

На правах рукописи

ПОПУГАЕВА

Елена Александровна

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ КАЛЬЦИЕВОЙ ДИСРЕГУЛЯЦИИ
В НЕЙРОНАХ ГИППОКАМПА – НОВЫЙ ПОДХОД К ЛЕЧЕНИЮ БОЛЕЗНИ
АЛЬЦГЕЙМЕРА**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

14.03.06 - фармакология, клиническая фармакология

03.03.01 - физиология

Санкт-Петербург - 2021

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», институт биомедицинских систем и биотехнологий, лаборатория молекулярной нейродегенерации

Научный консультант:

доктор биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией
молекулярной нейродегенерации,
ФГАОУ ВО СПбПУ

Безпрозванный Илья Борисович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН,
заведующий кафедрой
молекулярной фармакологии и радиобиологии
им. академика П.В. Сергеева,
ФГАОУ ВО РНИМУ им. Пирогова
Минздрава России

Шимановский Николай Львович

доктор биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией
молекулярной генетики соматических клеток,
Институт молекулярной генетики
НИЦ «Курчатовский институт»

Гривенников Игорь Анатольевич

доктор биологических наук,
заведующий лабораторией
сравнительной нейрофизиологии,
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт эволюционной
физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук

Антонов Сергей Михайлович

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физиологии им. И.П. Павлова» Российской академии наук

Защита состоится «__» _____ 2021 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 001.024.01, созданного на базе ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» по адресу: 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ученой части ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» по адресу: 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8 и на сайте www.academpharm.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета, доктор медицинских наук,
профессор

Вальдман Елена Артуровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования Болезнь Альцгеймера (БА) - наиболее распространённая форма прогрессирующей деменции у людей пожилого возраста, в странах Евросоюза наблюдается у каждого 20-го европейца старше 65 лет. Объем финансирования лечения БА только в Европе составляет свыше 100 млрд. евро. Предполагается, что к 2040 году распространенность БА увеличится вдвое в странах Западной Европы, втрое – в странах Восточной Европы (Язуина и др. 2012; // Неврологический журнал; Т: 17; С: 32-37). Распространенность БА в РФ имеет сходные показатели (Тювина и др. 2014; // неврология, нейропсихиатрия, психосоматика; Т: С: 61-67).

По этиологии БА можно разделить на две большие группы. Первая, более 95%, спорадическая, общим фактором риска для которой на сегодня может служить лишь преклонный возраст, и вторая, наследственная, составляющая лишь 1-2% случаев, вызываемая миссенс мутациями в белках пресенилинах и в белке предшественнике амилоида (Hardy et al. 2002; // Science;V: 297; P: 353-356; Hardy 2009; // J Neurochem;V: 110; P: 1129-1134; Bergmans et al. 2010; // Lancet Neurol;V: 9; P: 215-226; Karch et al. 2014; // Neuron;V: 83; P: 11-26).

Для лечения БА используются препараты, которые лишь временно снижают выраженность симптомов заболевания. Среди них - блокаторы ацетилхолинэстеразы - донепецил, галантамин и ривастигмин (Jelic et al. 2006; // J Neurol Neurosurg Psychiatry;V: 77; P: 429-438; Raschetti et al. 2007; // PLoS Med;V: 4; P: e338), блокатор N-метил-D-аспартат глутаматных рецепторов (NMDA) мемантин (Chen et al. 2006; // J Neurochem;V: 97; P: 1611-1626), ограничивающий вход ионов кальция в цитозоль, защищая нейроны от эксайтотоксичности (Olney 1969; // J Neuropathol Exp Neurol;V: 28; P: 455-474; Olney et al. 1970; // Nature;V: 227; P: 609-611).

В клинической практике блокаторы ацетилхолинэстеразы и мемантин часто применяются совместно для лечения легкой и умеренной форм БА (Peters et al. 2015; // Alzheimers Dement (N Y);V: 1; P: 198-204). Однако существенно замедлить развитие заболевания эти препараты не способны. Поэтому совершенствование фармакотерапии БА является одним из приоритетов мировой фармакологии.

Разработка эффективных средств патогенетической терапии БА требует дополнения представлений о механизмах, лежащих в основе нейродегенерации, с оценкой нейрохимических и морфологических различий в изменениях нейронов при нормальном старении и при развитии деменции. Очевидная мультифакториальность спорадической

формы БА определяет необходимость дальнейших исследований, в том числе, фармакогенетических, для анализа молекулярных основ заболевания, а именно, обнаружения нарушений в процессах, определяющих изменения физиологических функций нейронов. На этой основе представляется возможным выявить фармакологические мишени, регуляция которых обеспечит терапевтический эффект.

Основным токсическим агентом при БА первоначально рассматривался β амилоид (Selkoe et al. 2016; // *EMBO Mol Med*;V: 8; P: 595-608). В экспериментальных исследованиях была установлена эффективность амилоид-специфичных антител. Однако в клинике (Eli Lilly & Co.) препараты на основе моноклональных IgG1 антител к растворимым формам бета-амилоида (Solanezumab) не улучшали когнитивные функции пациентов с БА (Cummings et al. 2016; // *Alzheimers Res Ther*;V: 8; P: 39; Honig et al. 2018; // *N Engl J Med*;V: 378; P: 321-330), что обусловило целесообразность поиска других факторов, возможно предшествующих накоплению β амилоида.

Отличительной чертой БА является медленное развитие с потерей сначала краткосрочной и позднее долгосрочной памяти. С физиологической точки зрения память формируется за счет образования эффективной синаптической трансмиссии между пресинаптической терминалью и дендритным шипиком постсинаптического нейрона.

Исходя из представлений о формировании краткосрочной памяти как физиологического процесса создания новых синаптических связей между имеющимися нейронами, за счет увеличения числа дендритных шипиков, либо на основе изменения эффективности синаптической передачи уже имеющихся синаптических связей, БА можно рассматривать как следствие синаптической дисфункции (Selkoe 2002; // *Science*;V: 298; P: 789-791).

Установлена корреляция между изменениями количества дендритных шипиков в области CA1 гиппокампа и нарушениями памяти в моделях БА. (Sun et al. 2014; // *Neuron*;V: 82; P: 79-93; Auffret et al. 2010; // *J Alzheimers Dis*;V: 19; P: 1021-1033). Показано, что синаптическая утрата отличает пациентов с деменцией и коррелирует с тяжестью деменции (DeKosky et al. 1990; // *Ann Neurol*;V: 27; P: 457-464; Terry et al. 1991; // *Ann Neurol*;V: 30; P: 572-580; Scheff et al. 2003; // *Neurobiology of Aging*;V: 24; P: 1029-1046). Принимая потерю синапсов в качестве ключевого элемента патогенеза БА, можно полагать, что их восстановление или ограничение утраты является основной стратегией фармакотерапии БА.

В качестве ключевых механизмов старения мозга рассматривается кальциевая гипотеза (Khachaturian 1987; // *Neurobiol Aging*;V: 8; P: 345-346), предполагающая, что нарушение кальциевого гомеостаза предшествует появлению амилоидных бляшек,

нейрофибриллярных клубков и массовой гибели нейронов. При этом образование амилоидных бляшек в свою очередь негативно влияет на кальциевые каналы и другие элементы сигнальных систем. (Berridge 2009; // Pflugers Arch;V: P; Demuro et al. 2010; // J Biol Chem;V: 285; P: 12463-12468; Mattson 2010; // Sci Signal;V: 3; P: pe10; Supnet et al. 2010; // Cell Calcium;V: 47; P: 183-189).

Нарушение Ca^{2+} гомеостаза при нарушении функций кальций-проницаемых белков, таких как ионные каналы плазматической мембраны (NMDAR, AMPAR, VGCC), ионные каналы внутриклеточных депо ЭПР (RyanR, InsP3R), депо-управляемые каналы (TRPC6-зависимый) лежит в основе патогенеза БА (Bezprozvanny 2009; // Trends Mol Med;V: 15; P: 89-100; Alzheimer's Association Calcium Hypothesis 2017; // Alzheimers Dement;V: 13; P: 178-182 e117).

Отдельные клинические данные подтверждают возможность применения блокаторов потенциал зависимых кальциевых каналов (VGCC) L-типа, в частности нитрендипина, в качестве потенциальных препаратов предупреждающих развитие деменции альцгеймерского типа, сосудистой и смешанной, но не БА (Forette et al. 2002; // Arch Intern Med;V: 162; P: 2046-2052).

При доказанном участии в патогенезе БА обусловленной NMDAR глутаматной эксайтотоксичности (Choi 1987; // J Neurosci;V: 7; P: 369-379; Tymianski et al. 1993; // J Neurosci;V: 13; P: 2085-2104), мемантин не влияет на стабильность синаптических контактов (Talentova et al. 2013; // Proc Natl Acad Sci U S A;V: 110; P: E2518-2527). NMDAR/AMPAR/VGCC являются мощными кальций проницаемыми каналами (для NMDAR проводимость для ионов кальция составляет 40-80 pS), изменение их активности не позволяет осуществлять тонкую настройку Ca^{2+} сигналинга (Nedergaard et al. 2010; // Cell Calcium;V: 47; P: 101-102). Последняя необходима для коррекции малейших отклонений в кальциевом гомеостазе, с которыми связана деградация неправильно упакованных белков в ЭПР, сохранение энергетического баланса митохондрий и процессы апоптоза, поддержание стабильных синаптических контактов (Sun et al. 2014; // Neuron;V: 82; P: 79-93). Потому поиск путей восстановления или предупреждения нарушений синаптических контактов путем регуляции внутриклеточных кальций-проницаемых каналов на ЭПР, является актуальным и перспективным для создания средств патогенетической фармакотерапии БА.

Степень разработанности темы исследования

Основными каналами, обеспечивающими высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо ЭПР, являются рианодиновые рецепторы (RyanR) и инозитолтрифосфатные рецепторы (InsP3R). Показаны нейропротекторные свойства модуляторов этих каналов –

дантролена, ксестоспонгин С, 2-АРВ на моделях БА (Gafni et al. 1997; // *Neuron*;V: 19; P: 723-733; Mattson et al. 2000; // *J Neurosci*;V: 20; P: 1358-1364; Lopez et al. 2008; // *J Neurochem*;V: 105; P: 262-271; Bezprozvanny 2011; // *Neurochem Res*;V: 36; P: 1186-1197; Ryazantseva et al. 2018; // *Mol Neurobiol*;V: 55; P: 4667-4680). Однако данные об эффективности дантролена при лечении БА неоднозначны (Zhang et al. 2010; // *J Neurosci*;V: 30; P: 8566-8580; Chakroborty et al. 2012; // *PLoS One*;V: 7; P: e52056; Oules et al. 2012; // *J Neurosci*;V: 32; P: 11820-11834; Peng et al. 2012; // *Neurosci Lett*;V: 516; P: 274-279), как и специфичность ксестоспонгин С и 2-АРВ (Solovyova et al. 2002; // *Cell Calcium*;V: 32; P: 49-52; Diver et al. 2001; // *Cell Calcium*;V: 30; P: 323-329; Gregory et al. 2001; // *Biochem J*;V: 354; P: 285-290).

Установлена роль нейронального депо-управляемого входа кальция (нДУВК) как уникального клеточного механизма, обеспечивающего кальциевый гомеостаз (Putney 2003; // *Cell Calcium*;V: 34; P: 339-344). На трансляционной модели БА, мышцах линии PS1-M146V-KI с заменой пресенилина 1 на мутантный (M146V) пресенилин 1 человека было показано, что снижение нДУВК в ответ на перегрузку кальцием депо ЭПР вызывает дестабилизацию грибовидных дендритных шипиков (Sun et al. 2014; // *Neuron*;V: 82; P: 79-93). В то же время широко распространенная в финской популяции мутация с делетированным девятым экзоном ($\Delta E9$) в PS1 приводит к сверхтекучести пресенилиновых пор, что ведет к снижению концентрации кальция в ЭПР (Tu et al. 2006; // *Cell*;V: 126; P: 981-993). В гиппокампальной нейрональной культуре Neuro2a установлено, что гиперэкспрессия PSEN1 $\Delta E9$ вызывает активацию ДУВК, а у мух дрозофил с гиперэкспрессией мутантного пресенилина показана потеря краткосрочной памяти (Ryazantseva et al. 2018; // *Mol Neurobiol*;V: 55; P: 4667-4680). Таким образом, экспериментальные данные указывают на возможность нарушений как при сниженном, так и при повышенном нДУВК, что определяет направления поиска фармакологических средств как активаторов, так и ингибиторов нДУВК.

Установлено, что нДУВК регулируется через канал плазматической мембраны TRPC6 (Zhang et al. 2016; // *J Neurosci*;V: 36; P: 11837-11850). Ранее было выявлено соединение NSN21778, агонист TRPC6 (Zhang et al. 2016; // *J Neurosci*;V: 36; P: 11837-11850), которое восстанавливало нДУВК в гиппокампе и защищало дендритные шипики от токсического действия мутантного пресенилина (Zhang et al. 2016; // *J Neurosci*;V: 36; P: 11837-11850). Однако неудовлетворительная фармакокинетика и биодоступность NSN21778 определили необходимость поиска других регуляторов TRPC6.

Свойства агонистов TRPC6 установлены у гиперфорина и соединения [4- (5-хлор-2-метилфенил) пиперазин-1-ил] (3-фторфенил) метанон, однако они не перспективны для

разработки в качестве фармакологических препаратов (Woelk et al. 1994; // J Geriatr Psychiatry Neurol;V: 7 Suppl 1; P: S34-38; Di Carlo et al. 2001; // Trends Pharmacol Sci;V: 22; P: 292-297; Sawamura et al. 2016; // Mol Pharmacol;V: 89; P: 348-363).

Таким образом, кальций-зависимые пути регуляции функций нейронов интенсивно изучаются. Однако выявление молекулярных мишеней и новых фармакологических структур, прицельно воздействующих на эти мишени, вызывающих стабилизацию синаптических контактов при БА, остается актуальным.

Цель исследования Выявление фармакологических мишеней и регулирующих их базовых химических структур, перспективных для фармакологической разработки средств лечения болезни Альцгеймера, на основе анализа кальций зависимых процессов, включенных в патогенез заболевания

Задачи исследования

1. Исследовать роль кальциевой дисрегуляции в морфологических изменениях дендритных шипиков в гиппокампе на экспериментальных моделях амилоидной токсичности.
2. Доказать участие депо-управляемых кальциевых каналов в поддержании морфологии дендритных шипиков.
3. Установить взаимосвязь между активностью депо-управляемых кальциевых каналов и числом амилоидных бляшек в коре головного мозга трансгенных мышей – экспериментальных моделей болезни Альцгеймера.
4. Изучить молекулярный кальций-зависимый механизм дестабилизации дендритных шипиков на патогенетической модели болезни Альцгеймера, экспрессирующей мутантный PSEN1 Δ E9.
5. Обосновать фармакотерапевтическую целесообразность коррекции кальциевой дисрегуляции в нейронах гиппокампа на экспериментальных моделях болезни Альцгеймера.
6. Осуществить поиск фармакологически активных химических соединений - модуляторов нейронального депо-управляемого входа кальция.
7. Доказать нейропротекторную активность отобранных химических соединений в *in vitro* и *ex vivo* моделях амилоидной синаптотоксичности.
8. Определить молекулярную мишень базовых химических структур.

Научная новизна

Определены базовые химические структуры, воздействующие на молекулярную мишень – каналы TRPC6 по депо-зависимому пути.

На клеточной модели амилоидной синаптотоксичности установлен зависимый от концентрации нейропротекторный эффект соединений, производных пиперазина.

Показано, что соединение N-(2-хлорфенил)-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)ацетамид является агонистом каналов TRPC6 в гиппокампальных клетках генетических моделей БА.

На генетической модели с гиперэкспрессией PSEN1ΔE9 установлен нейропротекторный эффект соединения 4-N- [2- (4-феноксифенил) этил] хиназолин-4,6-диамина.

Впервые показано, что 4-N-[2-(4-феноксифенил)этил]хиназолин-4,6-диамина является антагонистом TRPC6-зависимого депо-управляемого входа кальция в нейронах гиппокампа.

Впервые положительный модулятор сигнального пути TRPC6-зависимого нейронального депо-управляемого входа кальция - производное пиперазина – N-(2-хлорфенил)-2-(4-фенилпиперазин-1-ил) ацетамид - предложен в качестве базовой химической структуры, на основе которой возможна разработка фармакотерапии форм БА с избыточным содержанием кальция в эндоплазматическом ретикулуле.

Впервые антагонист молекулярного пути TRPC6-нДУВК, 4-N- [2- (4-феноксифенил) этил] хиназолин-4,6-диамина, предложен в качестве базовой химической структуры для разработки фармакотерапии форм БА с истощенными запасами кальция в эндоплазматическом ретикулуле.

Рекомендованные в настоящей работе соединения для фармакотерапии БА воздействуют на новую фармакологическую мишень – каналы TRPC6 в нейронах гиппокампа, активируемые по депо-зависимому пути. Существующие лекарственные средства для лечения пациентов с БА на данную мишень не влияют.

Теоретическая и практическая значимость

С использованием *in vitro* и *in vivo* моделей БА получены фундаментальные результаты, демонстрирующие, что изменения кальций-зависимых сигнальных путей TRPC6-зависимого нейронального депо-управляемого входа кальция лежат в основе дестабилизации синаптических контактов. Доказано, что тонкая регулировка кальциевой сигнализации в дендритных грибовидных шипиках позволяет ограничить развитие амилоидной токсичности и восстановить синаптическую пластичность в срезах мозга трансгенных мышей - модели БА.

Охарактеризованы свойства модуляторов депо-управляемых кальций-зависимых каналов, позволяющие рекомендовать их в качестве перспективных фармакологических препаратов лечения БА, обусловленной нарушением внутриклеточной регуляции кальция. Показано, что соединения - производные пиперазина - способны взаимодействовать с

клеточной мишенью TRPC6-зависимым депо-управляемым кальциевым каналом в гиппокампе. Методами биоинформатики спрогнозирован минимальный набор их побочных эффектов, что обосновывает рекомендацию соединений для доклинических исследований.

Показано, что при изыскании фармакологических средств лечения болезни Альцгеймера, вызванной нарушением Ca^{2+} зависимого пути, фармакотерапевтические свойства могут быть выявлены как у агонистов, так и антагонистов депо-управляемых кальциевых каналов.

Таким образом, сформулирована новая стратегия фармакологической коррекции кальциевой дисрегуляции в нейронах гиппокампа и научно обоснована целесообразность разработки лекарственных средств патогенетической терапии фенотипов болезни Альцгеймера, обусловленных нарушением внутриклеточной кальциевой регуляции.

Разработанная *in vitro* модель амилоидной синаптотоксичности может быть использована для скрининга фармакологических соединений по критерию способности защищать синаптические контакты от амилоидной токсичности и регулировать кальций-зависимые пути в нейронах гиппокампа.

