

На правах рукописи



Зуева Ирина Владимировна

**МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ ИНДУЦИРУЕМОЙ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗОЙ
ОЛИГОМЕРИЗАЦИИ В-АМИЛОИДНОГО ПЕПТИДА НА ПРОСТРАНСТВЕННУЮ
ПАМЯТЬ МЫШЕЙ В МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА**

03.03.01 – физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2021

Работа выполнена на базе лабораторий Химико-биологических исследований и Нейрофизиологии ИОФХ им. А.Е. Арбузова - обособленного структурного подразделения ФИЦ КазНЦ РАН, лаборатории биофизики синаптических процессов Казанского института биохимии и биофизики - обособленного структурного подразделения ФИЦ КазНЦ РАН

Научный руководитель:

Петров Константин Александрович – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией Нейрофизиологии ИОФХ им. А.Е. Арбузова ИОФХ им. А.Е. Арбузова - обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН

Официальные оппоненты:

Брежестовский Пётр Дмитриевич – доктор биологических наук, научный руководитель Института нейронаук, почетный профессор «Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Казанский государственный медицинский университет»

Ведущая организация:

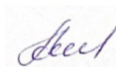
Гайдуков Александр Евгеньевич – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры физиологии человека и животных «Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (г. Москва) Федеральное государственное бюджетное учреждение науки институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова российской академии наук (г. Санкт-Петербург)

Защита диссертации состоится 22 сентября 2021 года в 13:00 часов на заседании диссертационного совета КФУ.03.06 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420015, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 76, ауд. 208 (актовый зал).

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки им. Н.И. Лобачевского Казанского (Приволжского) федерального университета и на сайте <https://kpfu.ru/validation/sobstvennye-sovety-kfu/obyavleniya-o-zaschitah-dissertacij>.

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета КФУ.03.06.
доктор биологических наук, профессор



Т.А. Аникина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Болезнь Альцгеймера (БА) является самой распространенной формой старческой деменции, характеризуется прогрессирующей гибелью нервных клеток и ускоренным отложением патологического белка β -амилоида с последующим образованием нейрофибриллярных клубков внутри нейронов и β -амилоидных бляшек вокруг нейронов. Патология связана с синаптической дисфункцией, дегенерацией нейронов и атрофией головного мозга пациентов. К сожалению, на сегодняшний день причины, запускающие болезнь, не известны, поэтому существующая терапия является симптоматической и имеет целью лишь максимально отсрочить момент потери дееспособности (Holtzman et al., 2011).

Симптоматическая терапия БА базируется на так называемой «холинергической гипотезе»: было показано, что в мозге больных происходит массовая гибель холинергических нейронов переднего мозга, что приводит к снижению холинергической иннервации гиппокампа (Bowen et al., 1976; Perry et al., 1977). В связи с этим, в настоящее время в основе терапии болезни Альцгеймера лежит применение ингибиторов ферментов ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и бутирилхолинэстеразы (БуХЭ), разрушающих нейротрансмиттер ацетилхолин (АХ). Продление времени жизни АХ путем частичного ингибирования холинэстераз позволяет скомпенсировать холинергический дефицит, что на ранних стадиях оказывает положительный эффект у большинства пациентов (Birks J., 2006).

В качестве наиболее вероятной причины нейродегенеративных изменений при БА рассматривается избыточная продукция и накопление олигомеризованных форм β -амилоида. Данный пептид олигомеризуется с образованием длинных нерастворимых фибрилл, которые являются ключевым компонентом β -амилоидных (сенильных) бляшек, формирующихся в мозге пациентов. Олигомеризованный β -амилоид вызывает широкий спектр нейротоксических эффектов: нарушение синаптической передачи и пластичности, проявление митохондриальной дисфункции и др. (Freir et al., 2001; Kourie, 2001; Crouch et al., 2007; Walsh and Selkoe, 2007; Crouch et al., 2008; Querfurth and LaFerla, 2010; Marsh and Alifragis, 2018).

На данный момент накоплено достаточно свидетельств о том, что в дополнение к эффектам симптоматической терапии, основанной на компенсации холинергического дефицита, большинство используемых в клинике ингибиторов АХЭ способны оказывать влияние и на количество β -амилоидного пептида. Было показано, что активация мускариновых рецепторов подтипа М1 избытком АХ, снижает уровень экспрессии белка-предшественника β -амилоидного пептида, а также увеличивает степень его расщепления по неамилоидогенному пути (Nitsch et al., 1992; Touqeer et al., 2017). Кроме того, как было показано, активация никотиновых

холинорецепторов микроглиальных клеток приводит к усилению захвата ими β -амилоидного пептида (Bhattacharya et al., 2014; Takata et al., 2010).

К сожалению, также хорошо известно, что влияние традиционных ингибиторов АХЭ на амилоидный каскад, не столь выражено, чтобы оказывать модифицирующий заболевание эффект (disease-modifying effect), т.е. чтобы существенно сказаться на скорости прогрессирования симптомов БА (см. обзоры Long and Holtzman, 2019; Grossberg et al., 2019).

В этой связи, важно отметить, что АХЭ сама по себе выступает в качестве «патологического шаперона», способствующего олигомеризации β -амилоида и, таким образом, смещающего равновесие в сторону преобладания его токсичных форм (Inestrosa et al., 2008). Взаимодействие АХЭ с β -амилоидом происходит преимущественно в области так называемого «периферического анионного сайта» (ПАС) и приводит к образованию стабильных токсичных комплексов β -амилоида с АХЭ. Показано, что ингибиторы, оккупирующие ПАС фермента, способны уменьшать скорость образования токсичных растворимых форм β -амилоида *in vitro* и значительно снижать количество β -амилоидных агрегатов в головном мозге животных с моделью БА (Viaña et al., 2014). Таким образом, существует вероятность, что снижение индуцируемой АХЭ олигомеризации β -амилоида за счет конкуренции его связывания в ПАС будет оказывать намного более выраженный, чем у традиционных ингибиторов АХЭ, модифицирующий заболевание эффект, существенно замедляя накопление токсичных форм β -амилоида и, тем самым, снижая скорость нейродегенеративных изменений.

Экспериментальная проверка гипотезы о возможном вкладе индуцируемой АХЭ олигомеризации β -амилоида в патогенез БА затруднена практически полным отсутствием блокаторов ПАС АХЭ, которые могут быть использованы в качестве инструмента для проверки данной гипотезы на модели БА у животных. В настоящий момент описано всего несколько потенциальных блокаторов ПАС АХЭ, показавших свою эффективность *in vivo* на модели БА у животных (Viaña et al., 2014; Jiang et al., 2019).

Кроме того, вывод о наличии модифицирующего патогенез заболевания эффекта, может быть сделан только на основе результатов специализированных экспериментов, включающих этап отмены введения исследуемого препарата и последующую оценку степени развития заболевания в отсутствие терапии (Cummins and Fox, 2017). Однако, для изучения ингибиторов АХЭ, связывающихся в районе ПАС, подобный экспериментальный подход, позволяющий разделить эффекты симптоматической терапии и возможный модифицирующий заболевание компонент, ранее никогда не применялся.

В ИОФХ им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН ранее были синтезированы ингибиторы холинэстераз на основе алкиламмониевых производных 6-метилурацила, предназначенные для

терапии состояний мышечной слабости, для которых рентгеноструктурный анализ их сокристалла с АХЭ и компьютерное моделирование молекулярной динамики показали связывание в районе ПАС АХЭ (Semenov et al., 2014; Kharlamova et al., 2016). Основываясь на их строении, была синтезирована новая серия соединений, не содержащих фиксированного заряда и, поэтому, потенциально способных преодолевать гематоэнцефалический барьер. В данной работе мы предприняли попытку использовать производные 6-метилурацила в качестве инструмента для экспериментальной проверки гипотезы о возможном вкладе индуцированной ПАС АХЭ олигомеризации β -амилоида в патогенез БА, в условиях модели данного заболевания на животных. Исследование проводилось в два этапа. На первом этапе были установлены маркеры патологических изменений в головном мозге трансгенных мышей с моделируемой БА, анализ которых позволяет высказать гипотезу о вероятном механизме влияния индуцированной АХЭ олигомеризации β -амилоида на когнитивные функции. На втором этапе работы был отобран ингибитор АХЭ, который наилучшим образом подходит для исследования вклада индуцируемой АХЭ олигомеризации β -амилоида в патогенез БА *in vivo*. Далее, при помощи выбранного соединения, была проведена экспериментальная проверка гипотезы о возможном вкладе индуцируемой АХЭ олигомеризации β -амилоида в патогенез БА в условиях модели данного заболевания.

