

Создание гибридной наноструктуры на основе фуллерена C₆₀ и биологически активного вещества как один из путей моделирования физиологических свойств соединений*

Р. А. Котельникова,^{а*} В. В. Григорьев,^б А. В. Смолина,^а И. И. Файнгольд,^а Д. В. Мищенко,^а
Г. И. Ванькин,^б В. Л. Замойский,^б Д. А. Поletaева,^а Н. А. Маркова,^б В. С. Романова,^а
А. И. Котельников,^а Г. Алиев,^г С. О. Бачурин^б

^аИнститут проблем химической физики Российской академии наук,
Российская Федерация, 142432 Черноголовка Московской обл., просп. Акад. Семенова, 1
E-mail: kotel@icp.ac.ru

^бИнститут физиологически активных веществ Российской академии наук,
Российская Федерация, 142432 Черноголовка Московской обл., Северный проезд, 1

^вИнститут элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова Российской академии наук,
Российская Федерация, 119991 Москва, ул. Вавилова, 28

^гШкола науки о здоровье и здравоохранения, Университет Атланты,
США, Атланта, 6685 Промышленный бульвар Пичтри, GA 30360**.

Изучено действие когнитивно-стимулирующего вещества БД-2, относящегося к классу γ -карболинов, а также гибридного соединения на основе фуллерена C₆₀ (ГСФ) и присоединенного к нему БД-2 на различные аспекты поведения животных. Синтезированное ГСФ не обладает побочным психостимулирующим действием, характерным для БД-2, при этом полностью сохраняет свойства когнитивного стимулятора. Создание гибридных соединений на основе фуллерена C₆₀ и фармакологически активных группировок может являться одним из путей оптимизации терапевтически перспективных соединений.

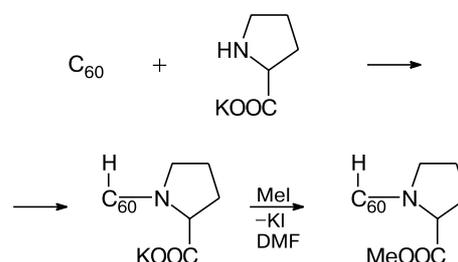
Ключевые слова: водорастворимые производные фуллеренов, антиоксидантная активность, глутаматные AMPA-рецепторы, когнитивные стимуляторы.

Известно, что фуллерены обладают уникальной пространственной и электронной структурой, обуславливающей их выраженные донорно-акцепторные и фотофизические свойства. При варьировании аддендов, присоединяемых к сфероиду фуллерена, производные фуллерена C₆₀ приобретают амфифильные и стереоспецифичные мембранотропные свойства, а также проявляют антиоксидантную и противовирусную активность^{1–3}. Благодаря этим свойствам фуллерен C₆₀, с одной стороны, рассматривается в химической фармакологии как носитель функциональных группировок, обладающих биологической активностью, а с другой, сам обладает нейропротекторной активностью⁴. N-(Моногидрофуллеренил)замещенные аминокислоты или пептиды⁵ — продукты эквимольного присоединения аминокислот или пептидов к фуллерену — составляют особый класс органических соединений, которые можно рассматривать

как потенциальные антиметаболиты определенного подкласса физиологически активных веществ.

Аминокислотные производные фуллерена C₆₀ (АПФ) были синтезированы, как описано в работе⁵ (схема 1).

Схема 1



Среди АПФ следует выделить фуллеренилпролин и его производные. Интерес представляет исследование влияния фуллеренового сфероида на ключевую роль производных пролина в определении направления сворачивания полипептидной цепи^{6,7}. Именно с этим свойством фуллеропрولين связана их биологическая активность, опосредованная ингибирован-

* Посвящается академику Российской академии наук Ю. Н. Бубнову в связи с его 80-летием.

** School of Health Science and Healthcare Administration, University of Atlanta, Atlanta, 6685 Peachtree Industrial Boulevard, GA 30360, USA.

нием цистеиновых и сериновых протеаз⁸. Поэтому создание на основе фуллеренов гибридных наноструктур для терапии нейродегенеративных заболеваний представляется перспективным. Такие наноструктуры являются продуктами присоединения к сфероиду фуллерена двух аддендов, одним из которых является аминокислота, обеспечивающая растворимость наноструктур в воде, а другим — вещество, обладающее нейротекторной и/или когнитивно-стимулирующей активностью и перспективного в качестве терапевтического препарата.

Экспериментальная часть

Все продукты синтеза, кроме производного пролина, представляют собой аморфные порошки, умеренно растворимые в воде ($C = 0.05\text{--}0.15 \text{ г} \cdot \text{дл}^{-1}$) с образованием ассоциатов, форма и количество которых зависит от гидрофильно-липофильного баланса аминокислотного производного фуллерена, величины рН и ионной силы раствора^{5,9}. Содержание в них аминокислот изучено методом ВЭЖХ⁹.

В ИК-спектрах полученных АПФ (таблетки с KBr) содержатся интенсивные полосы поглощения в области $1590\text{--}1620$ и $1350\text{--}1420 \text{ см}^{-1}$, относящиеся к асимметричным и симметричным валентным колебаниям карбоксильной группы (COO^- , $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$, $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$)¹⁰. Это доказывает наличие в молекуле АПФ цвиттер-ионной формы с ионизованной карбоксигруппой. Кроме того, для полученных таким образом АПФ в ИК-спектрах характерно наличие широких полос поглощения с максимумом около 3400 см^{-1} , иногда с плечом около 3200 см^{-1} . Они могут принадлежать валентным колебаниям связей N—H аммониевой группы в цвиттер-ионах или аминогруппы в неионизованной аминокислоте.

Характерной особенностью ИК-спектров АПФ является наличие трех полос поглощения: около 1108 (сильной интенсивности) и 960 и 840 см^{-1} (средней интенсивности). Эти полосы присутствуют в спектрах всех АПФ, причем их частоты и интенсивности мало зависят от структуры адденда в АПФ, что позволяет отнести их к колебаниям связей атомов адденда со сфероидом фуллерена ($\text{C}_{60}\text{--N}$ и $\text{C}_{60}\text{--H}$). Не вполне однозначно положение полосы валентных колебаний связи $\text{C}_{60}\text{--H}$ (гидрофуллеренил), поскольку после присоединения атома водорода к сфероиду гибридизация соответствующего атома углерода фуллерена меняется с sp^2 на sp^3 . Вполне вероятно, что с этим может быть связан наблюдаемый сдвиг полосы валентных колебаний $\nu(\text{C}_{60}\text{--H})$ в достаточно широкую область — $2900\text{--}2920 \text{ см}^{-1}$.