Реализация результатов исследования Результаты исследований внедрены в практику учебной работы Высшей школы биомедицинских систем и технологий ФГАОУ ВО СПбПУ, кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, а также в исследовательскую работу лаборатории молекулярной нейродегенерации ФГАОУ ВО СПбПУ.

Методология и методы исследования Использовали фармакологические и генетические модели БА. Индукцию долговременной потенциации изучали в срезах мозга мышей линии 5xFAD. Ишемию головного мозга моделировали на анестезированных животных методом односторонней окклюзии среднемозговой артерии по методу J. Koizumi. Для исследования влияния соединений на краткосрочную и долгосрочную память использовали поведенческий тест «лабиринт Барнса». Эксперимент проводили на установке «Лабиринт Барнс для крыс» (ООО «НПК Открытая наука», Россия).

Применялась двухфотонная визуализация морфологии дендритных шипиков в срезах гиппокампа взрослых мышей и конфокальная визуализация процессов и структуры шипиков в культуре клеток. В исследовании использовали стандартные молекулярно-биологические методы: вестерн-блот, генотипирование, кальций фосфатную трансфекцию нейронов, иммуногистохимию, иммуноцитохимию. Биоинформатический анализ химических соединений выполнен с помощью программ PASS. Все результаты были обработаны релевантными методами статистического анализа.

Положения, выносимые на защиту

1. Кальциевая дисрегуляция в нейронах гиппокампа дестабилизирует синаптические контакты при моделировании амилоидной токсичности.
2. При гипоактивности и гиперактивности депо-управляемых кальциевых каналов снижается количество синаптических контактов в гиппокампе.
3. Фармакологическая коррекция кальциевой дисрегуляции в нейронах гиппокампа является стратегией для разработки средств лекарственной терапии фенотипов болезни Альцгеймера, обусловленных нарушением Ca^{2+} зависимых сигнальных путей.
4. Каналы TRPC6 в составе депо-управляемых кальциевых каналов являются молекулярной мишенью для разработки фармакологических средств лечения болезни Альцгеймера при нарушенной кальциевой регуляции в нейронах.
5. Соединения модуляторы (производные пиперазина/ этаноламина /хиназолиндиамина) TRPC6-зависимого нейронального депо-управляемого входа кальция в гиппокампе перспективны для разработки фармакологических средств лечения болезни Альцгеймера.
6. Для разработки средств лечения разных форм болезни Альцгеймера целесообразно использовать как агонисты, так и антагонисты депо-управляемых кальциевых каналов.

Степень достоверности полученных результатов Все научные положения и выводы обоснованы благодаря системному анализу проблемы; использованию современных методов фармакологии и молекулярной биологии, а также нейробиологии и электрофизиологии; должной выборке экспериментальных образцов (культуры клеток, срезы мозга, животные) в соответствии с обозначенными задачам; достаточному количеству полученных экспериментальных данных; применению соответствующих методов статистического анализа.

Апробация работы Основные положения работы были доложены и обсуждены на российских и международных конференциях в виде устных и стендовых докладов: AD/PD 2013 (Флоренция, 2013); Неделя науки СПбПУ 2015 (Санкт-Петербург, 2015); AD/PD 2015 (Ницца, 2015); V Съезд биофизиков России 2015 (Ростов-на-Дону, 2015); Международный форум «Старшее поколение» (Санкт-Петербург, 2016); V European congress of preventive, regenerative and anti-aging medicine (Санкт-Петербург, 2016); Неделя науки СПбПУ 2016 (Санкт-Петербург, 2016); Gordon Research Conference on Neurobiology of Brain Disorders 2016 (Жирона, 2016); AD/PD 2017 (Вена, 2017); Неделя науки СПбПУ 2017 (Санкт-Петербург, 2017); VI Международный симпозиум «Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и патологии» (Санкт-Петербург, 2017); International Symposium. Experts' opinion on current approaches in anti-ageing medicine and gerontology (Женева, 2017); 11th

FENS Forum of Neuroscience (Берлин, 2018); Неделя науки СПбПУ 2018 (Санкт-Петербург, 2018); VI Съезд физиологов СНГ (Дагомыс, 2019).

Публикации По результатам работы опубликовано 14 статей в рецензируемых научных журналах, входящих в международные базы цитирования (WoS – 13, Scopus – 14), 4 статьи в журналах, входящих в РИНЦ, 1 глава в монографии. Получен 1 патент. Результаты представлены в 15 тезисах докладов на российских и международных конференциях.

Структура и объем диссертации Диссертация изложена на 168 страницах машинописного текста, состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, содержащего 297 источников (6 отечественных и 291 иностранных). Диссертационная работа иллюстрирована 5 таблицами, 43 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Химические соединения и плазмиды. Соединения аналоги агонистов каналов TRPC6 (на основании структурного подобия известным в литературе агонистам TRPC6): N-(2-хлорфенил)-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)ацетамид (каталожный номер: 51164); N-(4-фторфенил)-2-(4-(о-толил)пиперазин-1-ил)ацетамид (каталожный номер: 50741); 1,1'-(4,6-дигидрокси-1,3-фенилен)бис(пропан-1-он) (каталожный номер: 64402), 46766 (N-(2-хлорфенил)-2-(4-хлорфенил)пиперазин-1-ил)ацетамид) (каталожный номер: 46766) были получены из общедоступной химической библиотеки InterBioScreen (Черноголовка, Россия). Агонист каналов TRPC6 (Leuner et al. 2010; // Mol Pharmacol;V: 77; P: 368-377) 1,1'-(2,4,6-тригидрокси-1,3-фенилен)бис-1-гексанон (аббревиатура: Нур9) получали из Sigma Aldrich (каталожный номер: H9791). Антагонист депо-управляемых кальциевых каналов TRPC1 (Wu et al. 2016; // J Neurosci;V: 36; P: 125-141) типа 4-N- [2- (4-феноксифенил) этил] хиназолин-4,6-диамин) (аббревиатура: EVP4593) получали из Sigma Aldrich (каталожный номер: SML0579).

Плазмиды lenti-TRPC6, lenti-TRPC6-shRNAi, lenti-Ctrl-shRNAi, pcDNA3.1-PSEN1-дикого типа (WT), pcDNA3.1-PSEN1 Δ E9 и GCaMP5.3 были любезно предоставлены Университетом Штата Техас. Плазида pCSCMA-TD-tomato была приобретена у Addgene (30530).

Вирусы. В работе использовали аденоассоциированные вирусы второго типа (AAV2/1), несущие либо ген STIM2, конъюгированный с флуоресцентным белком GFP, либо только ген GFP (использовался в качестве контроля). Вирусы нарабатывались в комплексе Gene Transfer Vector Core Университета штата Айовы (г. Эймс, США), в бакуловирусной экспрессирующей системе.

Приготовление олигомерных форм Аβ40 и Аβ42. Лиофилизированные аликвоты (1 мг) пептидов Аβ42 (# 20276, AnaSpec) и Аβ40 (# 24236, AnaSpec) растворяли в 80 мкл 1% NH₄OH и затем в 920 мкл стерильного фосфатно-буферного раствора (PBS) для получения исходного раствора пептидов с концентрацией 1 мг/мл (хранился в аликвотах по 100 мкл при -20°C). Рабочие растворы Аβ готовили непосредственно перед обработкой клеток путем разбавления исходной концентрации до конечной концентрации пептида Аβ в 0,1 мкМ в питательной среде Neurobasal-A (Gibco, Life technologies, США) согласно протоколу описанному ранее Zheng et al. (Zheng M 2012; // Amyloid;V: 20; P: 13-20). Рабочие концентрации пептидов Аβ42-Alexa555 (# 60480-01, AnaSpec) для экспериментов *in vitro* составляли 1 мкМ.

Биоинформатический анализ биологической активности и побочных эффектов у химических соединений. *In silico* анализ для пяти потенциальных соединений - агонистов каналов TRPC6 проводили с использованием преобразованной версии программы PASS. PASS – это программное обеспечение для прогнозирования спектров биологической активности химических соединений на основе их структурной формулы. В текущем исследовании использовалась онлайн-версия программы PASS (<http://www.way2drug.com/passonline>). Структурные формулы были представлены в форме MarvinJSfiles.

Приготовление первичной культуры гиппокампа. Нейроны гиппокампа выделяли из белых беспородных мышей, а также из мышей линии C57BL/6J в возрасте 0–2 дня после их рождения и поддерживали в культуре до 15-16 дня по протоколу описанному ранее (Zhang et al. 2010; // J Neurosci;V: 30; P: 8566-8580; Sun et al. 2014; // Neuron;V: 82; P: 79-93).

Иммуноцитохимия. Первичные культуры нейронов гиппокампа фиксировали раствором ПФА. Для блокировки неспецифического связывания антител использовали 5% BSA. Первичные антитела: анти-map2 mAb (Chemicon, mAB378) и анти-Synapsin I (Chemicon, Temecula, CA). Вторичные антитела (Alexa Fluor 488 или 594, Invitrogen).

Кальций фосфатная трансфекция первичных нейронов гиппокампа. Для осуществления кальций фосфатной трансфекции нейронов гиппокампа использовали набор Clontech CalPhos Mammalian Transfection Kit (TAKARA Biotechnology #631312), включая 2М CaCl₂, 2X Hank's balanced salt solution (HBS) и стерильную воду. Трансфекцию проводили на 6,7-дневной культуре гиппокампа по протоколу описанному подробно в (Пчицкая и др.. 2017; // Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого" Т: 1; С: 71).

Анализ морфологии дендритных шипиков в первичных культурах гиппокампа.

Анализ морфологии дендритных шипиков проводили на конфокальном микроскопе «ThorLabs» (USA) при помощи программы Neuron Studio software package согласно методике, описанной в статье (Rodriguez et al. 2008; // PLoS One; V: 3; P: e1997). Для классификации формы шипиков в культуре нейронов использовали следующие параметры: отношение размеров головки шипика к шейке ($HNR(crit) = 1,4$, соотношение сторон для тонкого шипика ($AR_thin(crit) = 2,5$, размер головки грибовидного шипика ($HD(crit) = 0,45$ мкм.

Измерение осцилляций внутриклеточного кальция с использованием красителей Fura-2AM и Fluo-3AM. Мониторинг изменений внутриклеточных концентраций кальция с использованием красителей Fura-2 и Fluo-3 в форме проникаемых через мембраны ацетоксиметилловых эфиров (AM) на клетках HEK293T проводили, как описано ранее в статье (Tang et al. 2003; // Neuron; V: 39; P: 227-239).

Измерение нейронального депо-управляемого входа кальция в дендритных шипиках с использованием плазмиды GCaMP5.3. Измерение нДУВК в дендритных шипиках проводили на трансфицированных плазмидой GCaMP5.3 нейронах по протоколу, описанному ранее (Zhang et al. 2015; // J Neurosci; V: 35; P: 13275-13286). Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения ImageJ. Области интереса, используемые в анализе изображений, соответствовали отдельным шипикам. Все эксперименты по визуализации осцилляций кальция проводились при комнатной температуре.

Мыши. Белые беспородные мыши альбиносы (полученные из ФГУП Питомник лабораторных животных «Рапполово», деревня Рапполово, Ленинградская область, Россия), а также мыши линии C57BL/6J (000664, Jaxlab, США) были использованы в качестве источника мозговой ткани для экспериментов с культурами гиппокампа. Мышей линии M Tg (Thy1-EGFP)MJrs/J (007788, Jaxlab, США) (Feng et al. 2000; // Neuron; V: 28; P: 41-51) использовали в экспериментах по визуализации морфологии дендритных шипиков в гиппокампе взрослых мышей. Мышей дикого типа (WT) (линия C57BL/6J генотип), получали из лаборатории Jaxlab (000664, США). Модель линий нБА 5xFAD получали из лаборатории MMRC (34840, США). Мышей содержали в виварии лаборатории молекулярной нейродегенерации Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого с 12-часовым световым циклом, со свободным доступом к воде и пище.

Этика. Все *in vitro* эксперименты с участием мышей были одобрены комитетом по уходу и использованию животных в научно-исследовательском институте Гриппа

Минздрава Российской Федерации, по согласованию с Министерством сельского хозяйства Российской Федерации.

Поведенческие эксперименты с животными проводили в соответствии с Приказом Минздрава РФ от 01.04.16 г. №199н "Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики" после одобрения биоэтической комиссии СПХФУ.

Генотипирование мышей. Наличие трансгена у животных линии 5xFAD и в мышцах линии M проверяли при помощи процедуры генотипирования. Необходимый ДНК-материал выделяли из кончика хвоста животного методом фенол-хлороформной экстракции. Далее наличие трансгена в образце определяли методом ПЦР с использованием трансген-специфичных праймеров.

Стереотаксические инъекции вирусов в СА1-область гиппокампа мышей. Для стереотаксических инъекций аденоассоциированных вирусов использовали мышей в возрасте 2 мес. За точку с координатами (0,0,0) принимали положение брегма на черепе. Инъекции проводили билатерально с использованием следующих координат: угол 10° в плоскости medial/lateral; расстояния были +2,0 мм в плоскости anterior/posterior, +2,6 мм в плоскости medial/lateral, +1,9 мм в плоскости dorsal/ventral. Инъекции проводили со скоростью 0,5 мкл/мин. Обезболивание животных проводили двумя последовательными внутрибрюшинными инъекциями анестезирующего раствора на основе уретана и ксилазина. После операции мышью выводили из наркоза посредством внутрибрюшинного введения препарата антиседан. Во время операции и реабилитации оптимальную температуру тела мыши поддерживали при помощи термостатируемого коврика (Temperature Controller, RWD Life Science CO., Ltd).

Анализ морфологии дендритных шипиков в срезах мозга. Спустя 6 недель после стереотаксической инъекции предварительно анестезированным мышам проводили транскардиальную перфузию холодным раствором ПФА в фосфатном буфере. Мозг извлекали и фиксировали в растворе ПФА. Изображение нейронов в срезах мозга толщиной 300 мкм получали на двухфотонном микроскопе (Thorlabs, США). Для анализа использовали программу NeuronStudio (NIH, США). Основные параметры, использованные в программе: HNR(crit) = 1,3, AR_thin(crit) = 2,5, HD(crit) = 0,2 мкм.

Приготовление лизатов гиппокампа. Мышам в возрасте 4 и 6 мес. проводили транскардиальную перфузию холодным фосфатным буфером. Перед этим мышью анестезировали раствором уретана. Гиппокамп извлекали, гомогенизировали и лизировали в буфере содержащим 1 % CHAPS.

Вестерн-блот анализ. Белки, содержащиеся в лизатах культур клеток либо в лизатах гиппокампов, разделяли электрофоретическим методом в полиакриламидном геле с

последующим переносом белков с геля на PVDF мембрану. Наличие белка интереса на мембране определяли с помощью белок-специфичных антител.

Иммуногистохимическое окрашивание тонких срезов антителами, специфичными к бета-амилоиду. Детектирование амилоидных (A β)-бляшек в 100 мкм срезах осуществляли при помощи метода иммуногистохимического окрашивания с использованием амилоид-специфичных антител 6E10 (Covance).

Анализ количества амилоидных бляшек в срезах мозга производили с помощью программы Icy (Париж, Франция), функция Spot Detector.

Электрофизиологические эксперименты по записи долговременной потенциации (ДВП). Полевые (внеклеточные) возбуждающие постсинаптические потенциалы (пВПСП) регистрировали в CA1 области *stratum radiatum* в горизонтальных срезах мозга толщиной 400 мкм. Синаптические ответы вызывали местной внеклеточной стимуляцией коллатералей Шаффера с использованием вольфрамовых биполярных электродов (Microprobes for Life Science, США), помещенных в *stratum radiatum* на границе CA1 и CA2 областей. ДВП индуцировали по протоколу стимуляции тета-всплеска (от англ. theta burst stimulation, TBS), состоящим из пяти всплесков по пять импульсов 100 Гц с интервалом 200 мс между всплесками, применяемым пять раз через каждые 10 с. пВПСП записывали по протоколу индукции в течение 40 мин. Электрофизиологические данные анализировали с помощью программы Clampfit 10.2 (Axon Instruments, США).

Модели экспериментальной ишемии. Ишемию головного мозга моделировали на анестезированных животных (внутрибрюшинное введение хлоралгидрата в дозе 400 мг/кг) методом односторонней окклюзии среднемозговой артерии по методу J. Koizumi (Koizumi et al 1986; // Jpn J Stroke; V. 8, P. 1-8).