Цель исследования

Цель данной работы – установить возможные механизмы влияния индуцируемой АХЭ олигомеризации β -амилоида на развитие нарушений памяти в условиях модели БА на животных.

Задачи исследования

1. В условиях модели БА на животных выбрать маркеры патологического процесса, анализ которых позволит установить возможный механизм влияния индуцируемой АХЭ олигомеризации β -амилоида на способность к обучению;
2. Среди ряда производных 6-метилурацила выявить ингибитор АХЭ, наиболее подходящий для проверки гипотезы о вкладе индуцируемой АХЭ олигомеризации β -амилоида в патогенез БА на модели *in vivo*;
3. Исследовать способность данного соединения оказывать влияние на индуцируемую АХЭ олигомеризацию β -амилоида *in vitro*;
4. Изучить способность выбранного ингибитора АХЭ корректировать нарушения памяти у мышей с моделируемой БА *in vivo*;
5. Исследовать возможное влияние данного ингибитора АХЭ на уровень маркеров патологических изменений в головном мозге мышей с моделируемой БА;
6. Исследовать наличие модифицирующего заболевание эффекта в специализированных экспериментах, основанных на оценке параметров памяти и количества β -амилоидных

отложенный у мышей, после отмены терапии ингибитором АХЭ, снижающим олигомеризацию β -амилоида.

Научная новизна

В работе впервые показано, что в условиях моделируемой на трансгенных мышях БА, индуцируемая АХЭ олигомеризация β -амилоида вносит вклад в развитие патологических изменений головного мозга, главным образом, усиливая повреждение синаптических контактов в головном мозге. Кроме того, впервые было показано, что снижение связывания АХЭ с β -амилоидным пептидом за счет специфических блокаторов замедляет развитие нарушений памяти у трансгенных мышей, оказывая, таким образом, влияние на патогенез БА.

Научно-практическая значимость

В ходе работы были проведены исследования, свидетельствующие о том, что патологическое влияние индуцируемой АХЭ олигомеризации β -амилоида может быть существенно снижено за счет применения ингибиторов АХЭ, связывающихся в районе ПАС.

Полученные результаты могут найти применение в таких областях науки, как фундаментальная медицина, физиология, неврология. В частности, в области исследования патофизиологии БА. Результаты диссертационного исследования были внедрены в научно-образовательный процесс в Казанском (Приволжском) федеральном университете.

Положения, выносимые на защиту:

1. Блокада индуцируемой ацетилхолинэстеразой олигомеризации β -амилоида уменьшает количество β -амилоидных бляшек и, как следствие, частично предотвращает нарушение синаптических контактов в головном мозге мышей с генетической моделью данного заболевания;
2. Снижение индуцируемой ацетилхолинэстеразой олигомеризации β -амилоида улучшает способность к обучению у животных с моделью болезни Альцгеймера.

Достоверность полученных данных

Достоверность полученных данных подтверждается выполнением достаточного объема экспериментов, статистической обработкой полученных результатов.

Апробация работы

Результаты диссертации были доложены на 18-ой Международной Пушкинской школе-конференции молодых ученых «биология – наука XXI века» (Пушино, 20-26 апреля 2014), Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 25-28 мая 2015), Международной конференции «Доказательная медицина: достижения и барьеры (QiQUM 2015)» (Казань, 7-8 декабря 2015), 3-ей Российской конференции по медицинской химии (Казань, 28 сентября – 3 октября 2017), X Всероссийском с международным участием конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз 2017» (Казань, 25 – 28 октября 2017), Научной конференции

грантодержателей РНФ Современные тенденции в химии, биологии, медицине «От Молекулы к лекарству» (Казань, 26-28 ноября 2018).

Связь работы с научными программами и личный вклад диссертанта

Исследования проводились в соответствии с планами ИОФХ им. А.Е. Арбузова - обособленного структурного подразделения ФИЦ КазНЦ РАН (государственное задание №0217-2018-0003); поддержаны грантами РФФИ 13-00-40286-К, РНФ 14-50-00014 и РНФ 19-15-00344. Приведенные в работе результаты на всех этапах получены при личном участии соискателя, включая составление плана исследования, организацию и выполнение экспериментов, обработку, анализ и обсуждение полученных экспериментальных данных.

Реализация результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 3 -публикации в рецензируемых журналах (Scopus и Web of Science).

Структура и объем диссертационной работы

Объем диссертации составляет 116 страниц машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, выводов и списка литературы. Список цитируемой литературы включает 216 источников, из них 3 – отечественных и 213 – иностранных авторов. Диссертация иллюстрирована 18 рисунками и 3 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Фармакологическая модель болезни Альцгеймера. Фармакологическая модель БА была получена посредством внутрибрюшинных инъекций водного раствора скополамина гидробромида (антагониста мускариновых ацетилхолиновых рецепторов) в дозе 1 мг/кг мышам линии CD-1 (Питомник «Пушино», Московская область) обоих полов весом 25-30 г. за 40 минут до начала эксперимента. Ингибиторы холинэстераз вводились через 20 минут после введения скополамина гидробромида. Группа животных, получавших только инъекцию скополамина гидробромида, была определена как группа отрицательного контроля. В качестве положительной контрольной группы использовались мыши, получавшие только эквивалентное количество воды для инъекций.

Трансгенная (генетическая) модель болезни Альцгеймера. Эксперименты проводились на трансгенных мышах (Питомник «Пушино», Московская область) обоих полов весом 25-30 г, экспрессирующих химерный мышинный/человеческий белок - предшественник β -амилоида и мутантный человеческий пресенилин-1 – линия B6C3-Tg(APP695)85Dbo (далее APP/PS1). Наряду с прогрессирующим нарушением пространственной памяти модель характеризуется отложениями β -амилоида в головном мозге. Ингибиторы холинэстераз вводились за 20 минут до начала

эксперимента. Трансгенные APP/PS1 (Tg+) животные и животные дикого типа (Tg-), получившие эквивалентное количество воды для инъекций были определены как группы положительного и отрицательного контроля соответственно.

Поведенческие тесты. Исследование влияния соединения 35 на уровень двигательной и поведенческой активности мышей проведено в установке «открытое поле» (Open Science, Москва), разделенной на 37 частей. Животное помещалось в центр арены на 2 минуты. Оценивалось количество пересеченных квадратов, вертикальных стоек, заглядываний в «норки», актов груминга, и дефекации (фекальных болюсов) (Laetitia and Catherine, 2003). Выводы о состоянии пространственной памяти были сделаны на основании тестирования мышей в Т-лабиринте (OpenScience, Москва) в модели «вознаграждаемое чередование» (Deacon e tal., 2006). Эксперимент длился 14 дней, в ходе которого мыши с предварительной пищевой депривацией ежедневно выполняли по 6 пар тестов. Каждая пара испытаний включала принудительный и свободный выбор направления. Животное должно было обучиться чередовать рукава лабиринта, направляясь к приманке. Критерием обученности в тесте являлось выполнение минимум 5 из 6 правильных заходов в рукав с приманкой при свободном выборе направления в течение трех дней подряд.

В работе использовались две экспериментальные схемы тестирования животных в условиях трансгенной модели БА. В первом варианте введение препаратов осуществлялось в течение 18 дней во время поведенческого эксперимента в Т-лабиринте. Во втором варианте проведены эксперименты с «отменой терапии»: препараты вводили в течение 18 дней, а поведенческий тест начинали после отмены введения препаратов (Рисунок 1).