Совокупность аналитических данных о строении АПФ позволяет предполагать, что они являются продуктами моноприсоединения аминокислот к фуллерену — N-(моногидрофуллеренил)аминокислотами, а квантово-химические расчеты подтверждают это предположение¹¹. Известно, что водород в фрагменте C_{60}H производных фуллерена обладает протонной подвижностью¹², которая обусловлена электроотрицательностью сфероида фуллерена. Это определяет высокую поляризацию связи C—H и преимущественную направленность по ней реакций $\text{S}_{\text{E}}2$ электрофильного замещения, что подтверждено квантово-химическими расчетами¹³.

Замещение гидрофуллеренильного водорода значительно расширяет возможность направленного синтеза гибридных АПФ, ковалентно связанных с белками, пептидами, хромофорами и др. В этой работе атом водорода замещен

на биологически активное вещество, обладающее нейротекторной активностью, — гидрохлорид 2-метил-5-бензил-8-хлор-2,3,4,5-тетрагидро-1H-пиридо[4,3-b]индола (БД-2).

Определение интенсивности пероксидного окисления липидов мембран. Интенсивность пероксидного окисления липидов (ПОЛ) в гомогенате коры головного мозга крыс оценивали по содержанию малонового диальдегида (МДА) в 1 г ткани¹⁴. Для оценки влияния БД-2 и гибридного соединения на основе фуллерена C_{60} (ГСФ) на ПОЛ гомогената коры головного мозга крыс к 2.25 мл гомогената в K,Na-фосфатном буфере (рН 7.4) добавляли 0.25 мл ГСФ в концентрации 10^{-4} моль \cdot л⁻¹ (в том же буфере) до получения конечной концентрации соединения в пробе 10^{-5} моль \cdot л⁻¹ и инкубировали 30 мин при 37 °С. К полученному образцу добавляли 1 мл 17%-ной трихлоруксусной кислоты и центрифугировали 10 мин при 3000 g. К пробам (2 мл супернатанта) добавляли 1 мл 0.8%-ной тиобарбитуровой кислоты, инкубировали на водяной бане 30 мин при 100 °С, затем охлаждали до комнатной температуры и регистрировали оптическую плотность при длине волны 532 нм.

Концентрацию МДА рассчитывали по формуле $K = (A_1 - A_2)/\epsilon$, где K — концентрация МДА, A_1 и A_2 — оптическая плотность опытного образца и буферного раствора соответственно, ϵ — молярный коэффициент экстинкции, равный $1.56 \cdot 10^5 \text{ л} \cdot (\text{моль} \cdot \text{см})^{-1}$. Полученное значение делили на массу ткани (кора головного мозга крыс), из которой готовили гомогенат.

Определение активности моноаминоксидаз А и В (MAO-A и MAO-B). Ферментативную активность MAO-A и MAO-B в суспензии митохондрий гомогената коры мозга крыс определяли по известной методике¹⁵, основанной на спектрофотометрическом определении количества аммиака, выделяющегося в результате ферментативной реакции дезаминирования биогенных аминов серотонина и бензиламина мембраносвязанными ферментами MAO-A и MAO-B. К пробе суспензии митохондрий, содержащей 5 мг белка, добавляли субстрат в конечной концентрации 10^{-3} моль \cdot л⁻¹, 0.2 мл исследуемых соединений в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ моль \cdot л⁻¹ (конечная концентрация в пробе 10^{-5} моль \cdot л⁻¹) и доводили объем 0.1 M K,Na-фосфатным буфером (рН 7.4) до 1 мл. Пробы инкубировали при 37 °С в течение 1 ч, после чего реакцию субстратного взаимодействия останавливали добавлением 0.1 мл 50%-ной трихлоруксусной кислоты и центрифугировали при 4500 g в течение 20 мин. Супернатант помещали в пробирки, для подщелачивания среды в образцы добавляли по 2 мл насыщенного раствора K_2CO_3 , закрывали притертой пробкой со стеклянной палочкой внутри, на конце которой находилась одна капля 0.5 M серной кислоты, и выдерживали при комнатной температуре. Через 12 ч палочки с капельками, содержащими сульфат аммония (выделившийся в результате реакции нейтрализации), помещали в 4.5 мл дистиллированной воды. В пробирки добавляли по 0.5 мл реактива Несслера и через 30 мин регистрировали оптическую плотность растворов на спектрофотометре «Specord M40» (Германия) при $\lambda = 430 \text{ нм}$. По калибровочному графику определяли концентрацию выделившегося аммиака. Полученное значение соответствовало активности фермента. Для определения удельной активности это значение делили на количество белка в образце. Количество белка определяли по методу Лоури¹⁶.

Влияние ГСФ и БД-2 на AMPA-рецепторы. Электрофизиологическим методом «patch-clamp» изучено действие ГСФ и БД-2 на AMPA-рецепторы (AMPA — α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота), подтип глутаматных рецепторов центральной нервной систе-

мы млекопитающих¹⁷. Одиночные изолированные нейроны Пуркинье выделяли из мозжечков крыс породы Вистар в возрасте 12–16 суток по модифицированному методу Канада¹⁸. Срезы мозжечка толщиной 400–600 мкм помещали в термостатируемую камеру объемом 10 мл в раствор следующего состава: 150 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ CaCl₂, 2 мМ MgSO₄·7 H₂O, 10 мМ буфера «HEPES», 15 мМ глюкозы (рН 7.42), — и инкубировали при 34 °С. Через 60 мин буфер заменяли на аналогичный раствор, но содержащий проназу (2 мг·мл⁻¹), коллагеназу (1 мг·мл⁻¹), и инкубировали в течение 70 мин при 34 °С. После отмывки исходным буфером в течение 20 мин срезы помещали в чашку Петри и разбедили механическим способом при помощи пастеровской пипетки. Растворы во время выделения нейронов непрерывно продували 100%-ным O₂ при 34 °С. Исследуемые нейроны помещали в рабочую камеру объемом 0.6 мл в буфер А (рН 7.36) следующего состава: 150 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2.6 мМ CaCl₂, 2 мМ MgSO₄·7H₂O, 10 мМ буфера «HEPES», 15 мМ глюкозы.

Трансмембранные токи вызваны активацией АМРА-рецепторов путем аппликации растворов агониста этих рецепторов — каиновой кислоты — методом быстрой суперфузии растворов: в буфер, омывающий нейроны с постоянной скоростью, каждые 2 мин вносили по 30 мкл буфера с агонистом (концентрацию агониста изменяли в диапазоне 10⁻⁴–10⁻³ моль·л⁻¹). Регистрацию токов осуществляли при помощи боросиликатных микроэлектродов (сопротивление 2.5–5.5 МОм), заполненных буфером (рН 7.2) следующего состава: 140 мМ CsCl, 11 мМ этиленгликоль-бис-(2-аминоэтиловый эфир)-*N,N,N,N*-тетрауксусной кислоты, 1 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 10 мМ буфера «HEPES», 5 мМ аденозинтрифосфата.