Тест «лабиринт Барнс» чувствителен к нарушениям у грызунов с гиппокампальными повреждениями. Эксперимент проводили на установке «Лабиринт Барнс для крыс» (ООО «НПК Открытая наука», Россия) по протоколу описанному ранее (Pitts 2018; // Bio-Protocol; V: 8; P). Выбор доз изучаемых соединений был сделан на основании проведенных ранее экспериментов. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор в эквивалентных количествах (1 мл/200г массы). В течение 4-х дней перед моделированием ишемии головного мозга проводили обучение животных. Перед началом обучения каждую крысу помещали в «норку» (targetbox) и оставляли там на 2 минуты. Затем животных по очереди помещали в центр лабиринта, накрывая темной коробкой. По истечении 10 секунд коробку поднимали и записывали поведение крысы в течение 3-х минут. За отведенное время животное должно было найти targetbox, при этом подсчитывалось время её нахождения и количество ошибок. В случае, если крыса не

справлялась с заданием, по прошествии 3 минут запись выключалась, а испытуемое животное мягко подталкивалось к targetbox и оставалось там также на 2 минуты. Данная процедура повторялась ежедневно в течение 4-х дней, интервал между попытками составлял 15-20 минут.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программного пакета Statistica 8.0 (StatSoft, USA) и OriginPro 8. Данные представлены в виде: среднее значение (Mean) \pm стандартная ошибка среднего (SEM), либо в виде среднее значение (Mean) \pm стандартное отклонение (SD). Критерий Колмогорова-Смирнова использовали для оценки нормальности распределения. Сравнения двух групп проводили с использованием t-критерия Стьюдента (при условии нормального распределения в выборках), и Kruskal-Wallis ANOVA – при несоблюдении условий нормальности распределения. Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) использовали при сравнении трех и более групп с одной переменной. Для оценки взаимосвязи двух переменных (например, Генотип \times Возраст; Вводимое вещество \times Наличие токсичности (A β)) применяли двухфакторный ANOVA. Последующее попарное сравнение групп проводили с помощью post-hoc Tukey's или Dunn-Sidak's тестов множественных сравнений. Различия принимали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Разработка модели низкой амилоидной токсичности

Первичную культуру гиппокампа получали из новорожденных мышат (P0-3) дикого типа (WT) по протоколу (Zhang et al. 2010; // J Neurosci; V: 30; P: 8566-8580; Sun et al. 2014; // Neuron; V: 82; P: 79-93). Нейроны гиппокампа поддерживали в культуре до 14-16 дня *in vitro* (DIV, days *in vitro*). Для достижения условий амилоидной токсичности использовали растворимые амилоидные олигомеры, которые, как было продемонстрировано ранее, оказывают синаптотоксическое действие при БА (Lambert et al. 1998; // Proc Natl Acad Sci U S A; V: 95; P: 6448-6453; Dahlgren et al. 2002; // J Biol Chem; V: 277; P: 32046-32053; Walsh et al. 2002; // Nature; V: 416; P: 535-539; Haass et al. 2007; // Nat Rev Mol Cell Biol; V: 8; P: 101-112; Wu et al. 2010; // J Neurosci; V: 30; P: 2636-2649; Koffie et al. 2011; // Mol Neurodegener; V: 6; P: 63; Mucke et al. 2012; // Cold Spring Harb Perspect Med; V: 2; P: a006338). Растворимые амилоидные олигомеры получали из синтетических пептидов A β 42 (Zheng M 2012; // Amyloid; V: 20; P: 13-20). Олигомерное состояние полученного A β 42 подтверждали анализом на атомно-силовом микроскопе (АСМ), а также вестерн-блоттингом в SDS-геле (Рисунок 1). По данным АСМ олигомеры A β 42 проявляются в виде глобулярных структур с высотой 1-2 нм и шириной около 10 нм (Рисунок 1 А). Эксперименты вестерн-блоттинга показали, что препарат A β 42 находится в основном в олигомерной форме и его

молекулярная масса составляет около 26 кДа (Рисунок 1 Б), что соответствует пентамерам или гексамерам (Ahmed et al. 2010; // Nat Struct Mol Biol;V: 17; P: 561-567). Для имитации физиологических условий использовали низкие концентрации (100 нМ, рассчитанные на основе начального количества пептидов, использованных для получения олигомеров) Аβ42. Пептиды Аβ40 готовили так же, как пептиды Аβ42 (Рисунок 1). Использовали эквивалентные количества пептидов Аβ42 и Аβ40. Приготовленные олигомеры Аβ42 и Аβ40 добавляли к первичным культурам нейронов гиппокампа на DIV11. В контрольных экспериментах гиппокампаальные культуры обрабатывали эквивалентным (по отношению к добавляемому к культурам объему олигомеров Аβ42 и Аβ40) количеством питательной среды. Синаптотоксический эффект, а также влияние Аβ на кальциевый сигналинг изучали на DIV14-16.

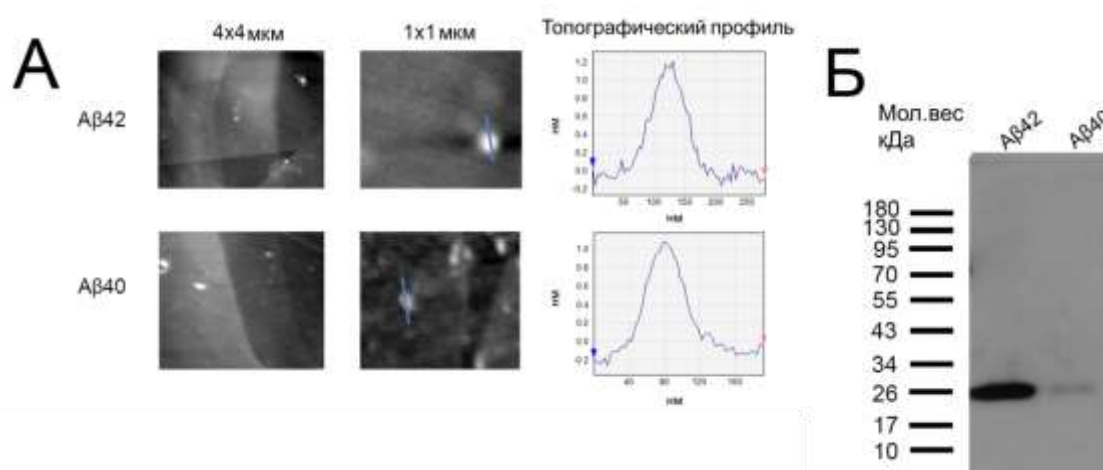


Рисунок 1 Характеристика олигомерного состояния Аβ42, Аβ40. (А) Микрофотографии образцов Аβ42, Аβ40 and Аβ42-Alexa555 полученные при помощи атомно силовой микроскопии. (Б) Фракции надосадочной жидкости образцов Аβ42 и Аβ40 разделяли при помощи 15% Acrylamide/Bis SDS геля и анализировали Вестерн блотом с использованием anti-Аβ 6E10 моноклональных антител.

1.1 Исследование роли кальциевой дисрегуляции в изменении морфологии дендритных шипиков на модели низкой амилоидной токсичности

Функциональное соответствие модели амилоидной токсичности, обусловленной низкой концентрацией Аβ40 и Аβ42 анализировали по восприимчивости культивируемых нейронов гиппокампа к глутаматной (Glu) эксайтотоксичности после инкубации с олигомерными амилоидами (оАβ) методом кальциевого имиджинга. Глутаматная эксайтотоксичность – патологический процесс, ведущий к гибели нейронов под воздействием нейромедиатора глутамата, способного гиперактивировать NMDA и AMPA рецепторы. При эксайтотоксичности происходит резкое увеличение внутриклеточной концентрации кальция, что вызывает активацию ряда ферментов, разрушающих цитозольные структуры и приводит к запуску апоптоза. В настоящей работе установлено,

что инкубация с оАβ42 и оАβ40 значительно повышает восприимчивость нейронов к Glu эксайтотоксичности (Рисунок 2 А, Б), что согласуется с данными литературы (Harkany et al. 2000; // Eur J Neurosci;V: 12; P: 2735-2745).

В условиях созданной модели оценивали роль ионотропных NMDA рецепторов в установленном увеличении Glu эксайтотоксичности при инкубации с оАβ40, оАβ42. Показано, что при блокаде NMDAR ионами магния в концентрации 10 мМ, чувствительность нейронов, обработанных оАβ42, оАβ40 к Glu эксайтотоксичности, снижалась (Рисунок 3).

Полученные результаты подтверждают функциональность модели и возможность ее использования для изучения влияния оАβ на стабильность синапсов и на внутриклеточную передачу сигналов Ca²⁺.

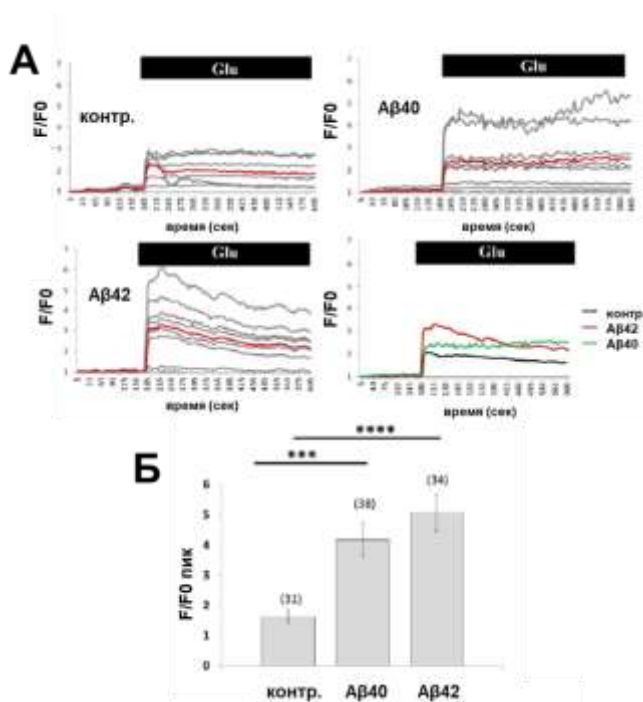


Рисунок 2 Аβ40 и Аβ42 в концентрации 100 нМ увеличивают восприимчивость нейронов к глутаматной (Glu) эксайтотоксичности. (А) График временной зависимости изменения флуоресценции кальций чувствительной краски Fluo-3 (F/F0) в some нейронов гиппокампа в условиях амилоидной токсичности (Б) Сравнительный анализ изменения амплитуды кальциевого ответа (F/F0 пик) в экспериментальных группах.

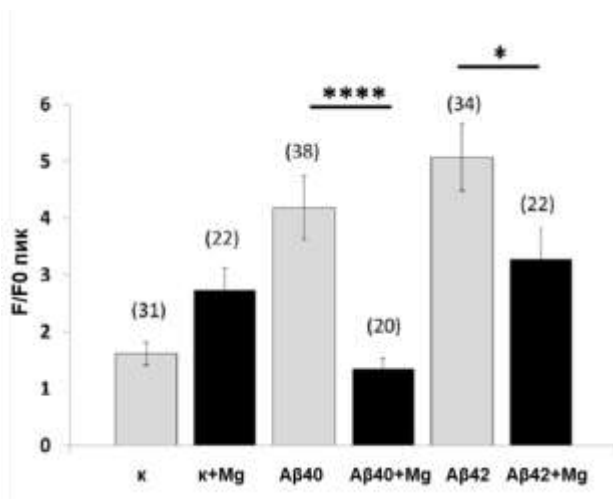


Рисунок 3 NMDA-рецепторы участвуют в Aβ-индуцированной восприимчивости нейронов гиппокампа к глутаматной эксайтотоксичности. Средний пик (Fluo-3 F/F0) нейрональных ответов, рассчитанный для нейронов гиппокампа дикого типа после воздействия на них 100нМ Aβ40, 100нМ Aβ42 или контроля (питательная среда) в присутствии или отсутствии ионов Mg²⁺.

Известно, что амилоид бета изменяет активность ЭПР-резидентных кальциевых каналов (Ferreiro et al. 2004; // J Neurosci Res;V: 76; P: Jensen et al. 2013; // Front Mol Neurosci;V: 6; P: 36). Оценка влияния низкой (100нМ) концентрации Aβ42 на содержание кальция в ЭПР нейронов гиппокампа проведена по визуализации кальциевых осцилляций в соме нейронов. Выброс кальция из депо ЭПР вызывали добавлением 3 мкМ иономицина (Ю, ионофор проникающий через клеточные мембраны). Установлено, что инкубация нейронов с Aβ42 в концентрации 100нМ статистически значимо ($p < 0,01$) способствует накоплению ионов кальция в ЭПР нейронов гиппокампа (Рисунок 4).

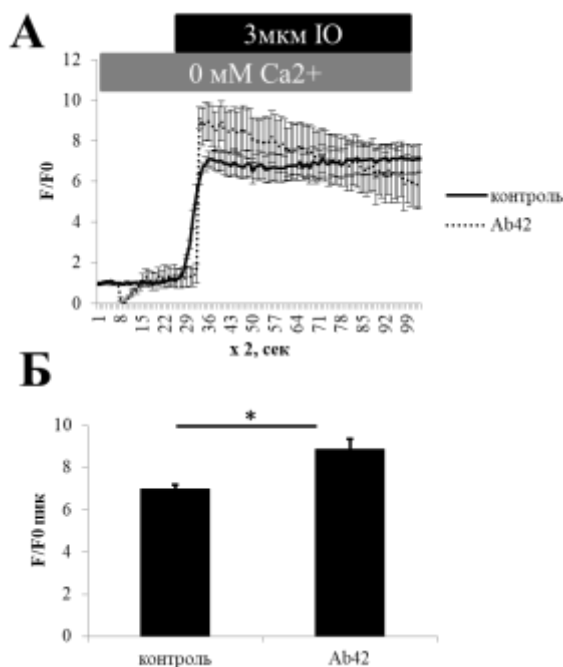


Рисунок 4 Aβ42 в концентрации 100нМ повышает содержание ионов кальция в эндоплазматическом ретикулуме первичных нейронов гиппокампа. (А) График временной зависимости флуоресценции Fluo-3 в первичных нейронах гиппокампа в присутствии Aβ42, либо в его отсутствии (контроль). (Б) Сравнительный анализ изменения амплитуды кальциевого ответа (F/F0 пик) в экспериментальных группах.

Далее было исследовано влияние Aβ42 на активность депо-управляемых кальциевых каналов в дендритных шипиках первичной культуры гиппокампа. Установлено, что инкубация нейронов с 100нМ Aβ42 статистически достоверно ($p < 0,05$) снижает активность постсинаптического депо-управляемого входа кальция (Рисунок 5).

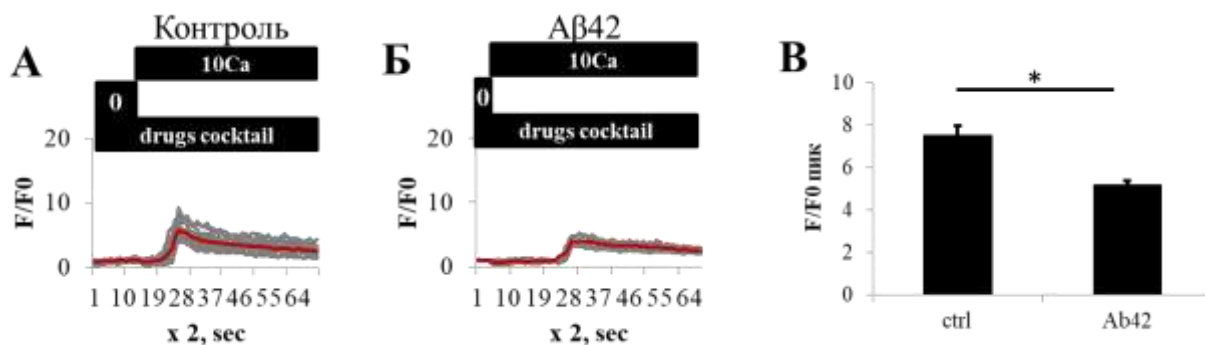


Рисунок 5 Постсинаптический нейрональный депо-управляемый вход кальция снижен в нейронах гиппокампа обработанных Aβ42. (А, Б) Временные зависимости изменения интенсивности флуоресценции генетически кодируемого кальциевого индикатора GCaMP5.3 в дендритных шипиках нейронов гиппокампа в контрольных условиях (А) и в присутствии 100нМ Aβ42 (Б). drugs cocktail - коктейль блокаторов кальциевых каналов: D-AP5, CNQX, нифедипин (для блокирования активности мощных кальций проницаемых каналов плазматической мембраны, таких как NMDAR, AMPAR, VGCC), тапсигаргин (блокатор SERCA пумпы), тетродотоксин (блокатор натриевых каналов, для ингибирования спонтанной активности нейронов). **В**) Сравнительный анализ изменения амплитуды кальциевого ответа (F/F0 пик) в экспериментальных группах.

Для оценки состояния синаптогенеза в условиях низкой амилоидной токсичности *in vitro* на 14 день культивирования нейроны были зафиксированы, пермеабелизованы и окрашены на нейрональный маркер MAP2 и синаптический маркер синапсин (Synapsin I) (Рисунок 6 А). Установлена значительная потеря окрашивания синапсина в культурах, подвергнутых воздействию олигомеров Aβ42 в концентрации 100нМ (Рисунок 6 А, Б). Полученные результаты согласуются с данными, полученными другими исследователями (Lambert, Barlow et al. 1998; // Proc Natl Acad Sci U S A; V: 95; P: 6448-6453; Renner et al. 2010; // Neuron; V: 66; P: 739-754; Wu, Hudry et al. 2010; // J Neurosci; V: 30; P: 2636-2649).

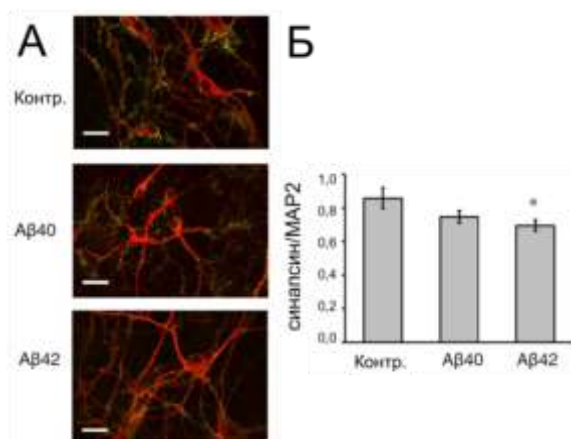


Рисунок 6 Синаптотоксические эффекты амилоидных олигомеров в концентрации 100нМ в первичной нейрональной культуре. (А) Иммуноцитохимический анализ экспрессии синаптического маркера Синапсин I (зеленый) и нейронального маркера MAP2 (красный) в первичной культуре гиппокампа в условиях амилоидной токсичности. (Б) Количественный анализ синаптотоксических эффектов в экспериментальных группах.

Следующим этапом проверки адекватности разработанной модели было изучение изменений морфологии дендритных шипиков нейронов культуры гиппокампа при

воздействии олигомерами Аβ40 и Аβ42 в концентрации 100нМ. Грибовидные шипики составляли 35% от общего количества шипиков в контрольных культурах (Рисунок 7 А, Б). Добавление олигомеров Аβ40 в концентрации 100 нМ не оказывало статистически значимого влияния на грибовидные шипики в нейрональных культурах (Рисунок 7 А, Б). Напротив, добавление олигомеров Аβ42 в концентрации 100 нМ приводило к значительному снижению процента грибовидных шипиков (Рисунок 7 Б). В среднем процент грибовидных шипиков был снижен до 20% в культурах, обработанных олигомерами Аβ42 (Рисунок 7 Б). После обработки Аβ42 доля пеньковых шипиков увеличилась с 35 до 50%, а доля тонких шипиков осталась постоянной на уровне 26% (Рисунок 7 Б). Сдвиг от грибовидных к тонким шипикам, вызванный воздействием олигомеров Аβ42, согласуется с результатами, полученными на органотипических срезах гиппокампа на трансгенной модели APP_{SLD} (Tackenberg et al. 2009; // J Neurosci;V: 29; P: 14439-14450).

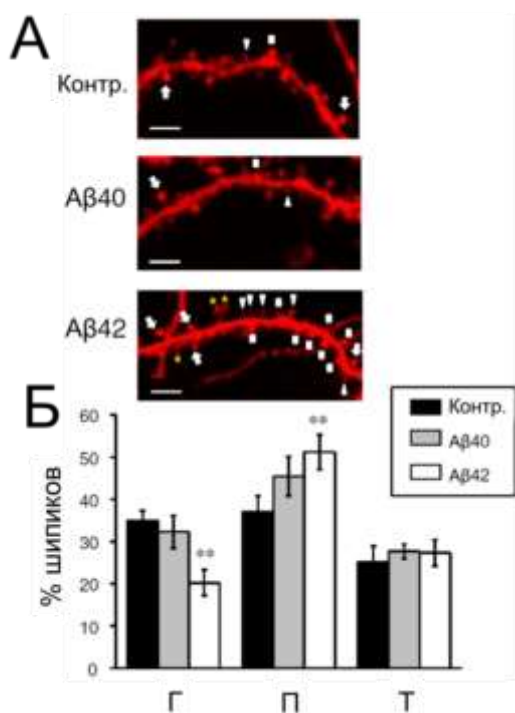


Рисунок 7 Амилоидные олигомеры вызывают гибель гиппокампальных грибовидных шипиков *in vitro*. (А) Репрезентативные конфокальные микрофотографии первичных нейронов гиппокампа для разных экспериментальных групп. (Б) Средний процент грибовидных (Г), пеньковых (П) и тонких (Т) шипиков в экспериментальных группах.

