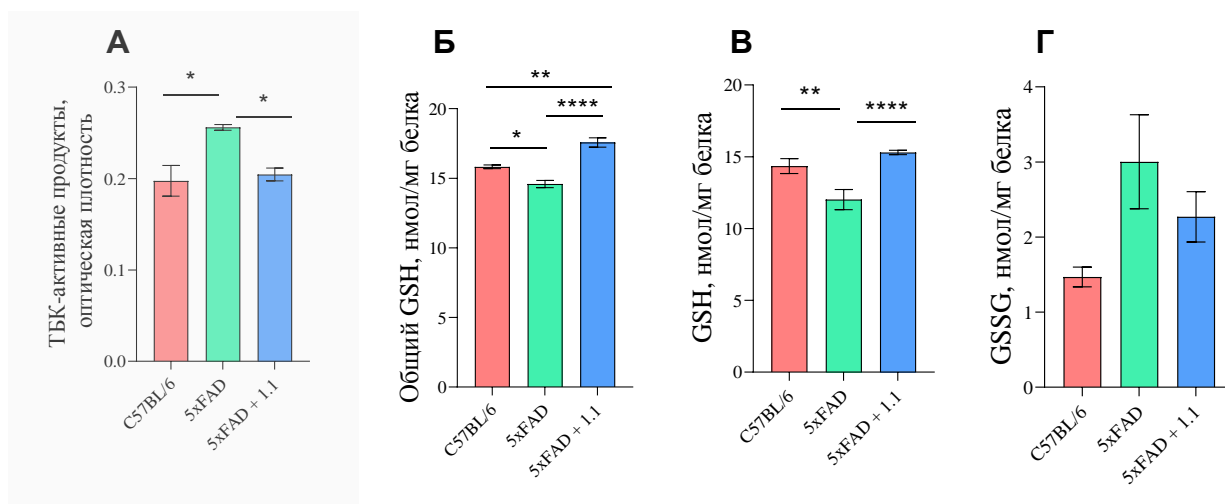
**Рисунок 6.** Влияние 1.1 на характеристики пространственного обучения и памяти у трансгенных животных 5xFAD в тесте водного лабиринта Морриса: **А** – время нахождения платформы в течение 4 дней. **Б** – время в целевом квадранте. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM (количество животных в каждой группе,  $n=8$ ). \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  и \*\*\*  $p \leq 0,001$  по сравнению с 1-м днем (А) и мышами C57Bl/6j и 5xFAD (Б) (однофакторный дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони).

Как видно из рисунка 6А, во время обучающих испытаний (1 – 4 день) в группах наблюдались значительные различия во времени латентного периода нахождения скрытой под водой платформы. Мыши 5xFAD на протяжении всего периода обучения тратили больше времени на нахождение платформы, что указывает на нарушения в процессах обучения и памяти у них. При этом разница во времени нахождения платформы между первым и последним днями обучения животные дикого типа и мышей 5xFAD, получавших 1.1 в концентрации 15 мг/кг/день, сильно снизилась.

На пятый день эксперимента фиксировали время, проведенное в целевом квадранте при отсутствии платформы (рис. 6Б). Было отмечено, что животные из группы 5xFAD проводят меньше времени в нужном секторе по сравнению с животными из контрольной группы. При введении 1.1 животным 5xFAD отмечена тенденция к увеличению времени пребывания в целевом квадранте по сравнению с группой 5xFAD. В целом, соединение 1.1 уменьшало нарушения обучения и дефицит памяти, характеризующие когнитивную дисфункцию, наблюдаемую в у трансгенных мышей 5xFAD, моделирующих БА.

### ***Ex vivo* определение влияния серотонинового производного изоалантолактона на окислительный стресс и митохондриальную дисфункцию в образцах головного мозга *post mortem***

По завершении *in vivo* экспериментов на мышах 5xFAD у всех тестируемых животных были взяты образцы головного мозга для оценки влияния 1.1 на окислительный статус по интенсивности процесса ПОЛ и содержанию глутатиона в гомогенате мозга. Как видно из рисунка 7А, у трансгенных животных наблюдался повышенный уровень конечных продуктов ПОЛ, в то время как у животных 5xFAD, получавших 1.1 в дозе 15 мг/кг/день в течение 20 дней, уровень ТБК-активных продуктов был значительно ниже.



**Рисунок 7.** Анализ *ex vivo* уровней МДА (А), общего (Б), восстановленного (В) и окисленного (Г) глутатиона в образцах мозга после экспериментов *in vivo*. Данные представлены в виде % данного процесса относительно контроля (ДМСО  $\leq$  1%): как среднее  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,01$  \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  (однофакторный дисперсионный анализ с поправкой Даннета).