Рисунок 1 – Экспериментальная схема введения препаратов во время тестирования мышей в Т-лабиринте (А), экспериментальная схема введения препаратов в течение 18 дней с последующей отменой и тестированием мышей в Т-лабиринте (Б).

Анализ иммуноэкспрессии синаптофизина и окрашивание на β -амилоидные бляшки.

После поведенческих экспериментов трансгенных APP/PS1 (Tg+) мышей анестезировали изофлураном, транкардиально перфузировали 30 мл натрий-фосфатного буфера (PBS) (pH=7,4) и затем 4% раствором параформальдегида в PBS. После декапитации головной мозг извлекали, сутки выдерживали в 4% растворе параформальдегида и перекладывали в 30% раствор сахарозы в PBS, содержащий 0,02% азида натрия. Полушария головного мозга замораживали в заливочной среде Neg 50 и делали фронтальные срезы толщиной 20 мкм на моторизованном криостате Microm HM525

(ThermoScientific, США). Полученные срезы головного мозга инкубировали в PBS содержащем 0,1% Тритон X-100, 1% BSA и 1,5% NPS в течение 30 минут. Далее срезы перемещали в раствор первичных антител (разведение 1:500) и инкубировали 12 часов при 4°C, затем промывали PBS и инкубировали в растворе вторичных антител (разведение 1:200) в течение 1,5 часов при комнатной температуре в темноте. Для визуализации β -амилоидных отложений в течение 5 минут проводили окраску на β -амилоидные бляшки 1% раствором Тиофлафина S, разведенном в 50% этаноле. Оценку уровня иммуноэкспрессии синаптофизина, подсчет количества и площади β -амилоидных бляшек проводили с помощью конфокального сканирующего микроскопа LEICADM 6000 CFS. Анализ данных проводился в полях зрения энторинальной коры головного мозга размером 870x870 мкм и 140x140 мкм при увеличении x10 и x40 соответственно и зонах гиппокампа при увеличении x10. Результаты оценки уровня иммуноэкспрессии синаптофизина и количества β -амилоидных бляшек усреднялись по 6-8 срезам головного мозга каждого животного.

Токсикологические исследования. Оценку острой токсичности соединений проводили на мышах линии CD-1 (Миронов и др., 2012). Исследуемые соединения вводили внутривентриально в различных дозах группам животных (n=6). Продолжительность наблюдения за животными после введения препаратов составляла 14 дней. Расчет полудетальной дозы (ЛД₅₀) для каждого соединения проводили с помощью пробит-анализа.

Определение антихолинэстеразной активности. Антихолинэстеразную активность *in vitro* измеряли по методу Элмана (Ellman et al., 1961) на спектрофотометре PerkinElmer λ 25 путем измерения интенсивности цвета при длине волны 412 нм. Смесь 0,1М фосфатного буфера (pH=8,0), рекомбинантной человеческой ацетилхолинэстеразы (АХЭ) (Sigma-Aldrich), или бутирилхолинэстеразы (БуХЭ) сыворотки крови человека (Sigma-Aldrich) с различными концентрациями ингибиторов и 0,1М реактивом Элмана (Sigma-Aldrich) инкубировали в течение 5 минут при температуре 25°C. В качестве субстратов использовали ацетилтиохолин (АТХ) (Sigma-Aldrich), или бутирилтиохолин (БуТХ) (Sigma-Aldrich). Концентрацию полумаксимального ингибирования ферментов (IC₅₀) рассчитывали помощью уравнения Хилла.

Определение способности соединений ингибировать АХЭ головного мозга *in vivo*. Каждое из исследуемых соединений вводили внутривентриально мышам (n=5) в дозе ЛД₅₀. Контрольные животные получали эквивалентное количество растворителя. Через 30 минут после инъекции у животных экспериментальных и контрольной групп изымали головной мозг и замораживали в жидком азоте. Образцы головного мозга гомогенизировали при температуре 4°C в двух объемах лизирующего буфера (0,01М TrisHCl, 1М NaCl, 0,001М MgCl₂, 5x10⁻³М EDTA, 0,5% Tween 20), pH=7,4. Гомогенат центрифугировали (14000 об/мин, t=4°C) в течение 10 минут. Активность АХЭ гомогената головного мозга каждого животного из экспериментальных и контрольной групп

оценивали по методу Эллмана (Ellman et al., 1961). Для измерения содержания белка головного мозга к 20 мкл супернатанта добавляли 1480 мкл фосфатного буфера (0,05M, pH=8,0) и измеряли активность при 280 и 260 нм. Содержание белка рассчитывали по формуле $P=(1,45 \times A_{280} - 0,74 \times A_{260}) \times 75$ [мг/мл]. Средние значения активности АХЭ сравнивали, определяя процент ингибирования АХЭ головного мозга для каждого тестируемого соединения.

Определение способности снижать олигомеризацию β -амилоида *in vitro*. Для измерения степени агрегации β -амилоида *in vitro* 50 μ M $A\beta_{1-40}$ инкубировали в 0,215 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 8,0) отдельно, или с 230 μ M человеческой рекомбинантной АХЭ (Sigma-Aldrich) в присутствии исследуемого соединения в течение 24 часов. Далее к смеси добавляли 1,5 мМ Тиофлавина Т в 50 мМ глицин/NaOH буфере (pH 8,5). Интенсивность флуоресценции измеряли при 440 нм (возбуждение) и 490 нм (эмиссия) на флуоресцентном спектрофотометре CaryEclipse (Agilent Technologies, США) (Feng et al., 2009). Процент ингибирования агрегации, вызванной АХЭ, рассчитывали по следующему выражению: $100 - (IF_i/IF_0 \times 100)$, в котором IF_i и IF_0 - интенсивности флуоресценции в присутствии и в отсутствие тестируемого соединения.

Иммуноферментный анализ на растворимый β -амилоид. Иммуноферментный анализ проводили на гомогенизированных образцах мозга трансгенных APP/PS1 (Tg+) мышей (n=4). Буфер для гомогенизации содержал 50 мМ Трис (pH=7,4), 150 мМ NaCl, 50 мМ ЭДТА, 1% Triton X-100. Полученные гомогенаты центрифугировали при 15000 об/мин в течение 25 минут. Супернатант отбирали, разводили в 30 раз и анализировали на растворимый β -амилоид, используя колориметрический набор ELISA, специфичный для человеческого $A\beta_{1-40}$ или $A\beta_{1-42}$ (Invitrogen, США) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, стандарты ($A\beta_{1-40}$, или $A\beta_{1-42}$, концентрацией 0-50 пг/мл) и образцы супернатанта, содержащие коктейль ингибиторов протеаз (Sigma-Aldrich) инкубировали в планшетах, покрытых кроличьими антителами к человеческому $A\beta_{1-40}$, или $A\beta_{1-42}$ в течение 3 часов при комнатной температуре, а затем с кроличьими антителами IgG, конъюгированными с пероксидазой хрена, в течение 30 минут. Хромоген (100 мкл) добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 30 минут в темноте. Оптическую плотность оценивали в двухволновом режиме: основной фильтр – 450нм, референс-фильтр – 655нм на микропланшетном ридере (Tecan, Швейцария).

Определение концентрации блокатора индуцируемой АХЭ олигомеризации β -амилоида в ткани головного мозга. Для определения концентрации исследуемого соединения в головном мозге, образцы гомогенизировали в 29 объемах 0,9% NaCl в гомогенизаторе Ultra-Turax T-18 при скорости 12000 об./мин в течение 2 минут. 0,5 мл гомогената смешивали с 1 мл хлористого метилена. Пробы перемешивали в течение 10 минут, слои разделяли центрифугированием в течение 6 минут при скорости 5000 об./мин. Нижний органический слой переносили в грушевидную колбу и упаривали

досуха. Сухой остаток растворили в 0,5 мл метанола. Полученные растворы переносили в хроматографические виалы. Концентрацию соединения в пробах определяли с помощью метода жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (Agilent 1200 HPLC system, Agilent Technologies, USA; Amazon X mass-spectrometer, Bruker Daltonik GmbH, Germany).