Таким образом, модель низкой амилоидной токсичности позволяет оценивать эффекты олигомерных бета-амилоидов на формирование дендритных шипиков, дестабилизация которых зависит от клеточной мишени – депо-управляемых кальциевых каналов.

2. Молекулярно-биологическое обоснование участия депо-управляемых кальциевых каналов в поддержании морфологии дендритных шипиков *in vitro* и *in vivo*.

2.1 Экспрессия сенсора концентрации ионов кальция в ЭПР – стромальной молекулы взаимодействия 2 - снижается в ответ на добавление амилоидных олигомеров *in vitro*.

Ранее (Sun et al. 2014; // *Neuron*;V: 82; P: 79-93) было показано, что количество грибовидных шипиков зависит от уровня экспрессии стромальной молекулы взаимодействия 2 (STIM2) и, следовательно, от STIM2-зависимого нейронального депо-управляемого входа кальция (нДУВК) и постоянной активности Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой протеинкиназы II (CaMKII).

Чтобы выяснить, влияет ли воздействие олигомерами амилоида бета на экспрессию белка STIM2 в культурах гиппокампа, мы провели серию экспериментов по вестерн-блоттингу с лизатами, приготовленными из контрольных культур, и культур, обработанных олигомерами A β 40 и A β 42 в концентрации 100нМ. В этих экспериментах наблюдали 20% снижение уровня экспрессии белка STIM2 в культурах, обработанных A β 40 и A β 42 (Рисунок 8 А, Б) и 30% снижение уровня экспрессии аутофосфорилированной формы CaMKII (pCaMKII) в культурах, обработанных A β 42 (Рисунок 8 А, Б). Уровни экспрессии белка STIM1 и уровни экспрессии общей CaMKII не менялись в культурах, обработанных A β 40 или A β 42 (Рисунок 8 А, Б). Примечательно, что избирательное снижение экспрессии STIM2 и снижение уровня экспрессии pCaMKII сходны с изменениями, наблюдавшимися в предыдущих экспериментах с нейронами PS1-M146V-KI (Sun et al. 2014; // *Neuron*;V: 82; P: 79-93), что позволяет предположить, что схожие сигнальные пути нарушаются в синаптических шипиках в условиях низкой амилоидной токсичности.

2.2 Гиперэкспрессия стромальной молекулы взаимодействия 2 защищает грибовидные шипики от синаптотоксического действия амилоидных олигомеров *in vitro*.

Показано, что экспрессия STIM2 и активация синаптического пути нДУВК приводят к восстановлению процента грибовидных шипиков в нейронах PS1-M146V-KI (Sun et al. 2014; // *Neuron*;V: 82; P: 79-93). Мы предположили, что данный сигнальный путь может быть включен в защиту грибовидных шипиков от амилоидной токсичности. Для подтверждения гипотезы совместно трансфецировали нейроны гиппокампа на DIV7 плазмидой, кодирующей экспрессию флуоресцентного белка TD-Tomato, и плазмидой, кодирующей мышинный STIM2 (mSTIM2). На DIV11 клетки обрабатывали олигомерами A β 42, а контрольные - равным количеством питательной среды. Нейроны были зафиксированы на DIV14, морфологию дендритных шипиков визуализировали на конфокальном микроскопе (Рисунок 9 А). Аналогично результатам, представленным на

рисунке 7 **Рисунок 7**, мы обнаружили, что добавление олигомеров A β 42 приводило к значительному сокращению процента грибовидных шипиков в нейронах гиппокампа (Рисунок 9 А, Б).

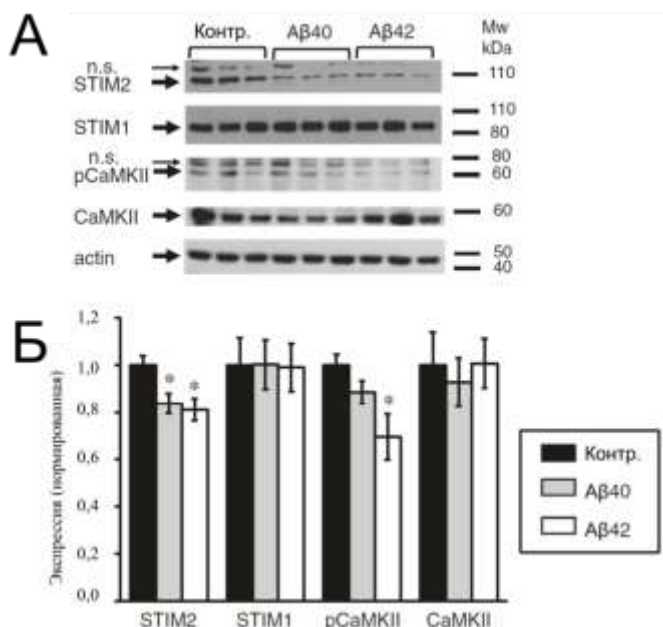


Рисунок 8 Экспрессия белков STIM2 и pCaMKII снижена в присутствии амилоида в культурах гиппокампа. (А) Уровни экспрессии белков STIM2, STIM1, pCaMKII и CaMKII анализировали с помощью метода Вестерн-блот. (Б) Количественное определение уровней экспрессии белков STIM2, STIM1, pCaMKII и CaMKII в культурах гиппокампа, подвергнутых воздействию амилоидных олигомеров.

Показано, что экспрессия STIM2 не влияет на процент грибовидных шипиков в контрольных культурах, но приводит к полному восстановлению процента грибовидных шипиков в культурах, обработанных A β 42 (Рисунок 9), что позволяет заключить, что гиперэкспрессия STIM2 может защитить грибовидные шипики гиппокампа от синаптотоксического действия A β 42.

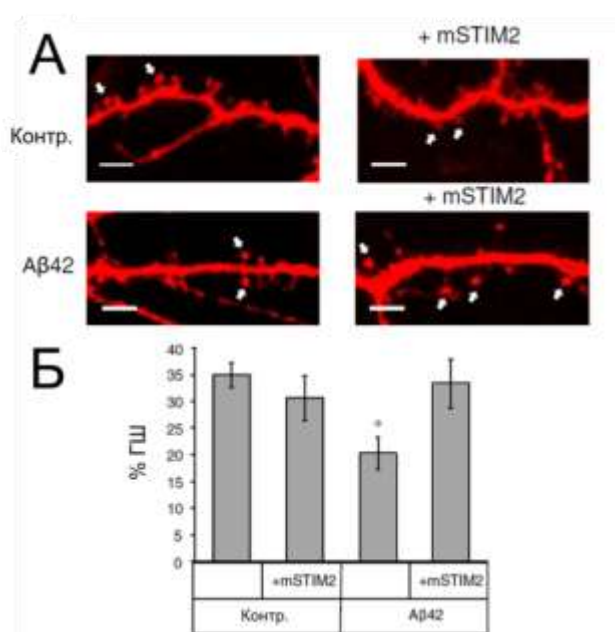


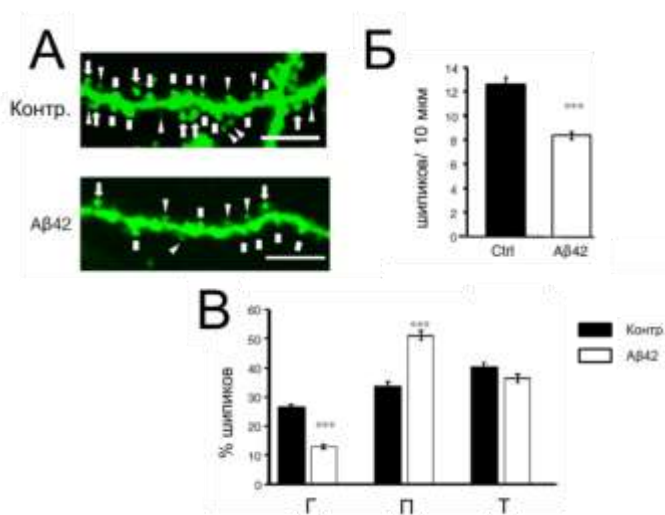
Рисунок 9 Гиперэкспрессия STIM2 защищает грибовидные шипики от амилоидной токсичности *in vitro*. (А) Первичные культуры гиппокампа совместно трансфицировали плазмидами TD-Tomato и mSTIM2 либо трансфицировали только TD-Tomato. (Б) Процент грибовидных шипиков (ГШ) в экспериментальных группах.

Таким образом, доказано, что в *in vitro* модели низкой амилоидной токсичности процент стабильных грибовидных шипиков зависит от уровня экспрессии белка резидента

ЭПР – STIM2. Гиперэкспрессия белка STIM2 может повысить активность деполуправляемых кальциевых каналов и защитить дендритные шипики от амилоидной токсичности *in vitro*.

2.3 Влияние амилоидных олигомеров на потерю грибовидных шипиков *in vivo*

Потеря грибовидных шипиков *in vivo* под влиянием амилоидных олигомеров исследована на мышах. Синтетические олигомеры A β 42, конъюгированные с флуоресцентной меткой Alexa-555, стереотаксически инъекцировали в дозе 5,4 мг/кг в область СА1 2-месячных мышей линии М (Thy1-GFP) (Feng et al. 2000; // *Neuron*;V: 28; P: 41-51). Мышам контрольной группы вводили вторичные антитела, конъюгированные с флуорофором Alexa-555. Через шесть недель после инъекций анализировали морфологию дендритных шипиков в срезах гиппокампа с помощью двухфотонной микроскопии. Установлено, что инъекция олигомеров A β 42 приводила к значительному снижению общей плотности дендритных шипиков. Процент грибовидных шипиков был значительно снижен, а доля пеньковых шипиков значительно увеличена в области СА1 (*stratum radiatum*) гиппокампа опытной группы по сравнению с контролем. Процент тонких шипиков не изменялся (Рисунок 10). Сдвиг от грибовидных к пеньковым шипикам, наблюдаемый в экспериментах в ответ на инъекцию олигомеров A β 42, аналогичен результатам, полученным в наших экспериментах с первичной культурой (Рисунок 7), и согласуется литературными данными (Tackenberg and Brandt 2009; // *J Neurosci*;V: 29; P: 14439-14450).



2.4 Инъекция олигомеров A β 42 вызывает подавление экспрессии стромальной молекулы взаимодействия 2 в гиппокампе *in vivo*. Влияние A β 42 на экспрессию белков *in vivo* проведено Вестерн-блот анализом лизатов гиппокампа мышей дикого типа после введения олигомеров A β 42 в дозе 5,4 мг/кг. В качестве контроля использовали мышей, которым инъекцировали вторичное антитело. В соответствии с данными, полученными на культуре нейронов гиппокампа, мы наблюдали 20% снижение уровня экспрессии белка

STIM2 в гиппокампе мышей, которым инъецировали олигомеры Aβ42 в дозе 5,4 мг/кг. Также в соответствии с данными, полученными на культуре клеток (Рисунок 8), мы наблюдали 45% снижение уровня экспрессии pCaMKII после инъекции олигомеров Aβ42 в гиппокамп мышей (Рисунок 11). Уровень экспрессии белка STIM1 был снижен менее чем на 5%, а уровень общей CaMKII не изменялся у мышей, которым инъецировали Aβ42. Уровень экспрессии белка PSD95 также снижался на 40% в гиппокампе мышей, которым инъецировали Aβ42. Статистически значимое снижение уровней экспрессии белков PSD95 и pCaMKII в экспериментах на мышях линии М согласуется с потерей грибовидных шипиков в нейронах гиппокампа мышей, которым инъецировали олигомеры Aβ42, и с ранее опубликованными данными на мышях PS1-M146V-KI (Sun et al. 2014; // Neuron;V: 82; P: 79-93).

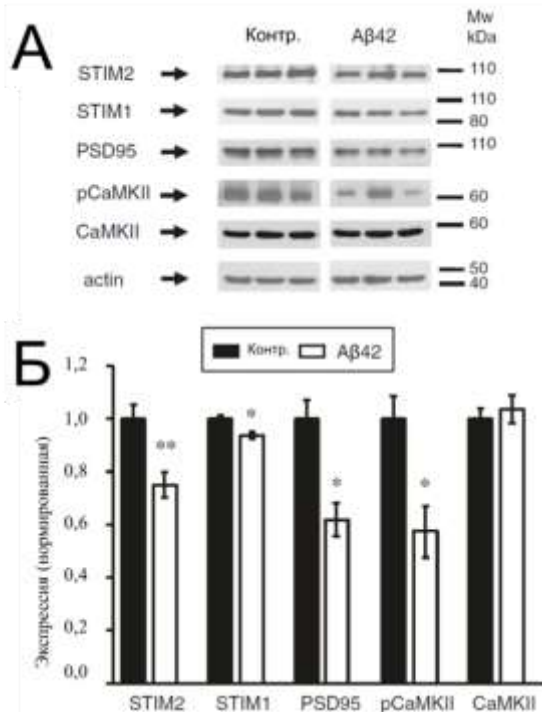


Рисунок 11 Экспрессия белков STIM2, PSD95 и pCaMKII подавляются у мышей, которым в СА1 область гиппокампа инъецировали Aβ42 дозе 5,4 мг/кг. (А) Вестерн-блот анализ экспрессии белков STIM2, STIM1, PSD95, pCaMKII, CaMKII и actin в лизатах из гиппокампов мышей контрольной группы, группы инъецированной Aβ42 (Б) Количественный анализ экспрессии белков в экспериментальных группах.

2.5 Гиперэкспрессия стромальной молекулы взаимодействия 2 защищает грибовидные шипики от амилоидной токсичности *in vivo*. Для оценки потенциальных нейропротекторных эффектов гиперэкспрессии STIM2 *in vivo*, проведены стереотаксические инъекции вируса AAV1-mSTIM2 вместе с олигомерами Aβ42-Alexa555 в дозе 5,4 мг/кг в область СА1 гиппокампа 2-месячных мышей линии М. Контрольным мышам вводили AAV1-mSTIM2 вместе с вторичными антителами. Морфологию дендритных шипиков в области СА1 анализировали с помощью двухфотонной микроскопии с использованием срезов головного мозга гиппокампа через шесть недель после инъекции (Рисунок 12 А). Мы обнаружили, что инъекция олигомеров Aβ42 приводит к значительной потере плотности шипиков (Рисунок 12 Б) и сокращению процента

грибовидных шипиков (Рисунок 12 В). Гиперэкспрессия белка STIM2 не влияла на общую плотность дендритных шипиков и на процент грибовидных шипиков в контрольных экспериментах, но приводила к полному восстановлению сниженной плотности шипиков и процента грибовидных шипиков, вызванной олигомерами Aβ42 (Рисунок 12 Б, В). Для дальнейшего подтверждения полученных результатов мы провели Вестерн-блот анализ лизатов гиппокампа у этих мышей (Рисунок 13). Было выявлено, что экспрессия STIM2 предотвращает снижение уровня экспрессии белков PSD95 и pCaMKII в гиппокампальной области мышей инъецированных Aβ42 (Рисунок 13 А, Б).

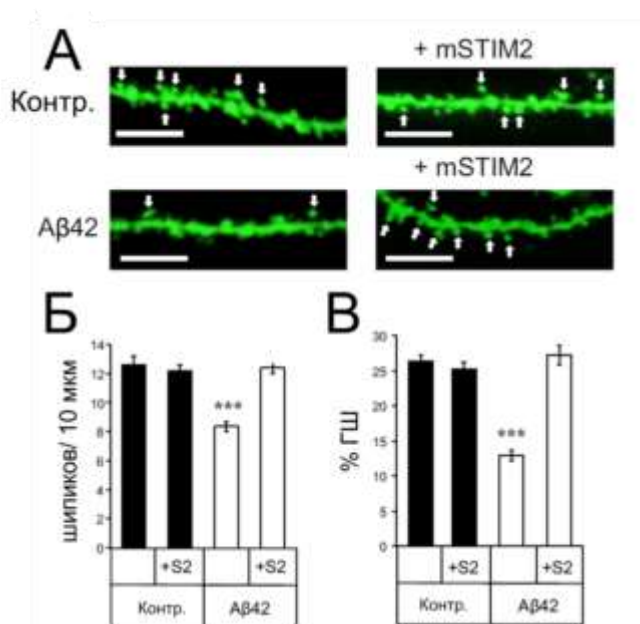


Рисунок 12 Гиперэкспрессия STIM2 защищает грибовидные шипики от амилоидной токсичности *in vivo*. (А) Морфология дендритных шипиков в CA1 области нейронов гиппокампа у мышей линии М в возрасте 3,5 мес, которым инъецировали AAV1-mSTIM2 (+mSTIM2) в отсутствие (Контр.) / присутствии Aβ42. (Б, В) Общая плотность шипиков и процентные доли грибовидных шипов (ГШ) в CA1 области нейронов гиппокампа в экспериментальных группах.

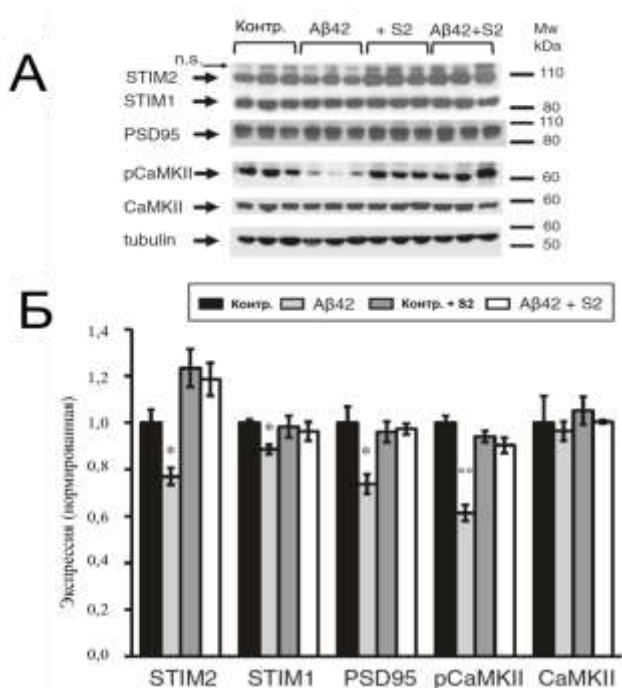


Рисунок 13 Гиперэкспрессия STIM2 восстанавливает уровни экспрессии белков PSD95 и pCaMKII в условиях амилоидной токсичности *in vivo*. (А) Вестерн-блот анализ экспрессии белков STIM2, STIM1, PSD95, pCaMKII, CaMKII и tubulin в лизатах из гиппокампов мышей контрольной группы, группы инъецированной Aβ42, а также присутствии/отсутствии гиперэкспрессии белка STIM2 (+S2). (Б) Количественный анализ экспрессии белков в экспериментальных группах.