Для исследования влияния ГСФ на АМРА-рецепторы буфер А, омывающий нейроны, заменяли на такой же, но содержащий исследуемые соединения в концентрациях 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷ и 10⁻⁶ моль·л⁻¹.

Для регистрации использовали прибор «ЕРС-9» («НЕКА», Германия). Регистрацию токов осуществляли на компьютере при помощи лицензионной программы Pulse («НЕКА»). Результаты обрабатывали по программе Pulsefit («НЕКА»).

Изучение поведенческих эффектов БД-2 и ГСФ на лабораторных животных на установке «TruScan». Цель данного исследования — сравнительное изучение влияния БД-2 и ГСФ на двигательную активность мышей, осуществляемое в тесте «открытое поле».

Исследовательская модель, выбранная для достижения поставленной задачи, обладает высокой информативностью и великолепно подходит для первичной оценки психотропной активности новых химических соединений. Модификация теста «открытое поле»¹⁹ проходила в условиях автоматизированной установки мониторинга двигательной активности и ориентировочного поведения животных в фотосенсорной установке «TruScan» («Coulbourn», США).

Установка «TruScan» представляет собой квадратную камеру с основанием 30×30 см, выполненную из прозрачного органического стекла, с высотой стен 35 см. Пол серого цвета условно разделен на 64 квадрата и имеет 16 отверстий диаметром 20 мм. Данная компьютеризированная система позиционирования позволяет отслеживать движение животного в трех осях. Это дает возможность выявить 62 параметра локомоторной активности животного и позволяет определить активность химического соединения сразу по нескольким аспектам поведения мышей, из которых было выделено четыре основных: двигательная активность, тревожность, ориентировочное поведение, исследовательская реакция.

Перед экспериментом, за 1 ч, мышей переносили в экспериментальную комнату. Исследуемое вещество вводили за 1 ч до тестирования. После этого животных помещали в левый дальний угол установки «TruScan», где в течение 3 мин регистрировали показатели вертикальной и горизонтальной двигательной активности. Интенсивность освещения опытной камеры составляла 130 лк на уровне пола. Параметры локомоторной функции мышей оценивали по следующим 14 показателям: общее количество движений, двигательная активность (с), неподвижный момент (с), дистанция движения (см), скорость движения (см·с⁻¹), дистанция в периметре (см), время в периметре (с), дистанция в центре (см), время в центре (с), количество посещений центра, количество вертикальных стоек, время стоек (с), количество обследованных отверстий, время норкового рефлекса (с). Такой широкий набор показателей позволяет в полной мере оценить установленные в данной работе параметры двигательной активности мышей.

Психотропная активность исследуемого вещества представлена в диаграммах в виде процента отклонения (*D*) от показателей группы контроля, который рассчитывали по формуле $D = (M_1 - M_2)/M_1 \cdot 100\%$, где *M* — средняя величина параметра по группе (*M*₁ — опыт, *M*₂ — контроль).

Исследуемые вещества вводили в диапазоне доз от 0.001 до 0.1 мг·кг⁻¹ внутривенно из расчета 0.1 мл раствора на 10 г массы тела.

Статистическую обработку данных проводили с помощью стандартной программы Statistica 6.0, уровень достоверности определяли по *t*-критерию Стьюдента.

Изучение влияния БД-2 и C₆₀-P₆₀—BD-2 на память животных в тесте «узнавание новой локализации известного объекта». Тест узнавания объекта основан на том факте, что и крысы, и мыши спонтанно обследуют новый объект или новую локализацию объекта больше времени, чем известный объект или известную локализацию объекта. Этот тест впервые был применен на крысах²⁰. В дальнейшем различными исследователями было показано, что он также пригоден для тестирования памяти узнавания у мышей²¹.

Экспериментальная установка представляет собой камеру наблюдения, изготовленную из непрозрачного органического стекла белого цвета размером 48×38×30 см. В качестве объектов обследования использовали стеклянные флаконы коричневого цвета диаметром 2.7 см и высотой 5.5 см. За 2–3 мин до помещения животного камеру и объекты обследования протирали 85%-ным спиртом. Животных всегда помещали в центр камеры.

Ознакомление с поведенческой камерой. В первый день мышей приносили в исследовательскую комнату и акклиматизировали в течение 20–30 мин. После этого каждое животное помещали на 10 мин в пустую, предварительно обработанную спиртом поведенческую камеру для ознакомления. Затем животное убирали в клетку и уносили в виварий.

Тренировка. На следующий день этих же мышей приносили в исследовательскую комнату, акклиматизировали 20–30 мин и затем вводили внутривенно раствор исследуемого вещества. Через 1 ч после введения вещества животное помещали в поведенческую камеру, на дно которой по диагонали на расстоянии 14.5 см от углов ставили два одинаковых объекта (стеклянные флаконы) для узнавания. Длительность тренировки каждого животного — 15 мин. Через 15 мин его убирали в клетку и возвращали в виварий.

Тестирование проводили через 48 ч после тренировки. Для этого после акклиматизации животное помещали на 1 мин в камеру для повторного ознакомления. Через 1 мин его убирали и на дно камеры ставили один объект в известной

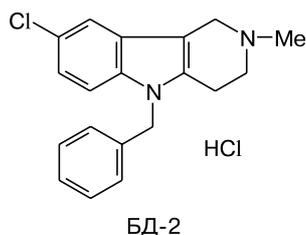
для животного локализации, а другой объект — в новой. С помощью двух электронных секундомеров регистрировали (с точностью до 0.1 с) время обследования отдельно каждого объекта в течение 10 мин. За поведением животных наблюдали через зеркало. В качестве положительной реакции обследования объекта считали целенаправленное приближение носа животного к объекту на расстояние 2 см или непосредственное касание объекта носом.

Экспериментальные животные — мыши-самцы линии C57Bl/6. Перед проведением опытов животные были помещены в двухнедельный карантин. Мышей содержали в стандартных условиях вивария в свободном доступе к пище и воде, при 12-часовом световом цикле (8.00—20.00). На момент выполнения эксперимента масса тела мышей составляла 22—24 г. Экспериментальные группы, одной из которых была группа контрольных животных, формировали по 10 особей.