Статистический анализ. Результаты представлены в виде среднего значения и среднеквадратической ошибки. Статистическая значимость различий оценивалась в зависимости от исследуемых данных с помощью теста Манна-Уитни и точного теста Фишера. Отличия считались значимыми при $p < 0,05$. Обработку данных проводили при помощи компьютерных программ OriginPro 8.5 и IBM SPSS Statistics 22.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка изменения уровня иммуноэкспрессии синаптофизина в условиях генетической модели болезни Альцгеймера в качестве маркера патологического процесса

Первый этап данного исследования был посвящен выбору трансгенной модели БА, а также сочетания маркеров патологических изменений в головном мозге мышей с данной моделью БА, которые максимально позволили бы интерпретировать снижение количества амилоидных отложений в качестве наиболее вероятной причины ухудшения пространственной памяти.

Известно, что одну из ключевых ролей в патогенезе БА играет нарушение функционирования синапсов, которое хорошо коррелирует с началом когнитивных нарушений (Selkoe, D. J., 2002; Scheff et al., 2006; Forner et al., 2017; Jackson et al., 2019). Также, известно, что у мышей линии APP/PS1 гибель основной части синаптических контактов происходит именно в области β -амилоидных бляшек из-за высокой концентрации вокруг бляшки растворимого олигомеризованного β -амилоида (Koffie et al., 2009). О токсическом влиянии на синаптический аппарат с высокой долей вероятности можно судить по изменению интенсивности иммуноэкспрессии белка-маркера пресинаптических везикул синаптофизина (Gould et al., 1986). Поэтому, в рамках данной диссертационной работы нами была предпринята попытка использовать изменение уровня иммуноэкспрессии синаптофизина в качестве маркера, позволяющего связать уменьшение количества амилоидных бляшек с улучшением когнитивных функций мышей линии APP/PS1. С этой целью, мыши дикого типа (Tg-) и трансгенные мыши линии APP/PS1 (Tg+) тестировались на способность к обучению в Т-лабиринте. После окончания теста в Т-лабиринте было проведено двойное окрашивание срезов энторинальной коры головного мозга мышей на β -амилоидные бляшки и синаптофизин. Причем одновременно анализировались как локальные изменения иммуноэкспрессии синаптофизина в районе каждой имеющейся на срезе β -амилоидной

бляшки, так и средняя интенсивность иммуноэкспрессии синаптофизина на всем срезе энторинальной коры.

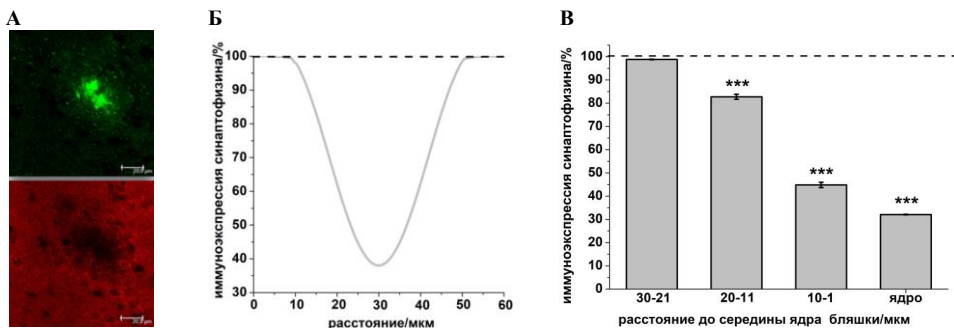


Рисунок 2 – Количественная оценка иммуноэкспрессии синаптофизина в области одной конкретной Аβ бляшки (А, Б) и среднее значение в областях, лежащих на разном расстоянии от центра ядра Аβ бляшки (В) трансгенных APP/PS1 (Tg⁺) мышей. Пунктирная линия показывает среднее значение иммуноэкспрессии синаптофизина в энторинальной коре головного мозга контрольной группы мышей дикого типа (Tg⁻). Данные представлены как средние значения ± SEM. ***-различие с контролем статистически достоверно при $p \leq 0,001$. Статистический анализ проведен с помощью теста Манна-Уитни.

Поведенческий тест показал, что мыши дикого типа (Tg⁻) выбрали правильное направление в Т-лабиринте в 67,92±2,46% случаев, в то время как для трансгенных мышей линии APP/PS1 (Tg⁺) этот показатель составил 56,66±2,97% ($p < 0,05$). При этом критерия обученности достигли 60% и 20% мышей соответственно ($p < 0,01$).

Количественное исследование среднего уровня иммуногистохимически выявленного синаптофизина на всем срезе энторинальной коры трансгенных APP/PS1 (Tg⁺) мышей показало статистически значимое снижение средней интенсивности на срезе до 70,63±2,9% ($p < 0,001$) по сравнению с мышами дикого типа (Tg⁻).

Анализ локальных изменений интенсивности иммуноэкспрессии синаптофизина в районе каждой β-амилоидной бляшки на срезах энторинальной коры контрольной группы мышей линии APP/PS1 (Tg⁺) показал, что максимальное снижение интенсивности флуоресценции в среднем до 32,06±0,14% в контроле наблюдалось в «центре» бляшки (Рисунок 2А, Б). Однако, по мере удаления от «центра» бляшки интенсивность иммуноэкспрессии восстанавливалась и на расстоянии 30 мкм не отличалась от средней интенсивности у животных дикого типа (Рисунок 2В). Таким образом, можно заключить, что в условиях данной генетической модели БА снижение интенсивности экспрессии синаптофизина происходит главным образом локально, в районе β-амилоидных бляшек. Данный вывод представляется крайне важным, поскольку в условиях данной модели БА позволяет интерпретировать снижение количества амилоидных бляшек в качестве важного или даже

основного механизма, способствующего снижению токсических эффектов β -амилоида в отношении синаптических контактов. В свою очередь, снижение токсического влияния на синапсы с высокой долей вероятности может быть интерпретировано как причина для улучшения способности к обучению.

Исследование антихолинэстеразной активности ряда производных 6-метилурацила

На следующем этапе исследований среди производных 6-метилурацила нами был проведен поиск блокатора индуцируемой АХЭ олигомеризации β -амилоидного пептида, наиболее подходящий для проведения исследований в условиях модели БА *in vivo*. С этой целью были проведены оценка антихолинэстеразной активности ряда производных 6-метилурацила *in vitro*, исследована их острая токсичность и способность ингибировать АХЭ мозга *in vivo*.

Соединение с лабораторным шифром №35 (далее соединение 35; Таблица 1) показало себя как наиболее эффективный ингибитор АХЭ головного мозга среди исследованных производных 6-метилурацила, учитывая достаточно низкую токсичность данного соединения, это позволило считать его перспективным в качестве ингибитора АХЭ, предназначенного для исследования вклада индуцируемой АХЭ олигомеризации β -амилоида в патогенез БА в условиях модели данного заболевания на животных (Таблица 1).

Таблица 1. Ингибирование активности ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы *in vitro* и *in vivo* производными 6-метилурацила, оценка их острой токсичности.

Соединение	n	R ^{n(c)}	*АХЭ эритроцитов человека, IC ₅₀ [нМ]	*БуХЭ сыворотки крови человека, IC ₅₀ [мкМ]	ЛД ₅₀ , мг/кг, мыши, в/б	*#Ингибирование активности АХЭ в мозге, %
35	3	R ¹ =NO ₂	3,5±0,5	35±5	51,5	70,6±0,7
59	4	R ¹ =NO ₂	83±1	90±3	93,1	3,14±0,6
60	3	R ¹ =CF ₃	5,6±0,7	200±2	90,0	52,6±16,3
61	4	R ¹ =CF ₃	1,4±0,1	200±2	90,0	57,9±10,9
69	2	R ¹ =CF ₃	67±8	20±1,3	284,6	59,4±4,5
70	3	R ¹ =CF ₃ , R ² =CF ₃	44±4	20±1,8	64,3	6,2±1,9
71	3	R ¹ -R ⁵ =F	21±2	0,8±0,1	245,4	45,7±11,3
72	2	R ¹ =NO ₂	47±2,3	50±3	281,0	37,6±7,5
73	3	R ¹ =NO ₂ , R ⁵ =F	550±40	50±3	407,6	50,6±11,2

*Значения представляют собой среднее ± SEM.