2.6 Регуляция уровня экспрессии гена стромальной молекулы взаимодействия 2 методами генетической инженерии влияет на число амилоидных бляшек в коре головного мозга мышей линии 5xFAD.

Мыши линии 5xFAD рассматриваются в качестве модели болезни Альцгеймера с агрессивным фенотипом, проявляющимся накоплением амилоидных бляшек и нарушением когнитивных функций мозга к 4-му месяцу жизни (Oakley et al. 2006; // J Neurosci; V: 26; P: 10129-10140). Для анализа уровня экспрессии эндогенной STIM2 в гиппокампе мышей линии 5xFAD использовали метод Вестерн блота. Для оценки синаптогенеза в гиппокампе трансгенных мышей исследовали экспрессию белка постсинаптической плотности 95 (PSD95). Для сравнения возрастных изменений получены данные для 4- и 6-ти месячных мышей. Контрольным экспериментом служила экспрессия исследуемых белков в лизатах гиппокампа мышей дикого типа того же возраста. Выявлено снижение экспрессии исследуемых белков у всех трансгенных мышей линии 5xFAD, но у 6-месячных мышей это снижение выражено сильнее, особенно для белка STIM2. У 4-месячных трансгенных мышей линии 5xFAD экспрессия белка STIM2 снижена на 20% по сравнению с контрольной группой. Для этой группы была также обнаружена тенденция к снижению уровня экспрессии белка PSD95 (Рисунок 14 Б). У мышей 5xFAD в возрасте 6 месяцев экспрессия белка STIM2 снижалась более чем на 75%, а экспрессия белка PSD95 на 50%. Таким образом, доказано, что путь STIM2–нДУВК также нарушен в модели нБА, мышцах линии 5xFAD.

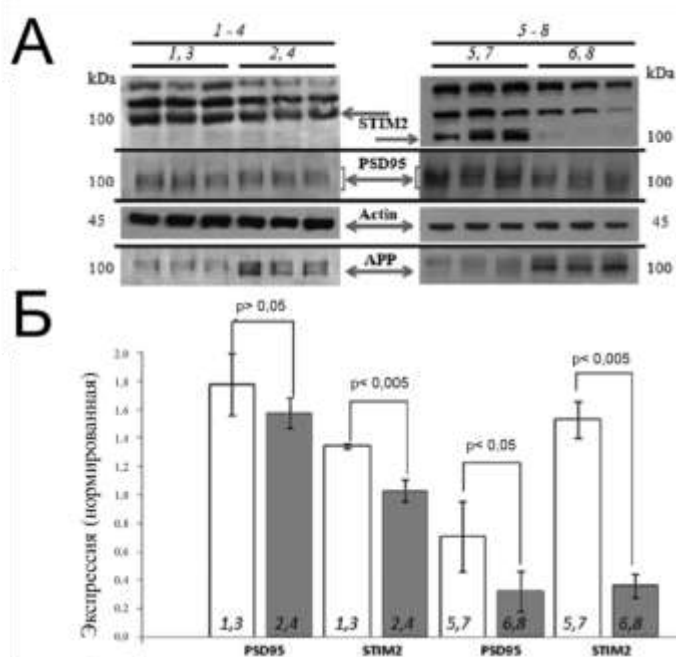


Рисунок 14
Экспериментальные данные
Вестерн-блот анализа
экспрессии четырех белков
(STIM2, PSD95, Actin и APP) (А)
результаты их количественного
анализа (Б). Экспрессия
проанализирована в
гиппокампальных лизатах 4-
(номера 2,4) и 6-(6,8) месячных
мышей 5xFAD и особей того же
возраста из контрольной группы
(1,3 и 5,7 соответственно).

2.7 Гиперэкспрессия стромальной молекулы взаимодействия 2 снижает количество амилоидных бляшек в коре головного мозга мышей линии 5xFAD. Ранее в исследованиях на PS1-M146V, APPKI моделях нБА, было показано, что гиперэкспрессия белка STIM2 восстанавливает путь STIM2-нДУВК (Sun et al. 2014; // Neuron;V: 82; P: 79-93; Zhang, Wu et al. 2015; // J Neurosci;V: 35; P: 13275-13286), тем самым предотвращает синаптическую потерю и замедляет развитие болезни. Для того чтобы изучить, может ли гиперэкспрессия белка STIM2 замедлить развитие БА у мышей линии 5xFAD, были проведены эксперименты, в которых гиперэкспрессия STIM2 в гиппокампе достигалась при помощи стереотаксической инъекции вируса AAV2/1CMVSTIM2WThrGFP в область CA1 гиппокампа двухмесячных мышей. В качестве контроля использовали вирус AAV2/1CMVNLS-GFP. Через шесть недель, у мышей в возрасте 3,5 месяцев, анализировали количество амилоидных бляшек при помощи иммуногистохимического окрашивания тонких срезов мозга (Рисунок 15). Установлено, что гиперэкспрессия белка STIM2 в три раза снижает количество Аβ-бляшек в коре головного мозга трансгенных мышей линии 5xFAD. Таким образом, получены экспериментальные данные, демонстрирующие, что методами генетической инженерии можно влиять на содержание амилоидных бляшек в коре головного мозга мышей линии 5xFAD, что косвенно указывает на перспективы регуляции активности STIM2-нДУВК для достижения терапевтического эффекта.

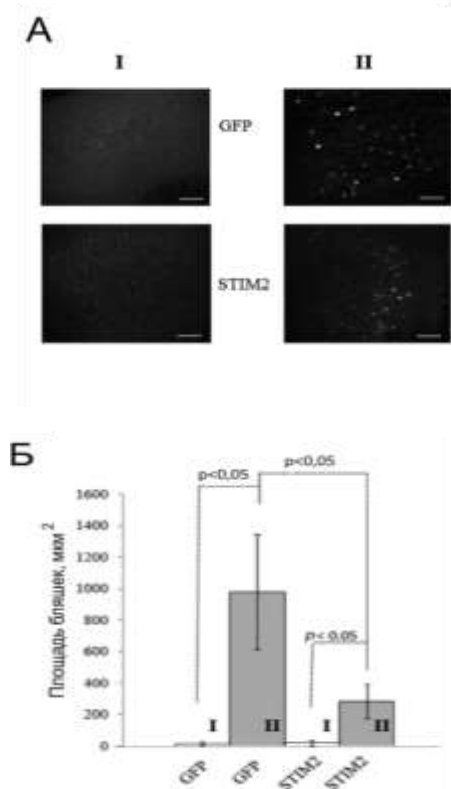


Рисунок 15 Влияние гиперэкспрессии белка STIM2 на образование амилоидных бляшек в мозге 3,5-мес. мышей. (А) примеры иммуногистохимического окрашивания срезов у мышей I (мыши дикого типа) и II (5xFAD), инжесктированных в 2-мес. возрасте вирусами AAV2/1CMVNLS-GFP (GFP) и AA V2/1CMVSTIM2WThrGFP (STIM2); (Б) сравнение площадей, занимаемых бляшками на изучаемых областях, для мышей I и II.

В модели амилоидной токсичности *in vivo* были получены схожие с *in vitro* экспериментами результаты о роли кальциевой дисрегуляции в поддержании стабильных

шипики в гиппокампе мышей. Показано, что гиперактивация нДУВК может защитить дендритные шипики от амилоидной токсичности *in vivo*.

Таким образом, разработанная модель амилоидной токсичности *in vivo* позволила обосновать фармакологическую мишень потенциальных средств патогенетической фармакотерапии БА – депо-управляемые кальциевые каналы на дендритных шипиках в нейронах гиппокампа.

3. Фармакологический анализ целесообразности коррекции кальциевой дисрегуляции в нейронах гиппокампа для лечения болезни Альцгеймера

3.1 Нейропротекторные свойства соединения N17 в *in vitro* модели амилоидной синаптотоксичности.

Соединение N17 - бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия}бутандиоата было разработано в Санкт-Петербургском химико-фармацевтическом университете под руководством д.м.н., проф. С.В. Оковитого. Соединение N17 состоит из этилового производного аминокэтанола к которому присоединены молекулы бутандиовой и транс-этилен-1,2-дикарбоновой кислот. Аминокетанол, являясь прекурсором холина, обеспечивает синтез ацетилхолина и фосфатидилхолина нейрональных мембран и повышает биодоступность кислот в (Freeman et al. 1976; // Life Sci; V: 19; P: 949-961).

Бутандиовая кислота реализует свои эффекты через специфические рецепторы (SUCNR1) на глиальных клетках, а также повышают устойчивость нейронов к гипоксии через метаболические пути, в первую очередь, энергопродуцирующие (Оковитый и др. 2015; // Химико-фармацевтический журнал; Т: 49; С: 3-7). Кроме того, бутандиовая и транс-этилен-1,2-дикарбоновая кислоты способствуют восполнению фонда сукцината и fumarата в цикле Кребса и увеличению образования АТФ в клетках. Показаны антиастенические, ноотропные и актопротекторные свойства N17.

В настоящей работе нейропротекторные свойства соединения N17 изучены в *in vitro* модели амилоидной синаптотоксичности и выявлены в концентрации 1 мкМ. Минимально действующей установлена концентрация N17 в наномолярном диапазоне – 100 нМ. Референсное соединение гиперфорин по данным (Zhang et al. 2016; // J Neurosci; V: 36; P: 11837-11850) проявляет нейропротекторное действие в концентрации 300 нМ, которая и была применена в наших опытах. Выявлено, что N17 защищает грибовидные шипики от амилоидной токсичности, восстанавливая процент грибовидных шипиков в группе с A β 42 с 20,9 \pm 1,6% до 39 \pm 1,6% (процент близкий к контрольному значению) (Рисунок 16).

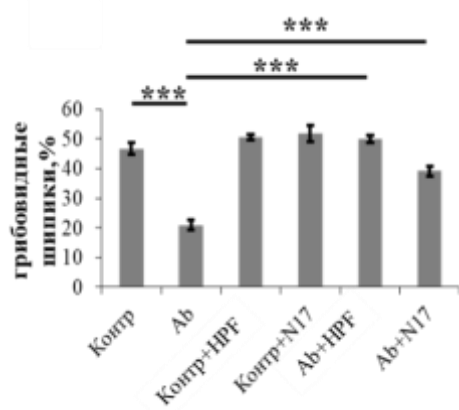


Рисунок 16 Соединение N17 обладает нейропротекторными свойствами, защищая грибовидные шипики от амилоидной токсичности, в концентрации 100нМ.

3.2 Соединение N17 активирует нейрональный депо-управляемый вход кальция в нейронах гиппокампа *in vitro*. Для анализа механизмов нейропротекторного действия соединения N17 исследовали его способность активировать нейрональный депо-управляемый вход кальция в дендритных шипиках в условиях амилоидной синаптотоксичности *in vitro*. Для сравнения эффективности с референсным соединением концентрация N17 в экспериментах по кальциевому имиджингу также составляла 300 нМ. Время инкубации нейронов с исследуемыми соединениями составляло 30 мин при комнатной температуре. Исследуемые соединения находились в растворе искусственной спинномозговой жидкости на протяжении всего эксперимента. На рисунке 17 приведен сравнительный анализ изменений амплитуды нейронального депо-управляемого входа кальция (F/F_0 пик) в исследуемых группах. Аβ42 снижал амплитуду нДУВК с $5,6 \pm 0,5$ у.е. до $3,6 \pm 0,6$ у.е. Гиперфорин восстанавливал данный параметр в группе нейронов с Аβ42 с $3,6 \pm 0,6$ у.е. до $6,75 \pm 0,4$ у.е. Показано, что соединение N17 является положительным регулятором нДУВК, восстанавливая амплитуду нейронального депо-управляемого входа кальция в группе нейронов с Аβ42 с $3,6 \pm 0,6$ у.е. до $6,1 \pm 1,0$ у.е. Таким образом, обнаружено, что соединение N17 по показателю восстановления нейронального депо-управляемого входа кальция в постсинаптических шипиках, подвергнутых синаптотоксическому действию амилоида имеет схожую с референсным соединением активность.

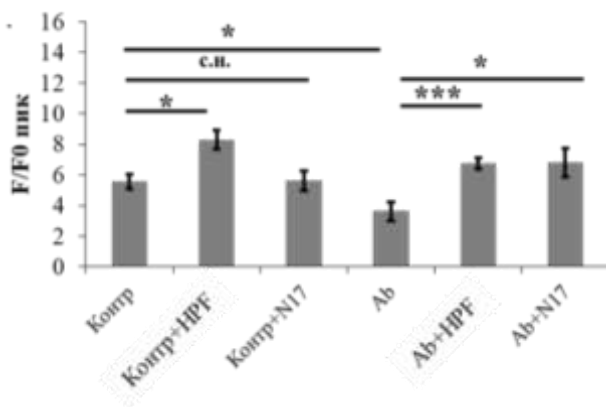


Рисунок 17 Исследование влияния соединения N17 в концентрации 300 нМ на нейрональный депо-управляемый вход кальция в условиях амилоидной синаптотоксичности.

3.3 Соединение N17 улучшает показатели краткосрочной памяти у крыс в тесте «лабиринт Барнс» при моделировании ишемии головного мозга. Результаты получены совместно с к.б.н., доцентом кафедры фармакологии и клинической фармакологии, Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета Ю.И. Сысоевым. Перекрытие кровотока в течение часа по бассейну среднемозговой артерии приводит к ухудшению показателей краткосрочной и долгосрочной памяти у крыс (Сысоев и др. 2019; // Экспериментальная и клиническая фармакология Т: 82; С: 3-10). На следующий день после ишемии наблюдалось достоверное увеличение времени нахождения животными targetbox, а также повышение количества ошибок по сравнению с контролем на 1-й и 7-й день, соответственно (Рисунок 18 и 19). N17 вводили в дозе 10 мг/ кг, внутривенно, выбранной на основании ранее полученных данных (Титович и др. 2017; // Экспериментальная и клиническая фармакология Т: 80; С. 3-6). N17 вводили через 1 ч после реперфузии и далее в течение 7 дней в одно и тоже время. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор в эквивалентных количествах (1 мл/200г массы). Установлено, что N17 в первые сутки после окклюзии среднемозговой артерии достоверно снижает ($p=0,0023$) количество ошибок при нахождении targetbox (Рисунок 18), что свидетельствует об улучшении кратковременной памяти подопытных животных.

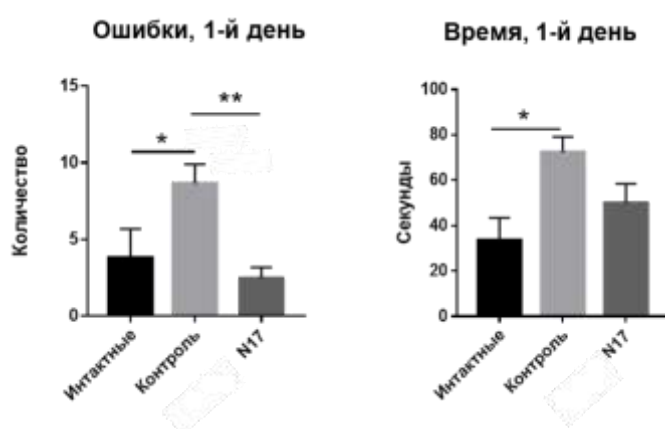


Рисунок 18 Количество ошибок и время нахождения targetbox животными на 5-е сутки эксперимента (1-й день после ишемии), характеризующие кратковременную память.

На 7-й день после ишемии в группе животных, которые получали N17, зарегистрирована лишь тенденция к уменьшению ошибок и времени нахождения targetbox в тесте «лабиринт Барнс» (Рисунок 19).

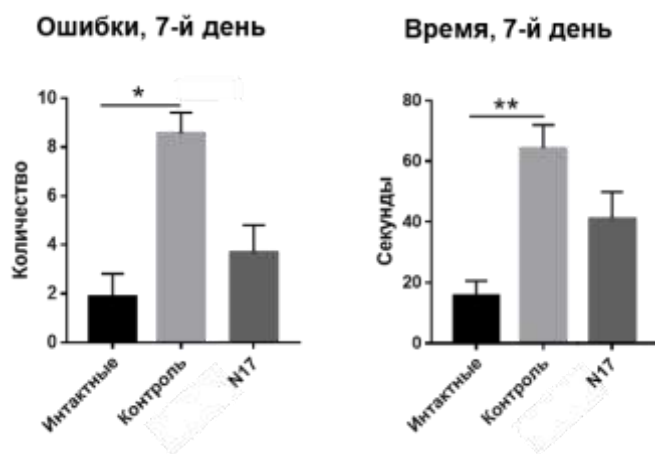


Рисунок 19 Количество ошибок и время нахождения targetbox животными на 12-е сутки эксперимента (7-й день после ишемии), характеризующие долговременную память.

Кроме того, статистически значимых различий в проценте животных, нашедших targetbox, в дни тестирования между группами интактных и контрольных животных обнаружить не удалось (Таблица 1).

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

Группа	1-й после ишемии		7-й после ишемии	
	выжившие	нашедшие targetbox	выжившие	нашедшие targetbox
Интактные	10/10	8/10	10/10	9/10
Контроль	11/13	6/11	9/13	7/9
N17	15/18	10/15	12/18	10/12

4 Поиск и анализ нейропротекторной активности фармакологически активных химических соединений - модуляторов нейронального депо-управляемого входа кальция

Ранее идентифицирована молекула - положительный модулятор активности каналов TRPC6 в составе нейронального депо-управляемого входа кальция в гиппокампе мышей. Соединение, N- {4- [2- (6-аминохиназолин-4-иламино) этил] фенил} ацетамид (NSN21778), восстанавливало синаптические дендритные шипики и долговременную потенциацию в срезах мозга трансгенных мышей линий PS1-M146V и APP-KI (Zhang et al. 2016; // J Neurosci;V: 36; P: 11837-11850), однако оказалось фармакокинетически непригодным (Zhang et al. 2016; // J Neurosci;V: 36; P: 11837-11850).

Поэтому в настоящем исследовании была поставлена задача поиска положительных модуляторов каналов TRPC6, отличных по химической структуре от описанных в литературе агонистов каналов TRPC6 (NSN21778, гиперфорин, PPZ1/ PPZ2). На первом этапе использованы базы данных химических соединений и методы биоинформатики. Далее фармакологический анализ нейропротекторной активности проведен на основе методов молекулярной биологии и электрофизиологии в срезах мозга трансгенных мышей.