Статистическая обработка результатов. В связи с тем, что в данном тесте наблюдаются значительные колебания времени обследования объектов между животными, мы вычислили процент времени обследования для каждой мыши по формуле $t_1/(t_1 + t_2) \cdot 100\%$, где t_1 — время обследования объекта в новой локализации, t_2 — время обследования объекта в известной локализации. За 100% принимали общее время, затраченное на обследование двух объектов. Дальнейшую обработку результатов проводили по методу Стьюдента с использованием t -теста.

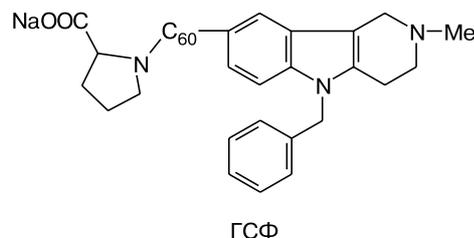
Обсуждение полученных результатов

В последнее время в области нейрофармакологии значительный интерес для исследователей представляет антигистаминный препарат димебон, который на второй стадии клинических испытаний на людях, страдающих болезнью Альцгеймера, проявил сильный терапевтический эффект²². Несмотря на то что на третьей фазе испытаний клинический эффект димебона был нивелирован необычно высоким терапевтическим эффектом плацебо²³, вопрос о возможности терапевтического применения этого препарата снова стал актуальным после открытия в 2012 г. способности препарата стимулировать аутофагию и нейрогенез^{24–26}. Недавно было получено несколько высокоактивных аналогов димебона, имеющих хорошие фармакологические перспективы. В частности, бензильные аналоги, к которым относится препарат БД-2, проявляют нейротропные свойства и предложены в качестве основы для создания перспективных нейропротекторных агентов²⁷.



Значительный интерес в плане оптимизации фармакологических свойств подобных соединений представляет создание гибридных препаратов на их основе с использованием различных наноструктур.

В рамках настоящей работы изучены некоторые аспекты молекулярных механизмов нейропротекторного, в частности когнитивно-стимулирующего, действия гибридной фуллереновой наноструктуры, полученной путем присоединения к фуллереновому сфероиду двух аддендов. В качестве одного из аддендов использовали модельную аминокислоту пролин (Pro) для придания растворимости производному, в качестве второго — соединение БД-2.



Ранее нами было показано²⁸, что гибридные структуры на основе фуллерена C_{60} с присоединенными NO_2 -группами или антиоксидантами проявляют когнитивно-стимулирующее действие как *in vitro*, так и *in vivo*. При этом эффективность производных фуллеренов была значительно выше, чем эффективность присоединенных биологически активных группировок, однако ГСФ практически не обладали токсичностью. В данной работе в качестве биологически активного соединения (модулятора когнитивно-стимулирующей активности) был выбран нейропротектор БД-2, синтезированный по известной методике^{29,30}.

Известно, что важными механизмами реализации нейропротекторных свойств соединений является их способность проявлять антиоксидантную активность и влиять на каталитические свойства одного из ключевых ферментов моноаминэргической нейротрансмиссии — моноаминоксидазы^{3,31}. Поэтому в данной работе была также проведена сравнительная оценка

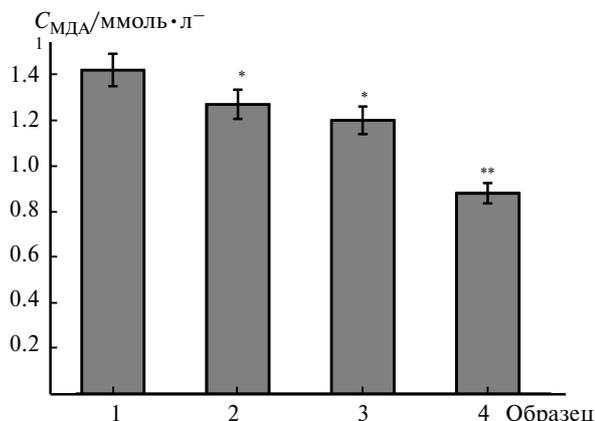


Рис. 1. Содержание малонового диальдегида в гомогенате головного мозга крыс при действии исследуемых соединений в концентрации $2 \cdot 10^{-5}$ моль \cdot л $^{-1}$: 1 — контроль, 2 — БД-2, 3 — C_{60} -Pro, 4 — C_{60} -Pro-БД-2. Знаками * и ** отмечены результаты при $p < 0.05$ и $p < 0.01$ относительно контроля соответственно.

влияния БД-2 и ГСФ на перекисное окисление липидов и каталитическую активность MAO-A и MAO-B.

Антиоксидантную активность ГСФ и БД-2 оценивали по изменению содержания МДА в гомогенатах головного мозга крыс (рис. 1). Видно, что ГСФ C_{60} —Pro—БД-2 уменьшает концентрацию МДА. При этом само соединение БД-2, как и C_{60} —Pro, обладает антиоксидантной активностью, однако наиболее эффективным ингибитором ПОЛ является ГСФ.

Влияние ГСФ и БД-2 на каталитическую активность MAO-A и MAO-B. На рисунке 2 приведены результаты изучения влияния исследуемых соединений на каталитическую активность MAO-A и MAO-B. Установлено, что добавление ГСФ увеличивает каталитическую активность MAO-A, тогда как соединение БД-2, в отличие от ГСФ, ингибирует фермент. Поскольку в центральной нервной системе основная физиологическая функция MAO-A заключается в дезаминировании таких нейромедиаторных аминов, как адреналин, норадреналин и серотонин, то изменение активности MAO-A в присутствии этих препаратов свидетельствует о противоположном влиянии их на процессы передачи нервного возбуждения³².

Как известно, MAO-B является ключевым ферментом дофаминовых рецепторов, и его ингибирование позволяет пролонгировать эффекты синаптического дофамина, чем и обосновывается использование ингибиторов MAO-B при терапии нейродегенеративных заболеваний³³. Как видно из рисунка 2, гибридная структура C_{60} —Pro—БД-2 ингибирует MAO-B. Можно предположить, что этот эффект достигается преимущественно за счет фармакофора БД-2, так как ингибирующий эффект ГСФ совпадает с эффектом действия на MAO-B соединения БД-2. При этом гибридная структура активирует MAO-A и не оказывает психостимулирующего эффекта на животных, в отличие от БД-2, ингибирующего MAO-A.