#При введении мышам дозы ЛД₅₀.

Исследование влияния соединения 35 на индуцируемую АХЭ олигомеризацию β -амилоида *in vitro*

Для соединения 35, отобранного по результатам предыдущих экспериментов, была исследована способность снижать индуцируемую АХЭ олигомеризацию фрагментов $A\beta_{1-40}$ *in vitro*. Было показано, что соединение 35 в концентрации 10нм, полностью ингибирующей АХЭ, действительно демонстрирует способность снижать индуцированную АХЭ олигомеризацию фрагментов $A\beta_{1-40}$: за 24 часа олигомеризация снижалась на $35\pm 9\%$ ($p < 0,05$). При этом само по себе соединение 35 не оказывало влияния на скорость спонтанной олигомеризацию фрагмента β -амилоида $A\beta_{1-40}$. Таким образом, соединение 35 может быть применено для исследования вклада индуцируемой АХЭ олигомеризации β -амилоида в патогенез БА.

Исследование влияния соединения 35 и донепезила гидрохлорида на параметры памяти мышей в условиях фармакологической модели болезни Альцгеймера

До начала экспериментов на трансгенных животных нами был определен диапазон доз соединения 35, являющихся эффективными для коррекции нарушений памяти в условиях фармакологической модели БА. По результатам исследования соединения 35 в условиях вызванной инъекцией скополамина гидробромидом амнезии было показано, что внутрибрюшинное введение соединения 35 в дозе 5 мг/кг, или используемого в клинике ингибитора АХЭ донепезила гидрохлорида в дозе 1 мг/кг значительно уменьшило вызванный скополомина гидробромидом дефицит памяти: критерия обученности достигли 80% мышей в обеих группах. Мыши, получавшие соединение 35 (5 мг/кг), выбирали правильное направление в $65,95\pm 4,02\%$ тестах, а мыши, получавшие препарат сравнения донепезила гидрохлорид в $68,17\pm 4,87\%$, при этом статистически достоверные различия с контрольной группой отсутствовали. Дозы 1 мг/кг, 10 мг/кг и 15 мг/кг оказались менее эффективными: средний процент выбора правильного направления в группах составил $58,18\pm 3,44\%$ ($p < 0,01$), $63,92\pm 2,33\%$ ($p < 0,05$) и $63,54\pm 2,12\%$ ($p < 0,05$) соответственно. В группе мышей, получавших соединение 35 в дозе 1 мг/кг, обучилось только 30% ($p < 0,05$) животных, в группах, получавших 10 и 15 мг/кг, обучились 70% и 40% ($p < 0,05$) животных соответственно. Таким образом, наиболее эффективная доза соединения 35 в условиях фармакологической модели БА, составила 5 мг/кг.

Исследование влияния соединения 35 на уровень двигательной и поведенческой активности мышей

Перед оценкой влияния подобранной эффективной для коррекции скополаминовой амнезии дозы соединения 35, составившей 5 мг/кг, на параметры памяти в условиях генетической модели болезни Альцгеймера, было оценено влияние соединения 35 на уровень двигательной и поведенческой активности трансгенных APP/PS1 (Tg+) мышей в тесте «открытое поле». Трансгенные мыши в

контроле пересекли в среднем $33,1 \pm 5,6$ квадратов на арене «открытого поля», для группы мышей, получавших соединение 35, этот показатель составил $23,1 \pm 4,4$. Количество заглядываний в «норки» не отличалось между группами и составило $6,9 \pm 0,9$ в контроле и $5,8 \pm 1,3$ в группе мышей, получавших соединение 35. Трансгенные животные в контроле выполнили в среднем $5,3 \pm 2,1$ вертикальных стоек, а животные, получавшие соединение 35 $1,6 \pm 1$ стоек. Количество болюсов в контрольной группе трансгенных мышей и группе получавшей соединение 35 составило $1,57 \pm 0,6$ и $1,0 \pm 0,6$ соответственно, что свидетельствует о низком уровне тревожности животных. Периоды груминга практически отсутствовали в обеих группах трансгенных животных (Рисунок 3). Важно отметить, что ни по одному из показателей не было значимых различий с показателями контрольных трансгенных APP/PS1 (Tg+) мышей. Таким образом, соединение 35 не вызывает нарушений двигательной и поведенческой активности трансгенных APP/PS1 (Tg+) мышей.

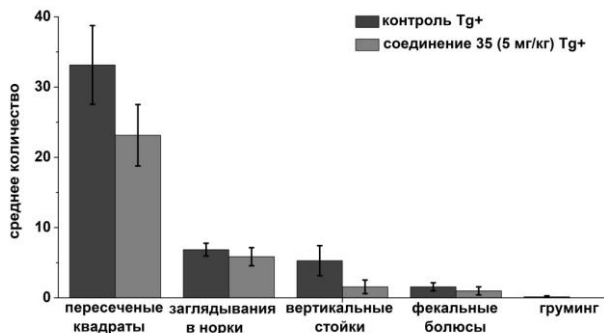


Рисунок 3 – Среднее количество пересеченных квадратов, заглядываний в «норки», вертикальных стоек, актов дефекации (фекальных болюсов) и груминга в контрольной группе трансгенных APP/PS1 (Tg+) мышей и группе трансгенных мышей, получавших соединение 35 в дозе 5 мг/кг. Данные представлены как средние значения \pm SEM. Статистический анализ проведен с помощью теста Манна-Уитни.

Исследование влияния соединения 35 и донепезила гидрохлорида на параметры памяти мышей в условиях генетической модели болезни Альцгеймера

По результатам тестирования трансгенных мышей в Т-лабиринте (Рисунок 1А) было показано, что соединение 35 в дозе 5 мг/кг при внутривнутрибрюшинном введении достоверно улучшало пространственную память APP/PS1 (Tg+) мышей, что совпадает с эффективной дозой соединения, найденной в ходе поведенческих испытаний на фармакологической модели БА: обучилось 70% мышей, а процент выбора правильного направления составил $63,31 \pm 2,2\%$ (Рисунок 4), что находится на уровне показателей мышей дикого типа (Tg-). Трансгенные мыши, получавшие соединение 35 в

дозе 1 мг/кг выбирали правильное направление только в $59,12 \pm 2,6\%$ ($p < 0,05$) тестов, а критерия обученности достигли лишь 43% ($p < 0,05$) мышей, что в два раза меньше, чем в группе дикого типа (Tg-). Аналогичный эффекту соединения 35, эффект донепезила гидрохлорида на параметры пространственной памяти мышей достигался при применении дозы 0,75 мг/кг при внутривбрюшинном введении. Так, количество обученных мышей (60%) и процент выбора правильного рукава лабиринта ($60,78 \pm 2,51\%$) трансгенных (Tg+) APP/PS1 мышей, получавших донепезила гидрохлорид (0,75 мг/кг, в/б) достоверно не отличаются от показателей животных дикого типа (Tg-).