4.1 Биоинформатический поиск активаторов каналов TRPC6.

Из базы данных Intergrity (Clarivate Analytics) отобрано шесть потенциальных активаторов каналов TRPC6. Поскольку большинство этих молекул, кроме НУР-9, оказались недоступными для экспериментального тестирования поиск соединений по химическим структурам выполнен в публичных химических библиотеках. В химической библиотеке InterBioScreen (г. Черноголовка) выявлено несколько аналогов и, исходя из высокого процента (88% и более) совпадений со структурами известных агонистов каналов TRPC6, отобрано четыре соединения-кандидата, которые приведены на рисунке Рисунок 20.

Используя биоинформатическую программу PASS, мы оценили биологическую активность, токсичность и мутагенность НУР-9 и трех соединений из базы данных InterBioScreen (соединения 64402, 50741 и 51164). Все четыре соединения показали способность активировать потенциал чувствительные кальциевые каналы со значениями P_a в диапазоне от 0,49 до 0,624, с максимальным значением для соединения 51164 и минимальным для соединения 50741. По программе PASS предположена также другая биологическая активность – активатор кальциевых каналов с вероятностью в диапазоне от 0,22 до 0,368 и максимальным значением для соединения 51164, а минимальным - для Нур9. Программное обеспечение PASS Online позволяет оценить возможные побочные и токсические эффекты изучаемых соединений. Для соединений 50741 и 51164 не прогнозируется негативное воздействие на сердечно-сосудистую, дыхательную системы, канцерогенность, значения P_a вблизи 0,2. Однако для соединения 51164 предсказывается возможность желудочно-кишечных геморрагических повреждений, полиорганной недостаточности со значениями P_a в диапазоне от 0,56 до 0,78. Соединение 50741 обладает, согласно прогнозам, умеренными побочными действиями, демонстрируя $P_a = 0,38$ для желудочно-кишечного кровотечения и $P_a = 0,39$ для полиорганной недостаточности. Для соединений Нур9 и 64402 предсказывается умеренная канцерогенность и кардиодепрессивная активность со значениями P_a в диапазоне от 0,30 до 0,49. Кроме того, соединения Нур9 и 64402 демонстрируют выраженные токсические эффекты, такие как желудочно-кишечные кровотечения и полиорганная недостаточность со значениями P_a в диапазоне от 0,60 до 0,88 (таблицы 2 и 3).

Таблица 2 Механизм действия соединений – положительных модуляторов каналов TRPC6 прогнозируемый веб-сервисом PASS Online.

Mechanism of Action	Compound Number							
	Hyp9		64402		50741		51164	
Structure identity (%)	100	100	91.82	91.82	90.24	90.24	88.12	88.12
Analog	Hyp9	Hyp9	HYP1	HYP1	880395	880395	871099	871099
Activity	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i
Calcium channel (voltage-sensitive) activator	0.540	0.052	0.546	0.048	0.494	0.083	0.624	0.017
Neuropeptide Y2 antagonist	0.229	0.159	0.217	0.177	0.571	0.008	0.629	0.004
Sigma receptor agonist	0.157	0.146	0.198	0.135	0.288	0.082	0.484	0.028
Calcium channel activator	0.224	0.104	0.291	0.038	0.338	0.026	0.368	0.018
Acetylcholine neuromuscular blocking agent	—	—	0.599	0.023	0.484	0.084	0.481	0.087

—, no data available.

Таблица 3 Побочные и токсические эффекты соединений – положительных модуляторов каналов TRPC6 прогнозируемые веб-сервисом PASS Online.

Adverse and Toxic Effect	Compound Number							
	Hyp9		64402		50741		51164	
Activity	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i
Gastrointestinal hemorrhage	0.695	0.026	0.714	0.021	0.389	0.157	0.615	0.050
Multiple organ failure	0.600	0.060	0.677	0.037	0.394	0.156	0.762	0.018
Toxic vascular/respiration	0.798v	0.018v	0.885r	0.019r	0.096v	0.403v	0.254v	0.241v
Carcinogenic. group 1	0.306	0.055	0.357	0.033	0.115	0.401	0.200	0.161
Cardiodepressant	0.491	0.021	0.455	0.026	0.044	0.342	0.196	0.145
Carcinogenic. group 2A	0.155	0.099	0.198	0.064	0.057	0.242	0.169	0.087

r, respiration; v, vascular.

4.2 Скрининговые исследования *in vitro* фармакологической активности соединений – потенциальных агонистов каналов TRPC6. В настоящем разделе для исследования использовали *in vitro* модель амилоидной синаптотоксичности, на которой проверяли нейропротекторные свойства соединений, выбранных с помощью методов биоинформатики (Рисунок 20).

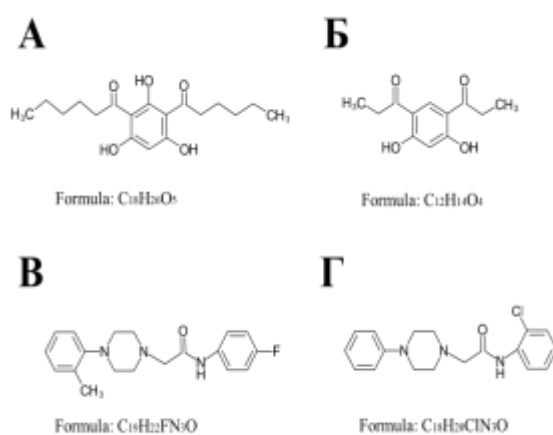


Рисунок 20 Химические структуры потенциальных положительных модуляторов каналов TRPC6 обнаруженные с помощью методов биоинформатики. (А) НУР-9 (1,1'-(2,4,6 - Trihydroxybenzene - 1,3 - diyl)dihexan - 1 - one), (Б) соединение 64402 (1,1'-(4,6-dihydroxy-1,3-phenylene)bis(propan-1-one)), (В) соединение 50741 (N-(4-fluorophenyl)-2-(4-(o-tolyl)piperazin-1-yl)acetamide), и (Г) соединение 51164 (N-(2-chlorophenyl)-2-(4-phenylpiperazin-1-yl)acetamide). Соединения 64402, 50741, и 51164 были найдены в химической библиотеке InterBioScreen, Черногловка.

В качестве положительного контроля был использован HPF, поскольку ранее показано, что HPF в концентрации 30нМ защищает грибовидные шипики в мышинной модели БА, APP-КИ нейронах (Zhang et al. 2016; // J Neurosci;V: 36; P: 11837-11850) и является прямым активатором каналов TRPC6 (Leuner et al. 2007; // FASEB J;V: 21; P: 4101-4111). В условиях амилоидной токсичности установлено, что соединения НУР9 и 64402 не восстанавливают процент грибовидных шипиков. Среди отобранных программой PASS соединений оказались производные пиперазина, демонстрирующие нейропротекторные свойства в *in vitro* модели амилоидной синаптотоксичности. Соединение 50741 в зависимости от концентрации проявило нейропротекторные свойства в концентрациях 10 и 30 нМ, восстанавливая процент грибовидных шипиков в группе нейронов, обработанных Аβ42 с 21%±10% до 37% ±2% и 47% ± 2%, соответственно (p< 0,0001 по двухфакторному ANOVA с последующим тестом по Dunn-Sidak, n =46 из трех независимых культур). Снижение концентрации соединения 50741 до 1 нМ вело к потере защитного действия от токсичности Аβ42 [%ГШ в группе Аβ42 + 1нМ 50741 составлял 22% ± 2%, n = 46 нейронов]. Соединение 51164 также в концентрациях от 10 нМ до 30 нМ восстанавливало процент грибовидных шипиков в условиях амилоидной токсичности *in vitro* (Рисунок 21). Процент грибовидных шипиков, восстановленный после добавления 51164 в концентрации 10 нМ, составил 49% ± 1% в группе Аβ42 + 10нМ 51164, n = 46 нейронов, что на 12% выше, чем в группе Аβ42 + 10 нМ 50741. В низкой концентрации 1 нМ соединение 51164 не проявляло нейропротекторных свойств [%ГШ в группе Аβ42 + 1нМ 51164 составлял 23% ± 2%, n = 46 нейронов] (Рисунок 21). Сравнение нейропротекторных влияний соединений 50741 и 51164 привело к заключению, что эффект соединения 51164 более выражен, что определило выбор его в качестве лидера для дальнейших исследований (Рисунок 21). Кроме того, соединение 51164 демонстрировало умеренные токсические свойства в биоинформатической программе PASS (Таблица 3).

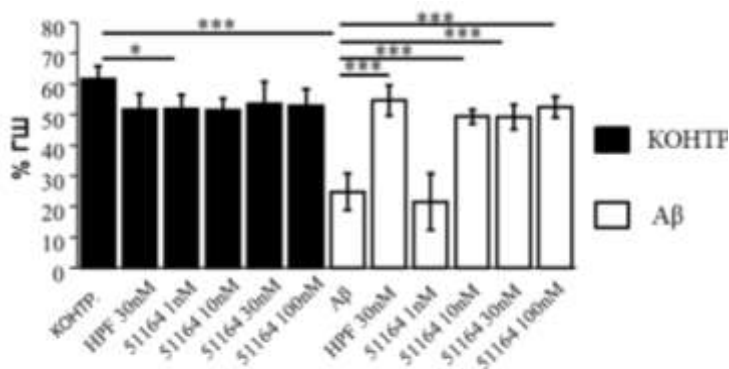


Рисунок 21 Оценка нейропротекторных свойств соединения 51164 в условиях амилоидной синаптотоксичности. Средний процент грибовидных шипиков (%ГШ) в каждой экспериментальной группе.

4.3 Исследование каналов TRPC6 в качестве фармакологической мишени соединения

51164. Соединение 51164 является аналогом известного активатора TRPC6 канала - производного пиперазина (PPZ) - 871099 (Sawamura et al. 2016; // Mol Pharmacol;V: 89; P: 348-363). Исходя из этих данных, необходимо было исследовать, является ли соединение 51164 активатором каналов TRPC6. Выделяют два основных механизма активации каналов TRPC. Первый механизм – рецептор зависимый – включает в себя активацию TRPC6 вторичным посредником, диацилглицеролом (DAG), который образуется в результате активации фосфолипазы С G-белком. Данный механизм считается независимым от внутриклеточных запасов кальция, в частности от концентрации кальция в ЭПР (Hofmann et al. 1999; // Nature;V: 397; P: 259-263). В литературе показано, что соединения 871099 и гиперфорин активируют каналы TRPC6 по рецептор-зависимому пути (Leuner, Kazanski et al. 2007; // FASEB J;V: 21; P: 4101-4111; Sawamura, Hatano et al. 2016; // Mol Pharmacol;V: 89; P: 348-363). Мы обнаружили, что в стандартных условиях записи (присутствие 2мМ внеклеточного Ca^{2+}) добавление 51164 не вызывало кальциевых ответов в НЕК клетках экспрессирующих TRPC6 (Рисунок 22 А). Таким образом, 51164 не активирует TRPC6 по рецептор-зависимому пути.

Существует другой путь активации каналов TRPC6, через опустошение запасов кальция в депо ЭПР, когда инозитол 1,4,5-трифосфат или какой-либо другой сигнал выводит Ca^{2+} из внутриклеточного депо (Dietrich et al. 2014; // Handb Exp Pharmacol;V: 222; P: 157-188). Однако у фармакологических агентов встречаются смешанные пути активации каналов TRPC6. Так, соединение NSN21778 активирует TRPC6 в условиях опустошения депо ЭПР и в присутствии вещества OAG - проникающего через мембрану синтетического аналога клеточного DAG (Estacion et al. 2004; // J Biol Chem;V: 279; P: 22047-22056; Zhang et al. 2016; // J Neurosci;V: 36; P: 11837-11850). Поэтому выполнено исследование возможного сходства эффекта соединения 51164 с NSN21778. С этой целью клетки НЕК293, трансфицированные плазмидами, экспрессирующими EGFP или EGFP + TRPC6, инкубировались в условиях частичного опустошения депо ЭПР (присутствие 0,1 мМ внеклеточного Ca^{2+}) в течение 2 минут, а затем внеклеточную среду заменяли на раствор, содержащий 2 мМ Ca^{2+} в присутствии 50 мкМ OAG. Воздействие 50 мкМ самого OAG не вызывало вход Ca^{2+} в EGFP-трансфицированные НЕК клетки, наблюдался слабый ответ как на воздействие 50 мкМ OAG, так и при воздействии 30 мкМ 51164. Амплитуда ответа не увеличивалась (Рисунок 22 В, Г). Однако TRPC6-экспрессирующие клетки НЕК отвечали на воздействие 50 мкМ OAG в условиях частичного опустошения депо ЭПР (Рисунок 22 Г) со средней амплитудой ответа равной $0,25 \pm 0,025$ у.е. ($n = 239$) (Рисунок 22 Г). Воздействие соединением 51164 в концентрации 30мкМ усиливало кальциевый ответ в TRPC6-

экспрессирующих НЕК клетках (Рисунок 22 В, Г) со средней амплитудой ответа равной $0,45 \pm 0,05$ у.е. ($n=214$) (Рисунок 22 В, Г), что было достоверно выше чем в отсутствие соединения 51164. Таким образом, полученный результат позволяет заключить, что соединение 51164 действует как положительный модулятор каналов TRPC6, то есть, по механизму, аналогичному соединению NSN21778.

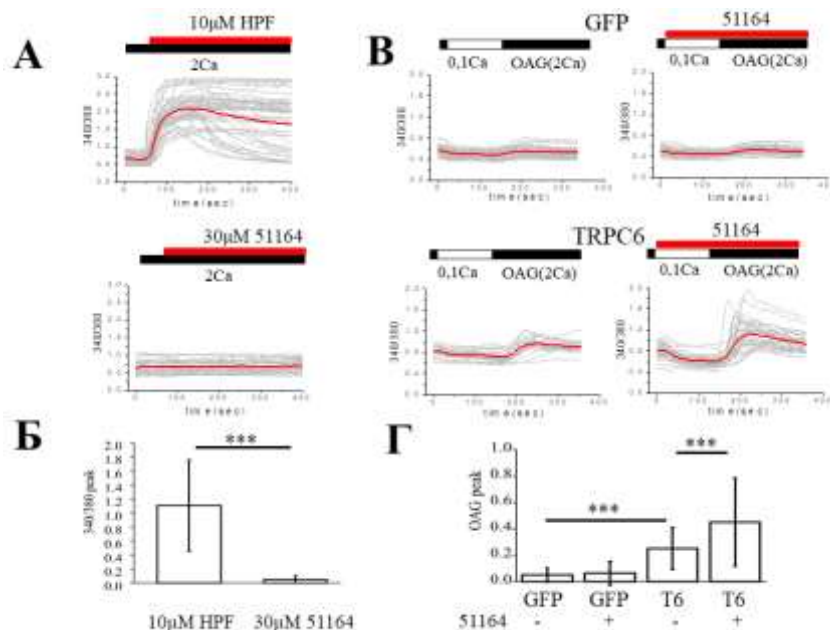


Рисунок 22 Соединение 51164 действует как положительный модулятор каналов TRPC6. (А, В) Графики временной зависимости изменения флуоресценции кальций чувствительной краски Fura-2 (отношение 340/380) показан для клеток HEK293, трансфицированных плазмидами EGFP + TRPC6 подвергшихся воздействию либо HPF, либо 51164. (Б, Г) Сравнительный анализ изменения амплитуды кальциевого ответа (OAG пик) для каждой группы клеток, протестированных в экспериментах А, В.

4.4 Соединение 51164 восстанавливает депо-управляемый вход кальция в нейронах гиппокампа в условиях амилоидной синаптотоксичности. Чтобы выяснить, активирует ли соединение 51164 эндогенный нДУВК, выполнены эксперименты по визуализации кальциевых ответов в культурах гиппокампа трансфицированных плазмидой экспрессирующей GCamp5.3. В день эксперимента покровные стекла с нейронами инкубировали в среде без Ca^{2+} в присутствии блокаторов кальциевых каналов в течение 30 минут. Кальциевый ответ (нДУВК) в шипиках вызывался добавлением во внеклеточную среду 10 мМ Ca^{2+} . Обнаружено, что соединение 51164 не изменяло амплитуду нДУВК в контрольной группе нейронов, в то время как примененный в качестве положительного контроля гиперфорин достоверно повышал амплитуду нДУВК (Рисунок 23 Б, К). Добавление в культуру нейронов Аβ42 приводило к снижению средней амплитуды нДУВК до 4 ± 1 у.е. ($n = 60$ шипиков от трех независимых культур) (Рисунок 23 Г, К), что достоверно ниже, чем в контрольной группе клеток ($p < 0,01$ по Kruskal-Wallis ANOVA).

Инкубация нейронов с соединением 51164 в концентрации 300нМ, как и с 300нМ гиперфоринном, восстанавливала амплитуду нДУВК в нейронах гиппокампа (Рисунок 23 Е). Средняя амплитуда нДУВК в присутствии соединения 51164 составила 6 ± 1 у.е. ($n = 60$ шипиков из трех независимых культур) (Рисунок 23 К), достигая уровня контрольных значений ($p < 0,05$ по Kruskal-Wallis ANOVA). Для дальнейшего подтверждения способности соединения 51164 модулировать TRPC6-зависимый нДУВК нейрональные культуры трансфецировали с плазмидой, экспрессирующей TRPC6 специфичную shРНК (Т6sh). Обнаружено, что в отсутствие каналов TRPC6 амплитуда нДУВК снижается как в HPF, так и в 51164 обработанных нейронах до 4 ± 1 у.е. и 3 ± 1 у.е., соответственно ($p < 0,0001$ по Kruskal-Wallis ANOVA) (Рисунок 23 Ж – К). Таким образом, соединение 51164 способно восстанавливать синаптический TRPC6-зависимый нДУВК в нейронах гиппокампа, подавляемый олигомерами Аβ42.