Влияние ГСФ и БД-2 на AMPA-рецепторы. Эксперименты были проведены на одиночных изолирован-

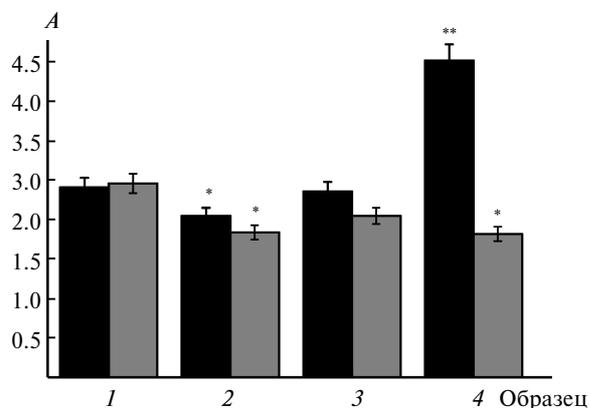


Рис. 2. Значение каталитической активности ($A/\text{ммоль NH}_3 \cdot \text{мг}^{-1}$ белка) MAO-A (темные столбцы) и MAO-B (светлые столбцы) в митохондриях головного мозга крыс при действии исследуемых соединений в концентрации $2 \cdot 10^{-5}$ моль \cdot л $^{-1}$: 1 — контроль, 2 — БД-2, 3 — C_{60} —Pro, 4 — C_{60} —Pro—БД-2. Знаками * и ** отмечены результаты при $p < 0.05$ и $p < 0.01$ относительно контроля соответственно.

ных нейронах Пуркинью, выделенных из мозжечка головного мозга крыс ($n = 5$). Аппликация каиновой кислоты вызывала генерацию входящих трансмембранных токов, вызванных активацией AMPA-рецепторов. Добавление в омывающий нейрон раствор соединения БД-2 или гибридной структуры C_{60} —Pro—БД-2 вызывало концентрационно-зависимое изменение амплитуды токов по сравнению с контролем, в то время как добавление C_{60} —Pro не влияло на амплитуду. Опыты с каждой концентрацией повторяли трижды. Результаты экспериментов представлены на рисунке 3. Исследование показало, что действие

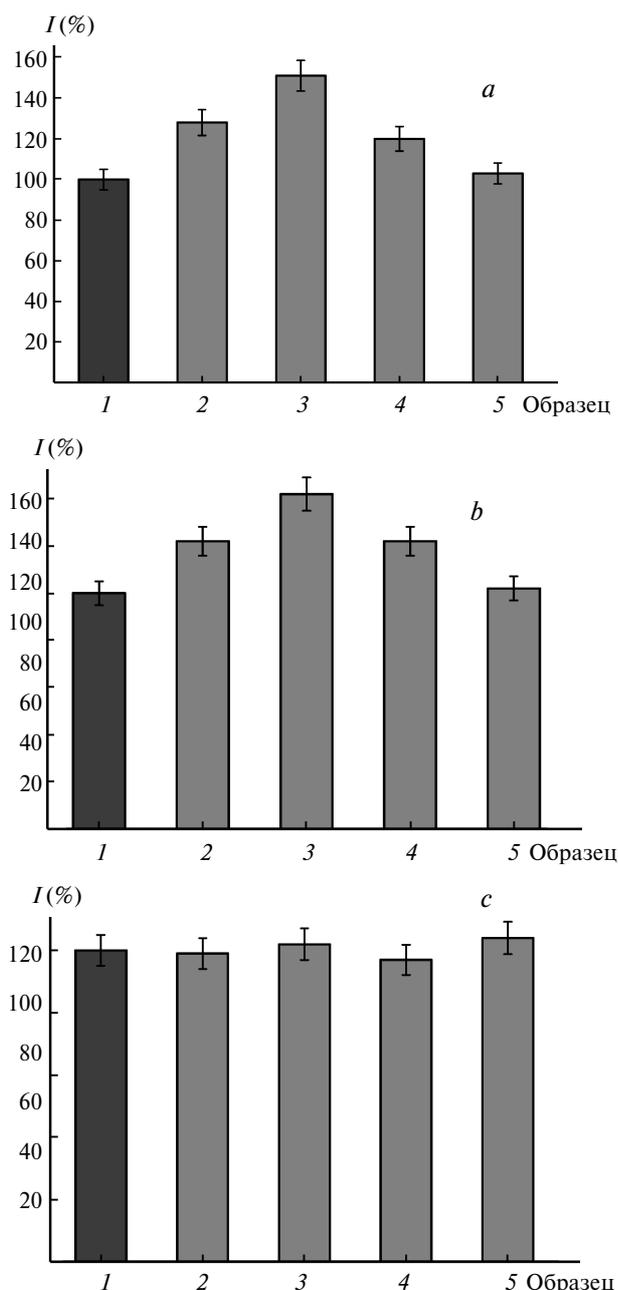


Рис. 3. Действие БД-2 (a), C_{60} —Pro—БД-2 (b) и C_{60} —Pro (c) на амплитуду каинат-вызванных токов (I (%)) AMPA-рецепторов клеток Пуркинью мозжечка крыс в различных концентрациях: 1 — контроль, 2 — 10^{-9} , 3 — 10^{-8} , 4 — 10^{-7} , 5 — 10^{-6} моль \cdot л $^{-1}$.

ГСФ на амплитуду токов АМРА-рецепторов практически не отличается от действия самого БД-2.

Влияние ГСФ и БД-2 на двигательную активность. Введение вещества БД-2 приводит к достоверному увеличению пройденного мышами пути за 3 мин тестирования, другими словами, оказывает на животных стимулирующее действие. Введение ГСФ не вызывает аналогичного стимулирующего эффекта, в отличие от БД-2 (рис. 4).

Уровень тревожности мышей. Экспериментальная модель «открытое поле» позволяет оценить степень тревожности животных по проведенному ими времени в условном центре поведенческой камеры. Соединение БД-2 в дозах 0.1 и 0.05 мг·кг⁻¹ достоверно увеличивает время нахождения в центре на 68 и 93% соответственно. Такое поведение мышей может свидетельствовать о снижении уровня их тревоги³⁴. При введении исследуемого ГСФ в аналогичных с БД-2 дозировках достоверных отклонений данного показателя не наблюдалось (рис. 5).