Изучение способности соединения 35 и донепезила гидрохлорида оказывать влияние на агрегированные и растворимые формы β -амилоида *in vivo*

После окончания теста в Т-лабиринте головной мозг трансгенных APP/PS1 (Tg+) мышей изымался для оценки количества и площади β -амилоидных агрегатов (бляшек), а также для оценки уровня растворимых форм β -амилоида. Введение соединения 35 в дозе 5 мг/кг (18 дней) значительно снизило количество β -амилоидных депозитов и процент площади, занимаемый бляшками в областях гиппокампа и энторинальной коры головного мозга APP/PS1 мышей. Так, количество бляшек в зоне зубчатой извилины (DG) гиппокампа снизилось с $13,10 \pm 1,01$ ($p < 0,001$) у трансгенных мышей в контрольной группе, до $7,31 \pm 0,66$ ($p < 0,001$) у мышей, получавших соединение 35, а их площадь с $0,84 \pm 0,07\%$ до $0,45 \pm 0,05\%$ ($p < 0,001$) соответственно. В зоне СА3 гиппокампа произошло снижение количества бляшек с $2,52 \pm 0,65$ до $0,62 \pm 0,16$ ($p < 0,05$), а их площади с $0,14 \pm 0,04$ до $0,03 \pm 0,01$ ($p < 0,05$). Значимое снижение количества и площади β -амилоидных депозитов выявлено в зоне энторинальной коры головного мозга: количество снизилось с $26,69 \pm 1,57$ до $13,38 \pm 1,31$ ($p < 0,001$), площадь с $0,73 \pm 0,05\%$ до $0,38 \pm 0,09\%$ ($p < 0,001$; Рисунки 5,6). Введение донепезила гидрохлорида достоверно снизило количество β -амилоидных бляшек только в энторинальной коре головного мозга APP/PS1 мышей по сравнению с контролем: показано снижение количества бляшек до $18,62 \pm 3,26$ ($p < 0,05$) и занимаемой ими площади до $0,38 \pm 0,09\%$ ($p < 0,001$; Рисунки 5,6). Таким образом, можно заключить, что как донепезила гидрохлорид, так и соединение 35 оказывают эффект на количество и площадь амилоидных отложений. Однако эффект на количество амилоидных отложений после применения соединения 35 был более выражен чем аналогичное действие донепезила гидрохлорида.

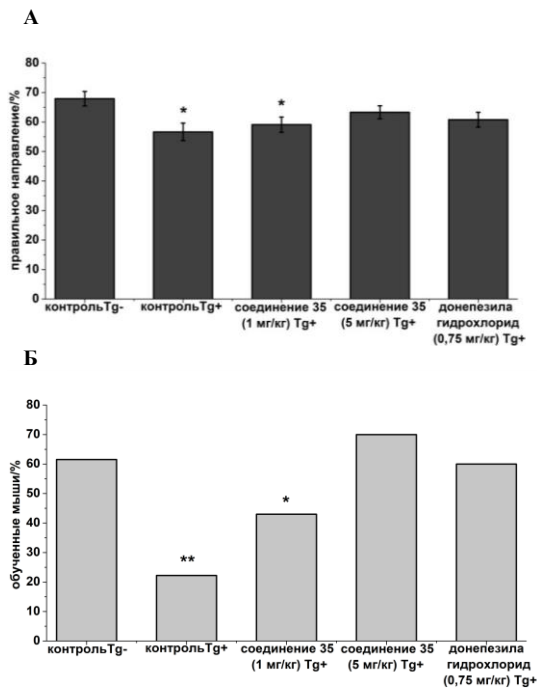


Рисунок 4 – процент выбора правильного направления трангенными APP/PS1 (Tg+) мышами (А) и количество трангенных мышей, достигших критерия обученности (Б) в Т-лабиринте в контрольной группе трангенных мышей, в контрольной группе мышей дикого типа (Tg-) и группах трангенных мышей, получавших донепезила гидрохлорид (0,75 мг/кг) и соединение 35 (1 мг/кг и 5 мг/кг). Данные представлены как средние значения \pm SEM. **-различие с контролем статистически достоверно при $p \leq 0,01$, *-при $p \leq 0,05$. Статистический анализ проведен с помощью теста Манна-Уитни (А) и точного теста Фишера (Б).

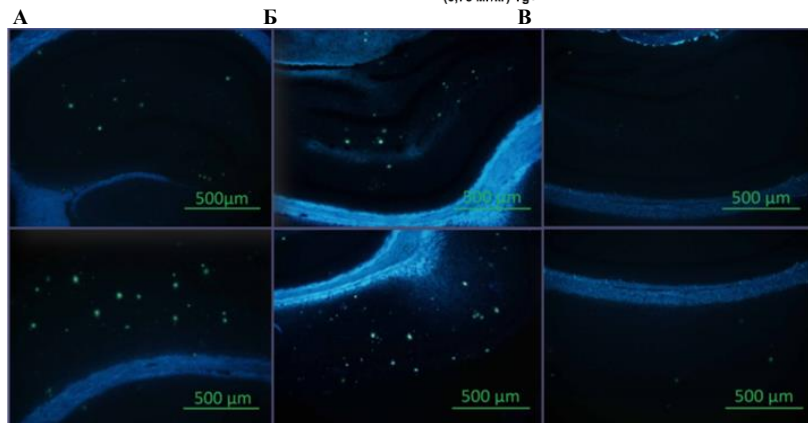
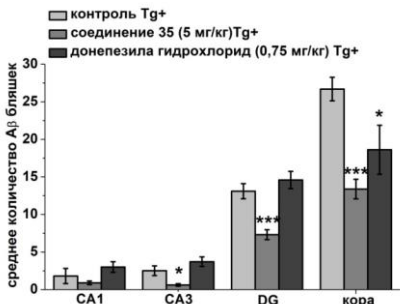


Рисунок 5 – β -амилоидные депозиты в зонах гиппокампа (сверху) и энторинальной коры (снизу) контрольных трангенных APP/PS1 (Tg+) мышей (А), трангенных мышей после введения донепезила гидрохлорид (1 мг/кг) (Б), трангенных мышей после введения соединения 35 (5 мг/кг) (В) (Увеличение $\times 10$)

А



Б

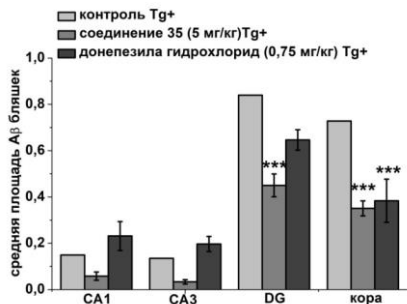


Рисунок 6 – Среднее количество (А) и площадь (Б) β -амилоидных бляшек (в поле зрения, увеличение $\times 10$) в зонах гиппокампа, и энторинальной коре головного мозга трансгенных APP/PS1 (Tg+) мышей контрольной группы и групп, получавших соединение 35 (5 мг/кг) и донепезила гидрохлорид (0,75 мг/кг). Данные представлены как средние значения \pm SEM. *-различие с контролем статистически достоверно при $p \leq 0,05$; *** при $p \leq 0,001$. Статистический анализ проведен с помощью теста Манна-Уитни.

Снижая количество β -амилоидных депозитов в головном мозге трансгенных мышей, соединение 35 способно увеличить среднее количество растворимых форм β -амилоида в энторинальной коре. Так, введение соединения 35 в дозе 5 мг/кг в течение 18 дней увеличивало среднюю концентрацию растворимого $A\beta_{1-40}$ с 826 ± 100 пг/мг в контроле до 2000 ± 513 ($p < 0,05$), не оказав достоверного влияния на концентрацию более токсичного фрагмента $A\beta_{1-42}$ – концентрация $A\beta_{1-42}$ составила 859 ± 57 пг/мг в контроле и 1049 ± 82 пг/мг после введения соединения 35.

Сравнительная оценка влияния соединения 35 и донепезила гидрохлорида на уровень иммуноэкспрессии синаптофизина

Количественное исследование иммуногистохимически выявленного синаптофизина на срезах энторинальной коры головного мозга трансгенных APP/PS1 (Tg+) мышей показало, что у животных, получавших донепезила гидрохлорид, средняя интенсивность иммуноэкспрессии синаптофизина была достоверно ниже, чем у мышей дикого типа и составила $84,06 \pm 4,37\%$ ($p < 0,01$). При этом на срезах коры головного мозга трансгенных животных, получавших соединение 35, не показано значимых отличий от уровня здоровых животных (интенсивность иммуноэкспрессии синаптофизина в этой группе составила $94,77 \pm 3,81\%$ от контроля) (Рисунок 7). Таким образом, можно предположить, что терапия ингибитором АХЭ, снижающим олигомеризацию β -амилоида, намного более выражено уменьшает токсическое действие амилоида на синаптические контакты у мышей с генетической моделью БА чем традиционный ингибитор АХЭ. Кроме того, важно отметить, что увеличение средней концентрации растворимого $A\beta_{1-40}$, которое сопровождается снижением количества амилоидных бляшек при применении соединения 35, вероятно, не оказывает

дополнительного токсического эффекта в отношении синапсов. Основываясь на результатах данных экспериментов можно предположить, что ингибиторы АХЭ, снижающие индуцируемую АХЭ олигомеризацию β -амилоида, будут способны оказывать более выраженный модифицирующий патогенез БА эффект чем традиционные ингибиторы АХЭ.