Также оценено влияние 1.1 на уровень эндогенного антиоксиданта глутатиона, снижение которого наблюдается в головном мозге мышей 5xFAD (рис. 7А). Было установлено, что введение трансгенным мышам 1.1 повышает

уровень общего глутатиона по сравнению как с контролем ( $p \leq 0,01$ ), так и животными, не получавшими 1.1 ( $p \leq 0,0001$ ) (рис. 7Б). Для группы трансгенных мышей, получавшей 1.1, было отмечено повышение восстановленного глутатиона до уровня контроля (рис. 7В).

Наблюдаемое снижение уровня конечных продуктов ПОЛ и повышение уровня глутатиона в образцах головного мозга мышей 5xFAD после лечения 1.1 свидетельствует о высоком антиоксидантном потенциале серотонинового производного изоалантолактона и полностью согласуется с данными, полученными в *in vitro* исследовании.

## **Выводы**

1. Большинство триптаминовых производных сесквитерпеновых лактонов обладают высокой антиоксидантной и митопротекторной активностью. Их антиоксидантное действие связано со способностью напрямую нейтрализовать свободные радикалы и/или связывать ионы переходных металлов. Митопротекторное действие достигается за счет ингибирования их набухания, инициированного высокой концентрацией  $Ca^{2+}$ .
2. Все триптаминовые производные сесквитерпеновых лактонов влияют на амилоидогенный процесс, препятствуя агрегации  $\beta$ -амилоида и/или снижая активность фермента BACE1.
3. Серотониновые производные лактонов не влияют на выживаемость клеток НЕК-293, близких к здоровым, и нейрональноподобных клеток SH-SY5Y.
4. Соединение-лидер, серотониновое производное изоалантолактона, определенное при углубленном *in vitro* изучении, показывает митопротекторный эффект за счет стимуляции работы дыхательной цепи и препятствованию открытию митохондриальной поры. Также для него показан цитопротекторный эффект при  $H_2O_2$ - и глутамат-индуцированной нейротоксичности на клетках SH-SY5Y.
5. Серотониновое производное изоалантолактона способствует улучшению когнитивных функций мышей 5xFAD, моделирующих признаки БА.
6. Серотониновое производное изоалантолактона снижает уровень МДА и повышает уровни общего и восстановленного глутатиона в образцах головного мозга мышей 5xFAD *post mortem*.

## Список публикаций

1. Neganova M, Liu J, Aleksandrova Y, Vasilieva N, Semakov A, **Yandulova E**, Sukocheva O, Balakin K, Klochkov S, Fan R. Development of Neuroprotective Agents for the Treatment of Alzheimer's Disease Using Conjugates of Serotonin with Sesquiterpene Lactones. *Curr Med Chem*. 2022 Nov 25. doi: 10.2174/0929867330666221125105253.
2. Н. С. Николаева, **Е. Ю. Яндулова**, Ю. Р. Александрова, А. С. Стариков, М. Е. Неганова Патологическое взаимодействие  $\beta$ -амилоида и митохондрий: роль в возникновении и развитии болезни Альцгеймера. *Acta naturae* 2022; 3(54): 19-34. DOI: 10.32607/actanaturae.11723
3. **Яндулова Е.Ю.**, Неганова М.Е. Нейропротекторные свойства мультифункционального конъюгата изоалантолактона и серотонина / Сборник тезисов IX конференции Молодых Учёных ИФАВ РАН // Черноголовка, 2019 – с. 17.
4. **Е.Ю. Яндулова**, С.Г. Клочков, Ю.Р. Александрова, М.Е. Неганова. Конъюгаты сесквитерпеновых лактонов и аналогов триптамина: антиоксидантная и митопротекторная активности. Сборник тезисов докладов Шестой Междисциплинарная конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» под ред. К.В. Кудрявцева и Е.М. Паниной.– М.: «Перо», 2020. – с. 157
5. **Яндулова Е.Ю.**, Клочков С.Г., Семаков А.В., Романова Е.О., Неганова М.Е. Антиоксидантное и митопротекторное действие производных природного лактона сантонина. *Нейронаука для Медицины и Психологии*, 2020, - Судак, Крым, Россия, 3-13 июня 2020 года - с. 545.
6. **Яндулова Е.Ю.**, Александрова Ю.Р., Клочков С.Г., Неганова М.Е. Модулирующее действие триптаминовых производных сесквитерпеновых лактонов на важные звенья патогенеза болезни Альцгеймера/ Сборник тезисов X конференции Молодых Учёных ИФАВ РАН // Черноголовка, 2020 – с. 15.