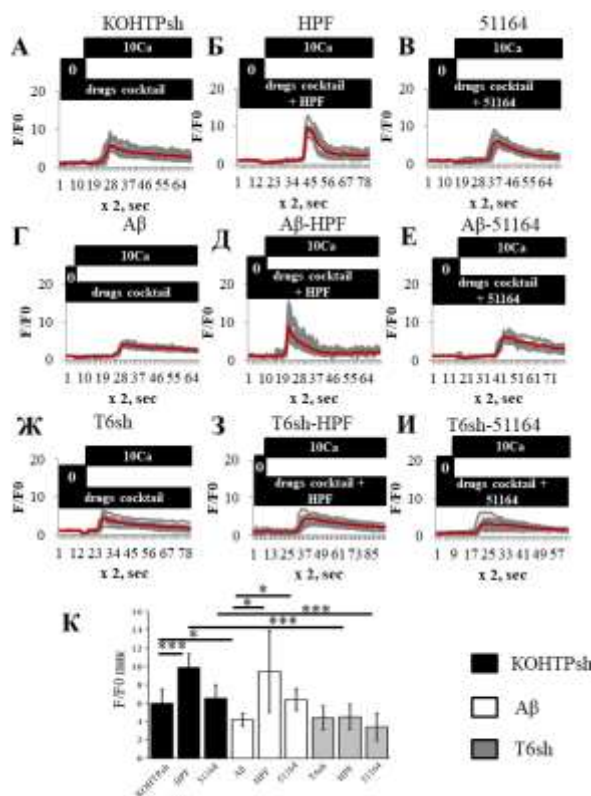


Рисунок 23 Соединение 51164 восстанавливает подавляемый Аβ42 нДУВК в дендритных шипиках гиппокампа. (А-И) Примеры записи нДУВК в исследуемых группах. Синаптические кальциевые ответы (F/F0), регистрировались при помощи кальциевого индикатора GCaMP5.3 в культурах гиппокампа дикого типа (DIV14). drugs cocktail - коктейль блокаторов кальциевых каналов: D-AP5, CNQX, нифедипин (для блокирования активности мощных кальций проницаемых каналов плазматической мембраны, таких как NMDAR, AMPAR, VGCC), тапсигаргин (блокатор SERCA пумпы), тетродотоксин (блокатор натриевых каналов, для ингибирования спонтанной активности нейронов). **(К)** Сравнительный анализ изменения амплитуды нДУВК (F/F0 пик) в исследуемых группах (А – И).

4.5 Соединение 51164 восстанавливает дефицит инициации долговременной потенциации у 6-месячных 5xFAD мышей. Влияние соединения 51164 на долговременную потенцию (ДВП) в срезах гиппокампа изучено на трансляционной модели БА, мышях линии 5xFAD. ДВП индуцировалась по протоколу тетанической импульсной стимуляции в синапсах гиппокампа в области CA1 на проводящих путях Schaffer collateral. Известно, что (Oakley, Cole et al. 2006; // J Neurosci;V: 26; P: 10129-10140; Kimura et al. 2009; // Neurobiol

Dis;V: 33; P: 229-235) индукция ДВП в срезах гиппокампа у этих животных значительно снижается к возрасту 6 месяцев (Рисунок 24 А, Б). В среднем через 30 минут после TBS стимуляции относительный наклон пВПСП для срезов WT был $1,62 \pm 0,8$ у.е. ($n = 8$ срезов), и достоверно ниже для 5xFAD $1,25 \pm 0,2$ у.е. ($n=12$), (Рисунок 24 Б, $p=0,04$). Так как соединение 51164 демонстрировало *in vitro* синаптопротекторный эффект в наномолярном диапазоне (10-100 нМ), было решено исследовать его влияние на индукцию ДВП в максимальной исследованной наномолярной концентрации – 100 нМ. Предварительная инкубация срезов гиппокампа 6-месячных животных с 100 нМ соединением 51164 в течение 30 минут не влияла на индукцию ДВП в срезах WT (Рисунок 24 А, Б, $p=0,99$). Однако, 30-минутная предварительная обработка срезов гиппокампа с 100 нМ соединением 51164 полностью восстанавливала дефицит индукции ДВП у 5xFAD (Рисунок 24 А, Б, $p = 0,79$). В среднем через 30 минут после TBS стимуляции относительный наклон пВПСП для срезов, обработанных соединением 51164 составлял $1,86 \pm 0.4$ у.е. ($n=9$), достоверно выше ($p=0,02$), чем для срезов 5xFAD без воздействия (Рисунок 24 Б). Таким образом, соединение 51164 оказалось способным восстанавливать дефицит инициации ДВП у 6-месячных мышей линии 5xFAD.

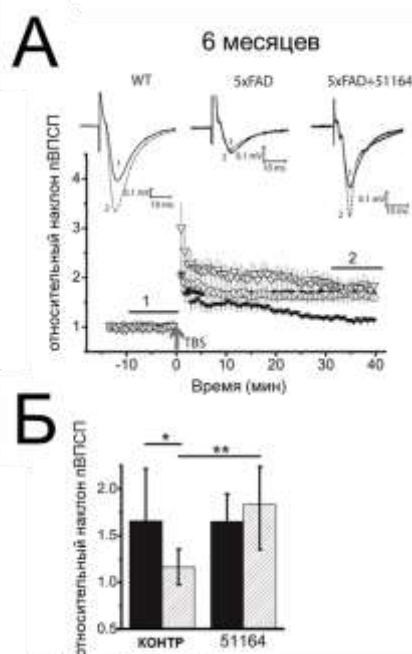


Рисунок 24 Соединение 51164 восстанавливает индукцию ДВП в срезах мозга 6-месячных мышей линии 5xFAD.

Заключая раздел, следует отметить, что в поиске потенциальных фармакологических агентов применены подходы биоинформатики для выявления потенциальных активаторов TRPC6. Идентифицированные соединения протестированы в разработанной нами *in vitro* модели амилоидной токсичности. Данные, полученные *in vitro*, позволили отобрать лидирующее соединение 51164, которое проявило нейропротекторные свойства в *in vitro*

экспериментах, устранив дефекты инициации ДВП в срезах гиппокампа мышей линии 5xFAD, трансляционной модели БА. Мы полагаем, что соединение 51164 и его аналоги могут быть использованы для разработки лекарственных средств лечения БА. Механизм действия таких соединений ориентирован на синаптическую стабилизацию.

5. Антагонист нейронального депо-управляемого входа кальция оказывает протекторное действие на нейроны, экспрессирующие мутантный PSEN1ΔE9, при наследственной форме болезни Альцгеймера.

В патогенезе БА отмечено перенасыщение кальцием внутриклеточных депо, включая ЭПР нейронов. В ответ запускаются протекторные механизмы восстановления содержания внутриклеточного кальция до нормы. Однако, судя по литературным данным, активация защитных механизмов со временем может вызвать новые нарушения. Так, было обнаружено, что в нейронах при БА избыток кальция ведет к снижению функции сигнального пути нДУВК, транспортирующего кальций из внеклеточного пространства внутрь клетки (Sun et al. 2014; // Neuron;V: 82; P: 79-93; Zhang et al. 2015; // Journal of Alzheimers Disease;V: 45; P: 561-580). В рамках настоящей диссертационной работы выявлено соединение 51164 – активатор нДУВК, которое на модели амилоидной токсичности восстанавливало синаптические контакты и улучшало когнитивные функции мышей. С нашей точки зрения, соединения-активаторы нДУВК можно рассматривать в качестве потенциальных терапевтических средств лечения БА, однако не для всех фенотипов заболевания. Существуют мутации в пресенилине 1, которые не снижают функцию канала утечки кальция из ЭПР, а наоборот увеличивают, тем самым способствуют высвобождению кальция из ЭПР, одновременно активируют нДУВК. Очевидно, что в данном случае должно быть решение обратной задачи, поиск ингибиторов нДУВК.

Существо гипотезы заключается в том, что при таком подходе возможно поддержание баланса кальция, что необходимо для поддержания стабильности синаптических контактов.

5.1 Мутация PSEN1ΔE9 вызывает снижение процента грибовидных шипиков и увеличивает процент тонких шипиков в культуре гиппокампа.

Чтобы выяснить влияние мутации PSEN1ΔE9 на формирование и стабильность дендритных шипиков в культурах гиппокампа, мы трансфецировали плазмиду, кодирующую флуоресцентный белок TD-Tomato вместе с плазмидой, кодирующей мутантный пресенилин 1 с удаленным девятым экзоном 9 (PSEN1ΔE9). Трансфецированные нейроны фиксировали в PFA на DIV 15-16, а морфологию дендритных шипиков визуализировали на конфокальном микроскопе (Thorlabs, США). Полученные

результаты демонстрируют, что гиперэкспрессия мутации PSEN1ΔE9 вызывает потерю грибовидных шипиков с $19\% \pm 2\%$ (n (нейроны) = 12) в контрольной группе (КОНТР) до $6\% \pm 1\%$ n (нейроны) = 11, $p = 0,0000241$, в нейронах, экспрессирующих мутантный пресенилин (Рисунок 25). В соответствии с ранее опубликованными данными (Sun S et al. 2014; // Neuron;V: 82; P: 79-93; Zhang H. et al. 2015; // J Neurosci;V: 35; P: 13275-13286) мы видим, что баланс смещен в сторону тонких шипиков, с $24\% \pm 2\%$ (n (нейроны) = 12) в контрольной группе до $44\% \pm 6\%$ n (нейроны) = 11, $p = 0,005$ в нейронах экспрессирующих мутантный PSEN1ΔE9 (Рисунок 25). Мутантный PSEN1ΔE9 не влияет на процент пеньковых шипиков (Рисунок 25).

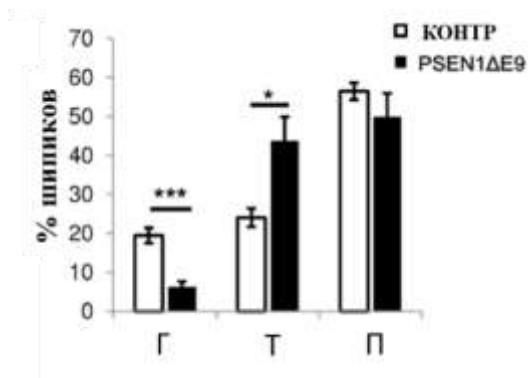


Рисунок 25 Экспрессия PSEN1ΔE9 вызывает уменьшение процента грибовидных и увеличение процента тонких шипиков в нейронах гиппокампа. Гистограмма со средним процентом грибовидных (Г), тонких (Т) и пеньковых (П) шипиков в двух экспериментальных группах.

5.2 Мутация PSEN1ΔE9 увеличивает TRPC6-зависимый депо-управляемый вход кальция в дендритных шипиках в гиппокампальных культурах.

Для выявления роли мутации PSEN1ΔE9 в регуляции активности нейронального депо-управляемого входа кальция, выполнены эксперименты по визуализации Ca^{2+} в первичных культурах гиппокампа, совместно трансфицированных плазмидами, экспрессирующими GCaMP5.3 и PSEN1ΔE9 (Рисунок 26). Установлено значительное увеличение амплитуды нДУВК в шипиках при гиперэкспрессии мутантного PSEN1ΔE9 (Рисунок 26). Пиковое значение амплитуды нДУВК в нейронах, экспрессирующих PSEN1ΔE9, составляло $10,3 \text{ у.е.} \pm 1,2 \text{ у.е.}$, тогда как в контрольной группе - $6,4 \text{ у.е.} \pm 0,4 \text{ у.е.}$, $p = 0,014$ (Рисунок 26). Кроме того, мы наблюдали, что нокаун каналов TRPC6 с помощью shTRPC6 РНК в культурах гиппокампа снижает PSEN1ΔE9-опосредованный высокий нДУВК (с $10,3 \text{ у.е.} \pm 1,2 \text{ у.е.}$ для нейронов, экспрессирующих PSEN1ΔE9, до $4,7 \text{ у.е.} \pm 0,7 \text{ у.е.}$, $p = 0,001$ для нейронов, экспрессирующих PSEN1ΔE9, с нокаутированным TRPC6, Рисунок 26). Нокаун TRPC6 вызывает почти полную блокаду индукции нДУВК в первичных культурах гиппокампа с амплитудой пика нДУВК, равной $1,18 \text{ у.е.} \pm 0,02 \text{ у.е.}$ (Рисунок 26).

Таким образом, определены возможные мишени для поддержания баланса кальция при фенотипе БА, ассоциированном с PSEN1ΔE9. В таких случаях БА предпочтительным является ингибирование нДУВК.

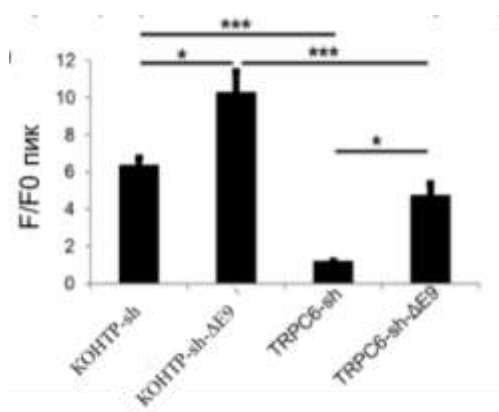


Рисунок 26 Экспрессия PSEN1ΔE9 вызывает увеличение TRPC6-опосредованного нДУВК в шипиках в первичных культурах гиппокампа. Средняя амплитуда пика постсинаптического нДУВК показана для каждой экспериментальной группы. Экспериментальные группы: KOHTR-sh - нейроны трансфицированные плазмидой, кодирующей экспрессию контрольной shРНК некомплементарной ни к одной клеточной мРНК; KOHTR-sh-ΔE9 - нейроны ко-трансфицированные плазмидой экспрессирующей контрольную shРНК и плазмидой кодирующей экспрессию PSEN1ΔE9; TRPC6-sh - нейроны трансфицированные плазмидой, кодирующей экспрессию shРНК специфичной к TRPC6 мРНК; TRPC6-sh-ΔE9 - нейроны ко-трансфицированные плазмидой экспрессирующей shРНК-TRPC6 и плазмидой кодирующей экспрессию PSEN1ΔE9.

5.3 Соединение EVP4593 предотвращает увеличение амплитуды постсинаптического нейронального депо-управляемого входа кальция в нейронах гиппокампа, экспрессирующих PSEN1ΔE9.

Выбор соединения EVP4593 (SML0579, Sigma Aldrich) обоснован литературными данными, показавшими, что EVP4593 блокирует нДУВК в наномолярных концентрациях в нейронах стриатума (Wu et al. 2016; // J Neurosci;V: 36; P: 125-141). Чтобы исследовать опосредованную EVP4593 блокаду нДУВК в нейронах гиппокампа мы провели эксперименты по визуализации кальциевых ответов. Во время процессов визуализации кальциевых осцилляций в среду без кальция (0Ca) соединение EVP4593 добавляли в концентрации 30 нМ, в которой была показана блокада нДУВК в нейронах стриатума (Wu et al. 2016; // J Neurosci;V: 36; P: 125-141) вместе с блокаторами мощных кальциевых каналов плазматической мембраны – CNQX (AMPA/ каинатные рецепторы), D-Аp5 (NMDAR), нифедипином (L-VGCC) и TTX (блокирует спонтанную активность нейронов) тапсигаргином (блокатор SERCA) (Рисунок 27). В качестве дополнительного контроля визуализировали нДУВК в дендритных шипиках, экспрессирующих пресенилин 1 дикого типа (PSEN1WT) (Рисунок 27). Выявлено, что PSEN1WT не увеличивает амплитуду нДУВК в нейронах гиппокампа, демонстрируя пиковую амплитуду нДУВК в $3,12 \pm 0,13$ у.е. в сравнении со значением пиковой амплитуды нДУВК для контрольной группы (KOHTR) $3,21 \pm 0,25$ у.е., $p = 0,73$ (Рисунок 27), что согласуется с ранее опубликованными данными о том, что холопротеин PSEN1WT не увеличивает функцию пресенилина 1 как

канала утечки Ca^{2+} из ЭПР, таким образом, не приводит к опустошению кальциевых депо в ЭПР (Tu et al. 2006; // Cell;V: 126; P: 981-993). Мы также обнаружили, что в контрольной группе (КОНТР) нейронов EVP4593 не снижает амплитуду нДУВК (Рисунок 27). Однако в концентрации 30 нМ EVP4593 блокировал PSEN1 Δ E9-опосредованное увеличение амплитуды нДУВК с $7,22 \pm 0,97$ у.е. до $3,71 \pm 0,16$ у.е., $p = 0,009$ (Рисунок 27). Специфичность эффекта для изученного фенотипа подтверждается отсутствием блокады постсинаптического нДУВК в PSEN1WT гиперэкспрессирующих нейронах (Рисунок 27).

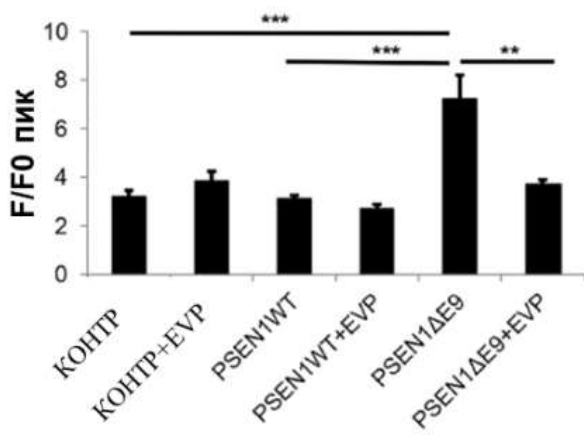


Рисунок 27 Соединение EVP4593 ингибирует PSEN1 Δ E9-опосредованное увеличение амплитуды нДУВК в шипиках гиппокампа. Средняя амплитуда пика постсинаптического нДУВК показана для каждой экспериментальной группы.

5.4 Соединение EVP4593 увеличивает процент грибовидных шипиков в культуре гиппокампа, экспрессирующей PSEN1 Δ E9.

Фармакодинамическое изучение нейропротекторного влияния EVP4593 продолжено в первичных культурах гиппокампа. Оценивали содержание грибовидных шипиков при гиперэкспрессии PSEN1WT в качестве контроля, для подтверждения что гибель грибовидных шипиков в нейронах, экспрессирующих PSEN1 Δ E9, происходит из-за делеции 9го экзона в белке PS1, но не из-за эффекта гиперэкспрессии гена PSEN1. Отмечено, что при гиперэкспрессии PSEN1WT возникает тенденция к уменьшению процента грибовидных шипиков, однако не достигает статистической значимости $14,14\% \pm 1,78\%$ (группа PSEN1WT, Рисунок 28) по сравнению с $19,47\% \pm 1,96\%$ (группа КОНТР, Рисунок 28), $p = 0,07$, процент грибовидных шипиков в нейронах, экспрессирующих PSEN1WT, был значительно выше по сравнению с нейронами, экспрессирующими PSEN1 Δ E9, $14,14\% \pm 1,78\%$ (группа PSEN1WT, Рисунок 28) против $6,28\% \pm 1,40\%$ (группа PSEN1 Δ E9, Рисунок 28), $p = 0,007$.

Инкубация с 30 нМ EVP4593 вызывала снижение гибели грибовидных шипиков в контрольной группе нейронов (Рисунок 28), в среднем до $13,8\% \pm 1,3\%$ (n (нейроны) = 10) в контрольных нейронах, обработанных EVP4593, однако без достижения статистической значимости. Добавление 30нМ EVP4593 в PSEN1WT-экспрессирующие нейроны также

достоверно не изменяло процент грибовидных шипиков, отмечено недостоверное сокращение до $12,5\% \pm 2,4\%$ (n (нейроны) = 7) (Рисунок 28).