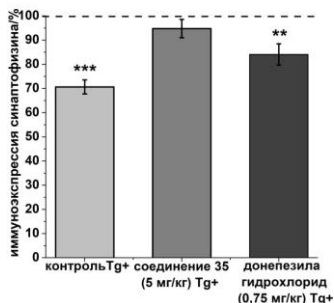


Рисунок 7 – интенсивность иммуноэкспрессии синаптофизина в энторинальной коре головного мозга трансгенных APP/PS1 (Tg+) мышей контрольной группы и групп, получавших соединение 35 (5 мг/кг) и донепезила гидрохлорид (0,75 мг/кг). Пунктирная линия показывает среднее значение иммуноэкспрессии синаптофизина в энторинальной коре головного мозга контрольной группы мышей дикого типа (Tg-). Данные представлены как средние значения \pm SEM. ***- различие с контрольной группой мышей дикого типа статистически достоверно при $p \leq 0,001$, ** - при $p \leq 0,01$. Статистический анализ проведен с помощью теста Манна-Уитни.

Исследование параметров памяти и количества β -амилоидных депозитов после отмены терапии соединением 35 и донепезила гидрохлоридом

Для выявления возможного модифицирующего БА компонента действия, нами были проведены эксперименты «с отменой» введения препаратов (Рисунок 1 Б): соединение 35, донепезила гидрохлорид и физиологический раствор вводили внутривентриально трансгенным APP/PS1 (Tg+) мышам в течение 18 дней, а поведенческий тест начинали после отмены введения препаратов.

Для того чтобы определить какой временной период необходим для того, чтобы соединение 35 было выведено из головного мозга на момент начала поведенческого теста, предварительно были проведены эксперименты по определению концентрации соединения 35 в головном мозге методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением масс-спектрометрического детектирования. Было обнаружено, что задержка начала обучения мышей в 3 суток после отмены терапии достаточна, чтобы утверждать, что на момент начала поведенческого теста соединение 35 уже не присутствует в головном мозге мышей в физиологически активных концентрациях.

Поведенческие тесты, проведенные после отмены введения препаратов, показали, что мыши дикого (Tg-) типа в контрольной группе выбирали правильное направление в Т-лабиринте в 70,04 \pm 2,3% случаев, а для APP/PS1 (Tg+) мышей этот показатель составил 55,35 \pm 1,91% ($p < 0,001$; Рисунок 8). В контрольной группе мышей дикого типа (Tg-) критерия обученности достигли 75% мышей, при этом в контрольной группе трансгенных животных никто из мышей не обучился

($p < 0,001$). После отмены терапии соединением 35 и донепезила гидрохлоридом процент обученных мышей составил 44% и 13%, а правильное направление выбирали $65,64 \pm 2,63\%$ и $58,24 \pm 2,65\%$ животных ($p < 0,01$) соответственно. При этом показатели мышей после отмены терапии соединением 35 значимо не отличались от показателей животных в норме, но достоверно отличались от показателей группы мышей после отмены терапии донепезила гидрохлоридом ($p < 0,01$; Рисунок 8). На момент окончания поведенческого теста, в контрольной группе APP/PS1 (Tg+) мышей количество β -амилоидных отложений составляло $36,64 \pm 1,71$, а в группе трансгенных мышей, получавших донепезила гидрохлорид $30,76 \pm 1,9$ ($p < 0,001$), что только на 16% меньше по сравнению с контрольной группой трансгенных животных. В группе трансгенных мышей, получавших соединение 35, количество β -амилоидных бляшек составило $19,66 \pm 1,46$ ($p < 0,001$), что на 46% ниже, чем в контроле. При этом наблюдались достоверно значимые отличия и между группами, получавшими донепезила гидрохлорид и соединение 35 ($p < 0,001$; Рисунок 8).

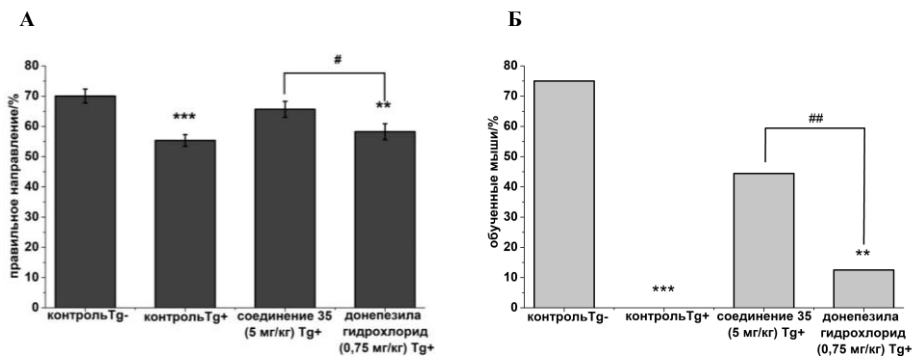


Рисунок 8 – процент выбора правильного направления трансгенными APP/PS1 (Tg+) мышами (А) и количество трансгенных мышей, достигших критерия обученности (Б) в Т-лабиринте в контрольной группе трансгенных мышей, в контрольной группе мышей дикого типа (Tg-) и группах трансгенных мышей, получавших донепезила гидрохлорид (0,75 мг/кг) и соединение 35 (5 мг/кг) после отмены терапии. Данные представлены как средние значения \pm SEM. ***-различие с контрольной группой мышей дикого типа статистически достоверно при $p \leq 0,001$, ** - при $p \leq 0,01$; ##-различие с группой трансгенных мышей, получавших донепезила гидрохлорид статистически достоверно при $p \leq 0,01$, #-при $p \leq 0,05$. Статистический анализ проведен с помощью теста Манна-Уитни (А) и точного теста Фишера (Б).

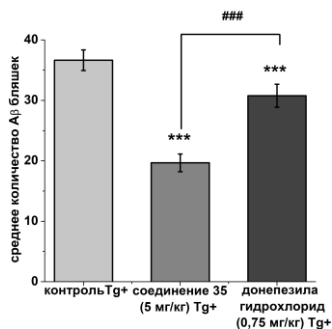


Рисунок 9 – Среднее количество β -амилоидных бляшек (в поле зрения, увеличение $\times 10$) в энторинальной коре головного мозга трансгенных APP/PS1 (Tg⁺) мышей контрольной группы и групп, получавших соединение 35 (5 мг/кг) и донепезила гидрохлорид (0,75 мг/кг) после отмены терапии. Данные представлены как средние значения \pm SEM. ***-различие с контрольной группой трансгенных мышей статистически достоверно при $p \leq 0,001$; ###-различие с группой трансгенных мышей, получавших донепезила гидрохлорид статистически достоверно при $p \leq 0,001$. Статистический анализ проведен с помощью теста Манна-Уитни.

Таким образом, можно заключить, что соединение 35 в условиях данной модели БА способно оказывать намного более выраженный модифицирующий заболевание эффект чем донепезил гидрохлорид, что выражается в улучшении пространственной памяти и сопровождается более выраженным снижением количества амилоидных депозитов.

Данные эксперименты с блокатором индуцируемой АХЭ олигомеризации β -амилоидного пептида могут быть интерпретированы и с точки зрения анализа вклада данного процесса в формирование нарушений пространственной памяти у мышей с БА. Можно утверждать, что индуцируемая АХЭ олигомеризация β -амилоида (частично устраняемая соединением 35), вносит вклад в формирование нарушений памяти в условиях генетической модели БА на мышах. Механизмом, опосредующим этот отрицательный эффект АХЭ на пространственную память, в данной модели БА, вероятно, является усиление синаптической дисфункции из-за увеличения количества амилоидных бляшек и связанного с этим увеличения локальной концентрации растворимого олигомеризованного β -амилоидного пептида.