Исследовательское и ориентировочное поведение. Ориентировочное поведение как показатель эмоционального состояния оценивали по количеству вертикальных стоек мышей. Введение БД-2 в дозах 0.1 и 0.05 мг·кг⁻¹ приводит к увеличению числа вертикальных стоек. В отличие от ориентировочного поведения, исследовательская реакция, которая проявля-

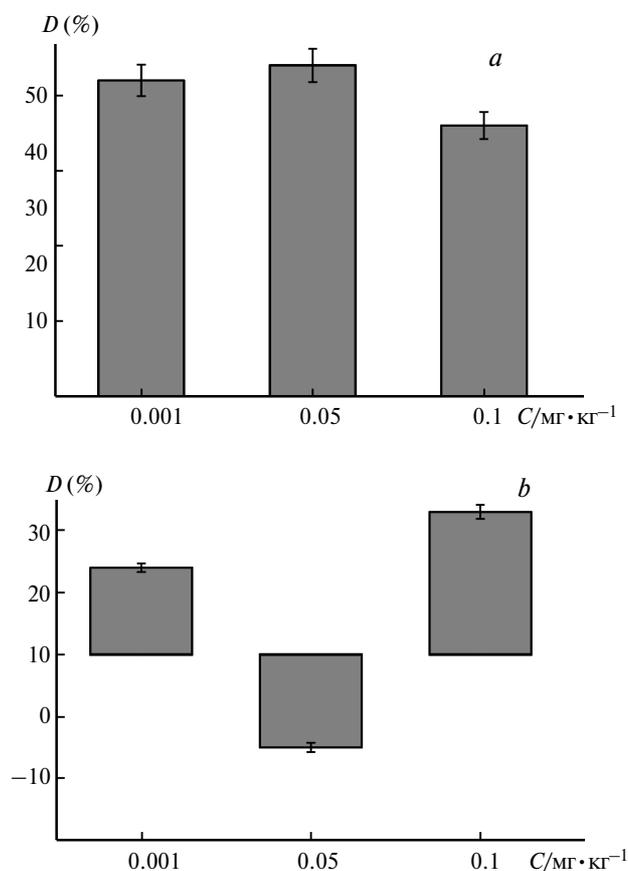


Рис. 4. Действие БД-2 (a) и C₆₀-Pro-БД-2 (b) на двигательную активность мышей (выражена через дистанцию, пройденную животными (отклонение от контроля, D)).

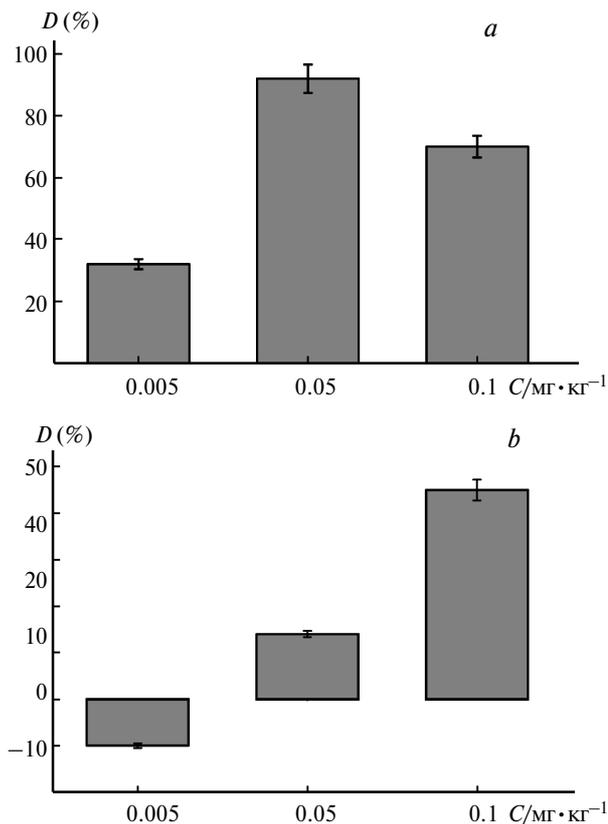


Рис. 5. Действие БД-2 (a) и C₆₀-Pro-БД-2 (b) на уровень тревожности мышей (отклонение от контроля, D).

ется в количестве исследованных отверстий в полу исследовательской камеры, не изменяется под воздействием соединения БД-2. После введения ГСФ изменений в исследовательской реакции и ориентировочном поведении мышей не происходило (рис. 6).

Влияние ГСФ и БД-2 на память животных. В поведенческих экспериментах мы исследовали действие соединений БД-2, C₆₀-Pro и ГСФ C₆₀-Pro-БД-2 в дозах 0.001, 0.05 и 0.1 мг·кг⁻¹. Было показано, что при тестировании через 48 ч после тренировки в контрольной группе мыши обследуют объект 48.1±7.9% времени в известной локализации и 51.9±7.9% времени — в новой ($p = 0.17$), т.е. они не помнят, где располагались объекты во время тренировки. В отличие от контроля, животные, которым вводили соединения БД-2 и ГСФ в дозах 0.01 и 0.001 мг·кг⁻¹, затрачивали на обследование объекта в новой локализации достоверно большее время. Это указывает на то, что оба вещества практически одинаково улучшают память животных, причем доза 0.001 мг·кг⁻¹ показала более высокую достоверность отличий от контроля, чем доза 0.01 мг·кг⁻¹. Введение животным C₆₀-Pro не оказывало влияние на память животных (рис. 7).

Полученные результаты позволяют сделать некоторые предварительные выводы. Присоединение C₆₀-Pro к БД-2, по-видимому, не влияет на его взаимодействие с АМРА-рецепторами, поскольку потенцирующее действие БД-2 и ГСФ C₆₀-Pro-БД-2 на каинат-активируемые токи практически одинаково, а C₆₀-Pro на амплитуду токов не влияет

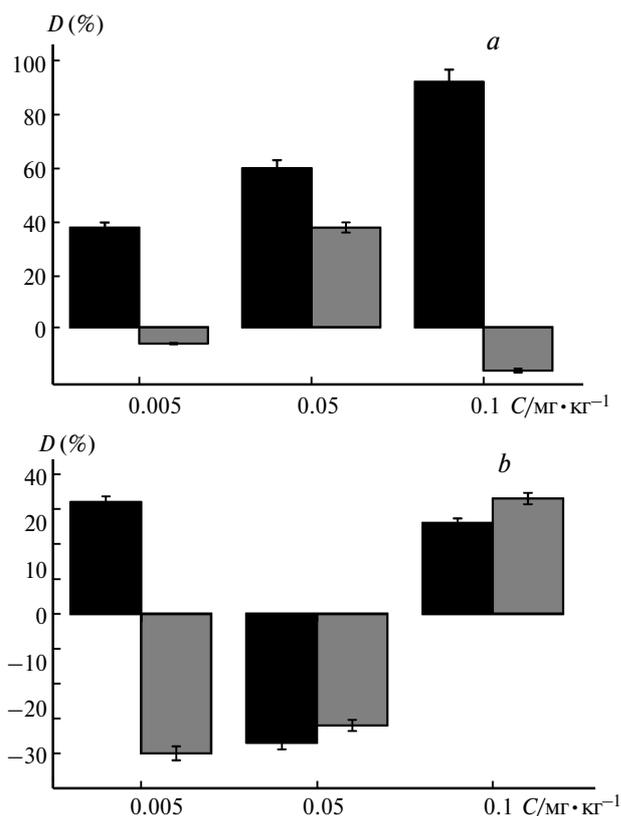


Рис. 6. Действие БД-2 (а) и С₆₀—Про—БД-2 (б) на исследовательское и ориентировочное поведение мышей (отклонение от контроля, *D*). Темные столбцы — количество вертикальных стоек, светлые столбцы — количество обследованных отверстий.