В то же время инкубация PSEN1 Δ E9-трансфицированных нейронов с 30 нМ EVP4593 восстанавливала процент грибовидных шипиков, в среднем до $12\% \pm 2\%$ (n (нейроны) = 7, $p = 0,007$) (Рисунок 28). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют в пользу рабочей гипотезы о том, что блокировка активности нДУВК в нейронах гиппокампа, экспрессирующих мутантный PSEN1 Δ E9, оказывает нейропротекторное действие на синаптические шипики.

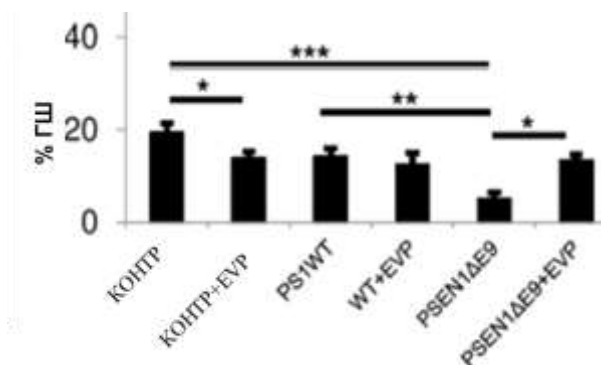


Рисунок 28 Соединение EVP4593 в концентрации 30 нМ восстанавливает процент грибовидных шипиков в нейронах гиппокампа, экспрессирующих мутантный PSEN1 Δ E9. Гистограмма демонстрирующая средний процента грибовидных шипиков (ГШ) для каждой экспериментальной группы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эксперименты, выполненные с использованием генетических и фармакологических моделей болезни Альцгеймера, позволили выделить в качестве перспективного для фармакологической регуляции основного патогенетического звена заболевания - нарушения формирования устойчивых синаптических контактов. Установлено физиологическое значение нейронального депо-управляемого входа кальция (нДУВК) для поддержания количества грибовидных дендритных шипиков в нейронах гиппокампа. Показано, что в условиях амилоидной токсичности нарушается регуляция кальциевого сигналинга, происходит потеря синаптических контактов, а положительная модуляция депо-управляемых каналов обеспечивает защиту нейронов гиппокампа.

Исходя из данных о регуляции депо-управляемого входа кальция каналом плазматической мембраны – каноническим каналом бго типа с транзиторным рецепторным потенциалом (TRPC6), проведен поиск химических соединений, модулирующих TRPC6-нДУВК сигнальный путь. Установлено, что соединение N-(2-хлорфенил)-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)ацетамид способно активировать TRPC6 каналы и проявляет при избытке кальция в ЭПР нейропротекторные свойства в концентрациях 10-100 нМ в опытах *in vitro*.

Соединение 4-N- [2- (4-феноксифенил) этил] хиनाзолин-4,6-диамин в опытах *in vitro* блокирует каналы TRPC6 в концентрациях 30нМ и проявляет нейропротекторные свойства при экспрессии мутантного белка PSEN1 Δ E9 в нейронах гиппокампа.

Таким образом, охарактеризованы модуляторы TRPC6-нДУВК кальциевого каскада, агонисты и антагонисты, на основе которых возможна разработка лекарственных средств, направленных на фенотипы болезни Альцгеймера с кальциевой дисрегуляцией, ведущей как к истощению, так и избыточному накоплению кальция в ЭПР.

В качестве положительного модулятора TRPC6-зависимого сигнального пути нДУВК в нейронах гиппокампа выявлено соединение бис{2- [(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия}бутандиоата, доказана его способность в дозе 10 мг/ кг восстанавливать краткосрочную память при моделировании ишемии головного мозга у крыс.

Таким образом, определена новая фармакологическая мишень, перспективная для разработки оригинальных лекарственных средств лечения болезни Альцгеймера - TRPC6-зависимый нДУВК и охарактеризованы химические соединения, агонисты и антагонисты, тропные к данной мишени, которые могут быть рекомендованы в качестве базовых для последующих модификаций и фармакологической разработки.

ВЫВОДЫ

На основании результатов экспериментальных исследований *in vitro* и *in vivo*, направленных на поиск новых фармакологических мишеней и химических структур, перспективных для разработки лекарственных средств лечения болезни Альцгеймера, сделаны следующие выводы:

1. Нарушения регуляции транспорта кальция депо-управляемыми кальциевыми каналами, как при гипо-, так и гиперактивации, ведут к снижению количества грибовидных шипиков в гиппокампе, что определяет целесообразность поиска как активаторов, так и ингибиторов нДУВК.
2. В условиях амилоидной токсичности снижается экспрессия трансмембранного белка ЭПР STIM2, что ведет к потере количества дендритных грибовидных шипиков, а увеличение продукции STIM2 – к их восстановлению.
3. На экспериментальной модели – мышах линии 5xFAD доказано, что активация депо-управляемых кальциевых каналов обеспечивает снижение числа амилоидных бляшек в коре головного мозга.
4. Установлена взаимосвязь гиперактивации TRPC6 – зависимого входа кальция в нейроны гиппокампа с дестабилизацией грибовидных шипиков при экспрессии мутантного белка PSEN1ΔE9.
5. Доказано, что при моделировании наследственных форм болезни Альцгеймера *in vitro* соединения бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия}бутандиоата (N17), N-(2-хлорфенил)-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)ацетамид (51164) и 4-

N-[2-(4-феноксифенил)этил]хиназолин-4,6-диамин (EVP4593), регулирующие TRPC6-зависимый депо-управляемый вход кальция в нейроны гиппокампа, обладают нейротекторными свойствами.

6. На *in vitro* моделях болезни Альцгеймера с перенасыщенными кальцием внутриклеточными депо, при снижении активности TRPC6-зависимого депо-управляемого входа кальция в дендритные шипики, потерю синаптических контактов способны предотвратить соединения бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия}бутандиоата и N-(2-хлорфенил)-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)ацетамид в концентрациях 100 нМ и 10-100 нМ соответственно.
7. На *in vitro* моделях болезни Альцгеймера при повышенной активности TRPC6-зависимого депо-управляемого входа кальция в дендритные шипики, потерю синаптических контактов способно предотвратить соединение 4-N-[2-(4-феноксифенил)этил]хиназолин-4,6-диамин в концентрации 30 нМ.
8. Соединения бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия}бутандиоата (N17), N-(2-хлорфенил)-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)ацетамид (51164) и 4-N-[2-(4-феноксифенил)этил]хиназолин-4,6-диамин (EVP4593) рекомендованы в качестве базовых структур для поиска и разработки средств регуляции новой фармакологической мишени лечения болезни Альцгеймера - TRPC6-зависимые депо-управляемые кальциевые каналы.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Выявленные соединения бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоата (N17) и N-(2-хлорфенил)-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)ацетамид (51164) – положительные регуляторы TRPC6-нДУВК в нейронах гиппокампа в *in vitro* условиях амилоидной синаптотоксичности могут быть рекомендованы для дальнейшей разработки на их основе средств фармакотерапии форм болезни Альцгеймера с избыточным содержанием кальция в эндоплазматическом ретикулуме.

2. Выявленное соединение 4-N-[2-(4-феноксифенил)этил]хиназолин-4,6-диамин (EVP4593) – отрицательный регулятор TRPC6-нДУВК может быть рекомендовано для дальнейшей разработки на его основе средства фармакотерапии формы болезни Альцгеймера, вызванной делецией 9го экзона в гене пресенилин 1.

3. Целесообразна разработка клинико-фармакологических подходов, направленных на выявление мутаций, специфичных для наследственных форм болезни Альцгеймера и диагностики фенотипа заболевания с истощением или перенасыщением кальцием эндоплазматического ретикулума.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях:

1. Prikhodko V., Chernyuk D., Sysoev Y., Zernov N., Okovityi S., **Popugaeva E.** Potential Drug Candidates to Treat TRPC6 Channel Deficiencies in the Pathophysiology of Alzheimer's Disease and Brain Ischemia // *Cells* (Q2, Medline, Scopus, WoS, РИНЦ) 2020. Т. 9, N 11. С. 2351.
2. Сысоев Ю.И., **Попугаева Е.А.**, Чернюк Д.П., Титович И.А., Загладкина Е.В., Болотова В.Ц., Безпрозванный И.Б., С.В. Оковитый. Механизм действия нового производного этаноламина – бис {2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандионата // *Экспериментальная и клиническая фармакология* (Q4, Scopus, РИНЦ) 2019. Т. 82, N 4. С. 3-10.
3. **Popugaeva E.**, Chernyuk D., Bezprozvanny I. Reversal of Calcium Dysregulation as Potential Approach for Treating Alzheimer's Disease // *Current Alzheimer research* (Q2, Medline, Scopus, WoS, РИНЦ) 2020. Т. 17. N 4.
4. **Popugaeva E.**, Chernyuk D., Zhang H., Postnikova T. Y., Pats K., Fedorova E., Poroikov V., Zaitsev A. V., Bezprozvanny I. Derivatives of piperazines as potential therapeutic agents for Alzheimer's disease // *Mol Pharmacol.* (Q1, Medline, Scopus, WoS, РИНЦ) 2019. Т. 95, N 4. С. 337-348.
5. Chernyuk D., Zernov N., Kabirova M., Bezprozvanny I., **Popugaeva E.** Antagonist of neuronal store-operated calcium entry exerts beneficial effects in neurons expressing PSEN1DeltaE9 mutant linked to familial Alzheimer disease // *Neuroscience* (Q2, Medline, Scopus WoS, РИНЦ) 2019. Т. 410. С. 118-127.
6. **Popugaeva E.**, Pchitskaya E., Bezprozvanny I. Dysregulation of intracellular calcium signaling in Alzheimer's disease // *Antioxid Redox Signal.* (Q1, Scopus, WoS, РИНЦ) 2018. Т. 29, N 12. С. 1176-1188.
7. Pchitskaya E., **Popugaeva E.**, Bezprozvanny I. Calcium signaling and molecular mechanisms underlying neurodegenerative diseases // *Cell Calcium* (Q1, Scopus, WoS, РИНЦ) 2018. Т. 70. С. 87-94.
8. **Popugaeva E.**, Pchitskaya E., Bezprozvanny I. Dysregulation of neuronal calcium homeostasis in Alzheimer's disease - A therapeutic opportunity? // *Biochem Biophys Res Commun.* (Q1, Scopus, WoS, РИНЦ) 2017. Т. 483, N 4. С. 998-1004.
9. **Popugaeva E.**, Vlasova O. L., Bezprozvanny I. Restoring calcium homeostasis to treat Alzheimer's disease: a future perspective // *Neurodegener Dis Manag.* (Q2, Scopus, WoS, РИНЦ) 2015. Т. 5, N 5. С. 395-398.
10. **Popugaeva E.**, Pchitskaya E., Zhang H., Vlasova O., Bezprozvanny I. Investigation of low amyloid level toxicity effects on the function of hippocampal neurons // *Open Life Sciences.* (Q3, Scopus, WoS, РИНЦ) 2015. Т. 10, N 1. С. 433-436.
11. **Popugaeva E.**, Pchitskaya E., Speshilova A., Alexandrov S., Zhang H., Vlasova O., Bezprozvanny I. STIM2 protects hippocampal mushroom spines from amyloid synaptotoxicity // *Mol Neurodegener.* (Q1, Scopus, WoS, РИНЦ) 2015. Т. 10, N 1. С. 37.
12. Egorova P., **Popugaeva E.**, Bezprozvanny I. Disturbed calcium signaling in spinocerebellar ataxias and Alzheimer's disease // *Semin Cell Dev Biol.* (Q1, Scopus, WoS, РИНЦ) 2015. 10.1016/j.semcdb.2015.03.010.
13. **Popugaeva E.**, Bezprozvanny I. Can the calcium hypothesis explain synaptic loss in Alzheimer's disease? // *Neurodegener Dis.* (Q2, Scopus, WoS, РИНЦ) 2014. Т. 13, N 2-3. С. 139-141.
14. **Popugaeva E.**, Bezprozvanny I. Role of endoplasmic reticulum Ca²⁺ signaling in the pathogenesis of Alzheimer disease // *Front Mol Neurosci.* (Q1, Scopus, WoS, РИНЦ) 2013. Т. 6. С. 29.

Статьи в журналах, входящих в РИНЦ:

1. Д.П. Чернюк О. Л. В., И.Б. Безпрозванный, Е.А. Попугаева. Снижение числа амилоидных бляшек в коре головного мозга мышей путем гиперэкспрессии белка STIM2 // НТВ СПбГПУ. Физико-математические науки. (РИНЦ) 2016. Т. 4, N 253. С. 139-149.
2. Попугаева Е.А., Власова О.Л., Безпрозванный И.Б. Передача сигнала в нейронах с участием ионов кальция и нейродегенеративные заболевания // Труды Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого. (РИНЦ) 2015. N 517. С. 209-219.
3. Попугаева Е.А., Власова О.Л., Безпрозванный И.Б. Роль внутриклеточного кальция в развитии патогенеза болезни Альцгеймера // НТВ СПбГПУ. Физико-математические науки. (РИНЦ) 2014. Т 1, N 189. С. 79-90.
4. Popugayeva E., Supnet S., Bezprozvanny I. Presenilins, deranged calcium homeostasis, synaptic loss and dysfunction in Alzheimer's disease // Messenger. (РИНЦ) 2012. Т. 1. С. 53-62.

Глава в монографии:

Ryskamp D. A., Popugayeva E., Bezprozvanny I. Calcium Hypothesis on Neurodegeneration: The Case of Alzheimer's disease and Huntington's disease. In "Neurodegenerative diseases: unifying principles" // Edited by Jeffrey L. Cummings and Jagan A. Pillai. Oxford. Oxford University Press, 2016. - С. 28-39. (РИНЦ)

Патент:

Патент РФ № 2018135056, от 05.10.2018.

Применение производных пиперазина для лечения болезни Альцгеймера и деменций альцгеймеровского типа с нарушенной кальциевой сигнализацией // Патент России № 2676100. 2018. / Попугаева Е.А, Чернюк Д.П., Безпрозванный И.Б. (РИНЦ)

Тезисы докладов на российских и международных научных конференциях:

1. Камарян В.С., Макичян А.Т., **Попугаева Е.А.**, Чернюк Д.П., Унанян Л.С. Докинг и конформационный анализ производного пиперазина потенциального терапевтического препарата для лечения болезни Альцгеймера // Гены и клетки. 2020, Т. 15, N S3, С. 135.
2. Kamaryan V.S., Makichyan A.T., Unanyan L.S., **Popugayeva E.A.**, Zernov N.I., Bezprozvanny I.B. Modification and in silico design of compounds based on the pharmacophore of 1,4-n, n-displaced piperazines. "Lomonosov 2020. XXVII International Scientific Conference of Students, Postgraduates and Young Scientists". Russia, Moscow.
3. Попугаева Е.А., Чернюк Д.П., Зернов Н.И., Безпрозванный И.Б. Модуляторы нейронального кальциевого сигналинга – перспективные фармакологические агенты для лечения патогенетических форм болезни Альцгеймера. // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2020, Т. 56, N 7, с. 671.
4. Чернюк Д.П., Безпрозванный И.Б., **Попугаева Е.А.** Роль CaMKII в механизме действия соединений модуляторов нДУВК. 2019 // Acta Naturae, Специальный выпуск, Т. 1, С.135-136.
5. Чернюк Д.П., Зернов Н.И., Безпрозванный И.Б., **Попугаева Е.А.** Внутриклеточный механизм действия N-2-(хлорфенил)-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)ацетамида, потенциального терапевтического препарата для лечения болезни Альцгеймера. // Гены и Клетки. 2019. Т. 14, N 3. С. 91.
6. Chernyuk D, **Popugayeva E**, Zernov N, Bezprozvanny I (2018). Intracellular mechanisms of dysregulation of calcium in Alzheimer's disease and possible ways of their treatment. 11th FENS (Federation of European Neurobiological Societies) FORUM 2018, Berlin, Germany.
7. **Попугаева Е.А.**, Чернюк Д.П., Безпрозванный И.Б. Соединение 3-(3-гидроксифенил)-N-пропилпиперидин восстанавливает механизм регуляции баланса кальция на клеточной модели болезни Альцгеймера. В сборнике: Неделя науки СПбПУ. 2018. С. 107-109.

8. Чернюк Д.П., Зернов Н.И., Пчицкая Е.И., Безпрозванный И.Б., **Попугаева Е.А.** Соединение EUP4593 предотвращает нарушения кальциевого гомеостаза в PSEN1DE9 модели болезни Альцгеймера. В сборнике: Неделя науки СПбПУ. 2018. С. 385-387.
9. Чернюк Д.П., **Попугаева Е.А.**, Безпрозванный И.Б. Агонисты TRPC6 каналов – перспективные лекарственные средства для лечения болезни Альцгеймера. В сборнике: Неделя науки СПбПУ. 2017. С. 522-524.
10. Чернюк Д.П., Зернов Н.И., Пчицкая Е.И., **Попугаева Е.А.** Влияние делеции 9 экзона в белке пресенилин 1 на кальциевый гомеостаз в нейронах гиппокампа при болезни Альцгеймера. В сборнике: Неделя науки СПбПУ. 2017. С. 524-526.
11. Кабирова М.О., **Попугаева Е.А.**, Власова О.Л., Безпрозванный И.Б. Роль мутации PSEN1DE9 в регуляции депо-управляемого входа кальция в нейронах гиппокампа. В сборнике: Неделя науки СПбПУ. 2016. С. 445-448.
12. Чернюк Д.П., **Попугаева Е.А.**, Власова О.Л., Безпрозванный И.Б. Активация нейронального депо-управляемого входа кальция уменьшает количество А β -бляшек в головном мозге мышинной модели болезни Альцгеймера. В сборнике: Неделя науки СПбПУ. 2016. С. 517-519.
13. Kraskovskaya N.A., **Popugaeva E.A.**, Pchitskaia E.I., Vlasova O.L., Bezprozvanny I.B. Stereotaxic injection is an advanced method of studying Alzheimer's disease. В сборнике: Материалы научно-практической конференции. Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций СПбПУ. 2015. С. 426-428.
14. Пчицкая Е.И., **Попугаева Е.А.**, Власова О.Л., Безпрозванный И.Б. Роль белка STIM2 в формировании дендритных шипиков в условиях амилоидной синаптотоксичности. В сборнике: Научный форум с международным участием "Неделя науки СПбПУ". 2015. С. 445-447.
15. Черноштан К.В., **Попугаева Е.А.**, Пчицкая Е.И., Власова О.Л., Безпрозванный И.Б. Исследование роли белка STIM2 на мышинной модели болезни Альцгеймера APPSEN1DE9. В сборнике: Научный форум с международным участием "Неделя науки СПбПУ". 2015. С. 462-464.