ВЫВОДЫ

1. Изменение уровня иммуноэкспрессии синаптофизина в энторинальной коре головного мозга трансгенных APP/PS1 (Tg⁺) мышей, которое напрямую коррелирует с количеством амилоидных бляшек, может использоваться как инструмент для анализа влияния АХЭ-индуцированной агрегации β -амилоидного пептида на пространственную память;
2. При анализе ингибиторной активности и токсичности ряда производных урацила выявлено соединение 35, которое способно эффективно ингибировать АХЭ головного мозга *in vivo* и обладает при этом достаточно низкой токсичностью, чтобы применяться на модели БА;
3. Для соединения 35 в условиях *in vitro* показана способность снижать АХЭ-индуцированную агрегацию β -амилоидного пептида;

4. Соединение 35 в дозе 5 мг/кг при внутрибрюшинном введении способно как купировать симптомы нарушений памяти, так и снижать количество β -амилоидных бляшек в энторинальной коре головного мозга мышей с моделируемой БА;
5. Терапия соединением 35 приводит к увеличению в энтоинальной коре головного мозга мышей с моделью БА количества растворимого фрагмента β -амилоидного пептида 1-40, в то время как уровень более токсичного фрагмента 1-42 остается без изменений;
6. Применение соединения 35 предотвращает снижение иммуноэкспрессии синаптофизина в энторинальной коре головного мозга мышей с моделью БА;
7. Индуцируемая АХЭ олигомеризация β -амилоида (частично устраняемая соединением 35), вносит вклад в формирование нарушений памяти в условиях генетической модели БА на мышах.

Список научных работ, опубликованных автором по теме диссертации

Статьи:

1. Semenov V. E. 6-Methyluracil derivatives as bifunctional acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. / V.E. Semenov, **I.V. Zueva**, M.A. Mukhamedyarov, S.V. Lushchekina, A.D. Kharlamova, E.O. Petukhova, A.S. Mikhailov, S.N. Podyachev, L.F. Saifina, K.A. Petrov, O.A. Minnekhanova, V.V. Zobov, E.E. Nikolsky, P. Masson, V.S. Reznik. //ChemMedChem., 2015. – Vol. 10. – P. 1863–1874. (Статья Scopus, WOS), автора – 0,7п.л.
2. Lushchekina S.V. Supercomputer modeling of dual-site acetylcholinesterase (AChE) inhibitor./ S.V. Lushchekina, G.F. Makhaeva, D.A. Novichkova, **I.V. Zueva**, N.V. Kovaleva, R.J. Richardson // Supercomputer Frontiers and Innovations, 2018. – Vol.5. №4. – P. 89–97. (Статья Scopus), автора – 0,16 п.л.
3. **Zueva I.** New evidence for dual binding site inhibitors of acetylcholinesterase as improved drugs for treatment of Alzheimer's disease. / I. Zueva, J. Dias, S. Lushchekina, V. Semenov, M. Mukhamedyarov, T. Pashirova, V. Babaev, F. Nachon, N. Petrova, L. Nurullin, L. Zakharova, V. Piyin, P. Masson, K. Petrov. // Neuropharmacology., 2019 – Vol. 155. – P. 131-141. (Статья Scopus, WOS), автора – 0,6 п.л.

Материалы и тезисы конференций:

1. **Зуева И.В.** Блокада «Периферического анионного пункта» ацетилхолинэстеразы производными 6-метилурацила как способ терапии болезни Альцгеймера. / И.В. Зуева, Е.О. Петухова, К.А. Петров, М.А. Мухамедьяров, В.В. Зобов, В.Э. Семенов, Е.Е. Никольский, В.С. Резник / БИОЛОГИЯ – наука XXI ВЕКА: 18-я Международная Пущинская школа-конференция

молодых ученых. Сборник тезисов. (Пушино, 21 – 25 апреля 2014 г.). – Пушино, 2014. – С.339, автора – 0,03 п.л.

2. **Зуева И.В.** Коррекция памяти и количества бета-амилоидных отложений производными 6-метилурацила в головном мозге мышей с моделируемой болезнью Альцгеймера. / И.В. Зуева, Е.О. Петухова, К.А. Петров, М.А. Мухамедьяров, В.В. Зобов, В.Э. Семенов, Е.Е. Никольский, В.С. Резник / Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. Т.2. / под ред. В.П. Зинченко, А.В. Бережнова. – Пушино: цифровая типография Fix-Print, 2015. – С.634–635, автора – 0,08 п.л.

3. **Zueva I.** 6-Methyluracil derivatives as acetylcholinesterase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. / I. Zueva, V.E. Semenov, M.A. Mukhamedyarov, S.V. Lushchekina, A.D. Kharlamova, E.O. Petukhova, A.S. Mikhailov, S.N. Podyachev, L.F. Saifina, K.A. Petrov, O.A. Minnekhanova, V.V. Zobov, E.E. Nikolsky, P. Masson, V.S. Reznik. // International Journal of Risk & Safety in Medicine, 2015 – Vol. 27. – P. 69–71, автора – 0,08 п.л.

4. **Zueva. I.V.** 6-methyluracil derivatives as dual binding site acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer disease treatment. / I.V. Zueva, V.S. Semenov, K.A. Petrov, M.A. Mukhamedyarov, A.E. Tihonova, R.M. Kayumova, E.E. Nikolsky / 3rd Russian conference on medical chemistry. Abstract book. (Kazan, September 28– October 03, 2017). - Kazan, 2017. – P.136, автора – 0,03 п.л.

5. **Зуева И.В.** Оценка эффективности производных 6-метилурацила для коррекции нарушений памяти при болезни Альцгеймера. / И.В. Зуева, К.А. Петров, В.Э. Семенов, Р.М. Каюмова, А.Е. Тихонова / X Всероссийский конгресс молодых ученых-биологов «Симбиоз – 2017». Сборник тезисов. (Казань, 25 – 28 октября 2017 г.) / под общ. ред. Т.В. Балтиной, Г.Г. Яфаровой. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2017. – С.230 – 232, автора – 0,04 п.л.

6. **Зуева И.В.** Ингибиторы двух сайтов связывания ацетилхолинэстеразы – производные 6-метилурацила в качестве препаратов для терапии болезни Альцгеймера. / И.В. Зуева, В.Э. Семенов, К.А. Петров, М.А. Мухамедьяров, А.Е. Тихонова, Р.М. Каюмова. / Научная конференция грантодержателей РНФ «Современные тенденции в химии, биологии, медицине. От молекулы к лекарству» (Казань, 26 – 28 ноября 2018 г.): тезисы докладов.– Казань: ИОФХ им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН, 2018. – С.82, автора – 0,03 п.л.

Список сокращений

Aβ	β-амилоид
IC₅₀	Среднеингибирующая концентрация
PBS	Phosphate buffered saline (натрий-фосфатный буфер)
ATX	Ацетилтиохолин
AX	Ацетилхолин
AXP	Ацетилхолиновые рецепторы
AXЭ	Ацетилхолинэстераза
БА	Болезнь Альцгеймера
БПА	Белок предшественник амилоида
БуТХ	Бутирилтиохолин
БуХЭ	Бутирилхолинэстераза
в/б	Внутрибрюшинно
ВЭЖХ МС	Высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрией
ГЭБ	Гемато-энцефалический барьер
ЛД₅₀	Полулетальная доза
ПАС	Периферический анионный сайт
ХАТ	Холинацетилтрансфераза

Эл. почта автора: zueva.irina.vladimirovna@gmail.com

Адрес для отзывов на автореферат: 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18, Казанский (Приволжский) федеральный университет, отдел аттестации научно-педагогических кадров, ученому секретарю Диссертационного совета КФУ.03.06 Аникиной Татьяне Андреевне.

факс: +7 (843) 238-76-01

эл. почта: tania57vgl@rambler.ru