во всем исследованном диапазоне концентраций. Можно предположить, что именно вследствие неизменности этого показателя также не изменяется и действие ГСФ на память животных в поведенческих экспериментах по сравнению с БД-2. Данные результаты хорошо согласуются с установленным фактом, что потенциация АМРА-рецепторов приводит к улучшению памяти³². В то же время меняются некоторые другие аспекты поведения при действии ГСФ, на которые оказывало влияние соединение БД-2. Так, исчезло психостимулирующее действие БД-2, проявляющееся в увеличении двигательной активности, которую не вызывает С₆₀—Про—БД-2 (см. рис. 4). Влияние БД-2 на эмоциональное состояние животных заключалось в усилении ориентировочного поведения (определяемого по числу стоек, совершаемых животными), но такой эффект отсутствовал у ГСФ. Исследовательское поведение не менялось при действии ни самого БД-2, ни ГСФ (см. рис. 6).

Изменился и ряд других показателей. При введении БД-2 увеличивалось время, проведенное мышью в центре камеры, что указывало на снижение уровня тревожности у животных. Соединение С₆₀—Про—БД-2 уже не обладает такими свойствами, хотя тенденция к уменьшению тревожности сохранилась и для ГСФ при максимально высокой из исследованных дозе (0.1 мг·кг⁻¹), однако это действие уже не имеет уровня достоверности (см. рис. 5).

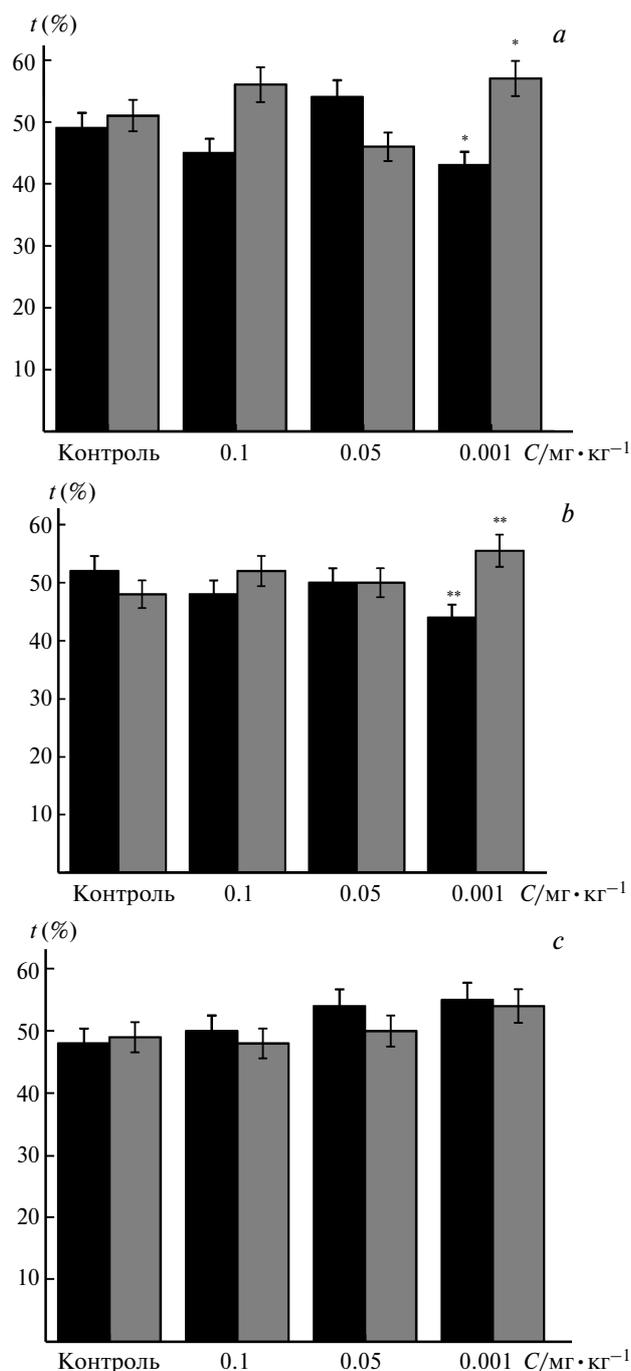


Рис. 7. Действие БД-2 (а), С₆₀—Про—БД-2 (б) и С₆₀—Про (с) на пространственную память мышей. Темные столбцы — известная локализация, светлые столбцы — новая локализация, *t* — время обследования объекта. Знаками * и ** отмечены результаты при $p < 0.05$ и $p < 0.01$ относительно контроля соответственно.

Полученные результаты показали, что при действии на поведение животных гибридной структуры на основе фуллера и когнитивно-стимулирующего вещества БД-2 появились некоторые новые свойства, которые не были характерны для БД-2. Во-первых, исчезло психостимулирующее действие, свойственное для БД-2 и проявляющееся в усилении как локомоторной активности, так и эмоционального (ориентировочного) поведения, и которое в данном случае

можно рассматривать как нежелательное побочное действие БД-2. Во-вторых, снизился противотревожный эффект гибридной структуры по сравнению с БД-2. Самое существенное, что на фоне этих изменений главные когнитивно-стимулирующие свойства исходного соединения сохранились.

Таким образом, включение производного γ -карболина БД-2, обладающего когнитивно-стимулирующими свойствами в комплекс с модифицированным фуллереном C_{60} —Prго позволило получить гибридную структуру (ГСФ), сохранившую высокие когнитивно-стимулирующие свойства, но при этом избавиться от побочного психостимулирующего действия этого вещества. По-видимому, это связано с увеличением активности моноаминоксидазы А при добавлении гибридного соединения. Действие ГСФ на АМРА-рецепторы мозга практически идентично действию исходного соединения БД-2. Предложенный в данной работе подход к модификации структуры исходного фармакофора (БД-2) путем присоединения его к модифицированному фуллерену позволил существенным образом улучшить его фармакологический профиль.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 12-04-31678 мол_а) и Президиума Российской академии наук (программа фундаментальных исследований № 21).

Список литературы

1. R. A. Kotelnikova, A. I. Kotelnikov, G. N. Bogdanov, V. S. Romanova, E. F. Kuleshova, M. E. Vol'pin, *FEBS Lett.*, 1996, **389**, 111.
2. Г. Н. Богданов, Р. А. Котельникова, Е. С. Фрог, В. Н. Штолько, В. С. Романова, Ю. Н. Бубнов, *Докл. АН*, 2004, **396**, 401 [*Dokl. Chem. (Engl. Transl.)*, 2004, **396**].
3. P. J. Krustic, E. Wasserman, P. N. Keizer, J. R. Morton, K. F. Preston, *Science*, 1991, **254**, 1183.
4. I. Y. Podolski, Z. A. Podlubnaya, E. A. Kosenko, E. A. Mugantseva, E. G. Makarova, L. G. Marsagishvili, M. D. Shpagina, Y. G. Kaminsky, G. V. Andrievsky, V. K. Klochkov, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2007, **7**, 1479.
5. M. E. Vol'pin, V. S. Romanova, Z. N. Parnes, *Mol. Cryst. Liq. Cryst. Sci. Technol., Mol. Mat., Sec. C*, 1996, **7**, 53.
6. C. Toniolo, A. Bianco, M. Maggini, G. Scorrano, M. Prato, M. Marastoni, R. Tomatis, S. Spisani, G. Palú, E. D. Blair, *J. Med. Chem.*, 1994, **37**, 4558.
7. Е. М. Белавцева, Е. В. Киченко, В. С. Романова, З. Н. Парнес, М. Е. Вольпин, *Изв. АН. Сер. хим.*, 1996, 876 [E. M. Belavtseva, E. V. Kichenko, V. S. Romanova, Z. N. Parnes, M. E. Vol'pin, *Russ. Chem. Bull. (Engl. Transl.)*, 1996, **45**, 831].
8. R. Sijbesma, G. Srdanov, F. Wudl, J. A. Castoro, C. Wilkins, S. H. Friedman, D. L. DeCamp, G. L. Kenyon, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 6510.
9. Г. И. Тимофеева, Е. Ф. Кулешова, В. С. Романова, *Изв. АН. Сер. хим.*, 1997, 493 [G. I. Timofeeva, E. F. Kuleshova, V. S. Romanova, *Russ. Chem. Bull. (Engl. Transl.)*, 1997, **46**, 472].
10. Z. S. Klemenkova, V. S. Romanova, V. A. Tsyryapkin, V. E. Muradan, Z. N. Parnes, B. V. Lokshin, M. E. Vol'pin, *Mendeleev Commun.*, 1996, **6**, 60.
11. В. Б. Лужков, В. С. Романова, А. И. Котельников, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2014, 567 [V. B. Luzhkov, V. S. Romanova, A. I. Kotelnikov, *Russ. Chem. Bull. (Int. Ed.)*, 2014, **63**, 567].
12. R. Taylor, D. R. Walton, *Nature*, 1993, **363**, 685.
13. Т. Ю. Долинина, В. Б. Лужков, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2012, 1614 [T. Yu. Dolinina, V. B. Luzhkov, 2012, **61**, 1631].
14. В. Г. Артюхов, М. А. Наквасина, *Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами*, Изд-во Воронеж. ун-та, Воронеж, 2000, с. 232—234.
15. I. V. Vergyovkina, M. M. Samed, V. Z. Gorkin, *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, **258**, 56.
16. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 265.
17. O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, F. J. Sigworth, *Pflugers Arch.*, 1981, **391**, 85.
18. M. Kaneda, H. Nakamura, N. Akaike, *Neurosci. Res.*, 1988, **5**, 299.
19. H. K. Gershenfeld, P. E. Neumann, C. Mathis, J. N. Crawley, X. Li, S. M. Paul, *Behavior Genetics.*, 1997, **27**, 201.
20. A. Ennaceur, J. Delacour, *Behav. Brain Res.*, 1988, **31**, 47.
21. J. C. Dodart, C. Mathis, A. Ungerer, *NeuroReport.*, 1997, **8**, 1173.
22. R. S. Doody, S. I. Gavrilova, M. Sano, R. G. Thomas, P. S. Aisen, S. O. Bachurin, L. Seely, D. Hung, *Lancet*, 2008, **372**, 207.
23. <http://investors.meditation.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=448818> (дата обращения 25. 04. 2013).
24. И. В. Хританкова, М. С. Кухарский, О. А. Лыткина, С. О. Бачурин, Б. Ю. Шорнинг, *Докл. АН*, 2012, **446**, 471 [*Dokl. Chem. (Engl. Transl.)*, 2012, **446**].
25. S. H. Eckert, J. Eckmann, K. Renner-Sattler, G. P. Eckert, K. Leuner, W. E. Mueller, *J. Alzheimer Dis.*, 2012, **31**, 21.
26. J. W. Steele, S. Gandy, *Autophagic Punctum.*, 2013, **9**, 617.
27. A. V. Ivachtchenko, E. B. Frolov, O. D. Mitkin, V. M. Kysil, A. V. Khvat, I. M. Okun, S. E. Tkachenko, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009, **19**, 3183.
28. В. В. Григорьев, Л. Н. Петрова, Т. А. Иванова, Р. А. Котельникова, Г. Н. Богданов, Д. А. Полетаева, И. И. Файнгольд, Д. В. Мищенко, В. С. Романова, А. И. Котельников, С. О. Бачурин, *Изв. АН. Сер. биол.*, 2011, 163.
29. В. С. Романова, В. А. Цыряпкин, Ю. А. Ляховецкий, З. Н. Парнес, М. Е. Вольпин, *Изв. АН. Сер. хим.*, 1994, 1154 [V. S. Romanova, V. A. Tsyryapkin, Yu. A. Lyakhovetsky, Z. N. Parnes, M. E. Vol'pin, *Russ. Chem. Bull. (Engl. Transl.)*, 1994, **43**, 1090].
30. А. И. Котельников, В. С. Романова, Г. Н. Богданов, Н. П. Конавалова, О. И. Писаренко, Р. А. Котельникова, И. И. Фаингольд, Е. С. Фрог, Ю. Н. Бубнов, М. И. Davidov, S. M. Aldoshin, Pat. CA 2687557, 2008.
31. C. Melchior, M. A. Collins, *CRC Rev. Toxicol.*, 1982, **9**, 313.
32. H. G. Brunner, M. Nelen, X. O. Breakefield, H. H. Ropers, B. A. van Oost, *Science*, 1993, **262**, 578.
33. P. Simon, R. Dupuis, *J. Costentin, Behav. Brain Res.*, 1994, **61**, 59.
34. В. В. Григорьев, А. Н. Прошин, А. С. Кинзирский, С. О. Бачурин, *Успехи химии*, 2009, **78**, 524 [V. V. Grigoriev, A. N. Proshin, A. S. Kinzirsky, S. O. Bachurin, *Russ. Chem. Rev. (Engl. Transl.)*, 2009, **78**, 485].