

АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНАЯ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ БИНАРНЫХ КОНЪЮГАТОВ γ -КАРБОЛИНОВ

Г. Ф. Махаева*, Е. Ф. Шевцова**, Н. П. Болтнева, Н. В. Ковалёва,
Е. В. Рудакова, Л. Г. Дубова, П. Н. Шевцов, член-корреспондент РАН С. О. Бачурин

Поступило 16.07.2018 г.

Новые синтезированные бинарные конъюгаты тетрагидро- γ -карболинов, содержащие дитриазольные спейсеры разной длины, обладали выраженной антихолинэстеразной и антиоксидантной активностью, потенциальной способностью блокировать индуцируемую ацетилхолинэстеразой агрегацию бета-амилоида, в отличие от исходного прототипа Димебона. Всё это делает их перспективными кандидатами для дальнейшего исследования в качестве препаратов для лечения болезни Альцгеймера. Особого внимания заслуживает конъюгат с межтриазольным гексаметиленовым спейсером, который можно рассматривать как препарат — лидер в данном ряду соединений.

Ключевые слова: конъюгаты тетрагидро- γ -карболинов, ацетилхолинэстераза, бутирилхолинэстераза, антиоксиданты, болезнь Альцгеймера.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524841104-108>

Одним из перспективных подходов к созданию новых лекарственных препаратов, обладающих большим терапевтическим эффектом по сравнению с предшественниками, является направленная модификация структуры уже широко используемого соединения с известными фармакологическими свойствами. Часто такими соединениями становятся известные лекарственные препараты, уже выпущенные на фармацевтический рынок, или препараты, показавшие эффективность в доклинических испытаниях. Одним из таких препаратов является Димебон — производное γ -карболина, нейропротекторный и когнитивно-стимулирующий эффект которого достаточно хорошо изучен и эффективность которого была показана в многочисленных доклинических исследованиях, а также при проведении второй стадии клинических испытаний [1–3]. Димебон является многофункциональным препаратом, обладающим способностью защищать нейроны от гибели благодаря, в частности, влиянию на митохондрии. Он также снижает развитие протеинопатий, стимулирует аутофагию, сочетая эти свойства с воздействием на ряд нейротрансмиссивных мишеней, включая ингибирование ацетилхолинэстеразы (АХЭ, КФ 3.1.1.7, $IC_{50} = 42$ мкМ) и бутирилхолинэстеразы (БХЭ, КФ 3.1.1.8, $IC_{50} = 7,9$ мкМ) [4].

Холинергический дефицит является характерной особенностью болезни Альцгеймера (БА). Он связан с избирательной гибелью холинергических нейронов базального ядра Мейнерта на начальных стадиях заболевания и во многом определяет нарушения когнитивных функций. Кроме того, холинергические препараты в настоящее время являются основной фармакотерапевтической группой, используемой для симптоматического лечения БА. Ингибиторы АХЭ, подавляя её “классическую” функцию — гидролиз нейромедиатора ацетилхолина, увеличивают активацию холинергических нейронов и стимулируют когнитивные функции. Следует отметить, что ингибирование другой холинэстеразы — БХЭ — также способствует улучшению когнитивных функций при холинергическом дефиците, наблюдаемом при БА. При этом ингибирование БХЭ особенно продуктивно при прогрессии заболевания. Полагают, что соединения, ингибирующие обе холинэстеразы — АХЭ и БХЭ, повышают эффективность лечения [5].

Открытие дополнительных функциональных особенностей АХЭ, в частности, связанной с периферическим анионным сайтом (ПАС) способности индуцировать агрегацию β -амилоида, привело к значительному повышению интереса к этой мишени при создании новых лекарственных препаратов. Особое место в этом направлении занимает стратегия создания бивалентных лигандов, способных одновременно связываться как с каталитическим центром, так и с ПАС фермента [6]. Объединение двух молекул фармакофора посредством

*Институт физиологически активных веществ
Российской Академии наук,
Черноголовка Московской обл.*

* E-mail: gmakh@ipac.ac.ru; galina.makhaeva@gmail.com

** E-mail: shevtsova@ipac.ac.ru; e.f.shevtsova@gmail.com

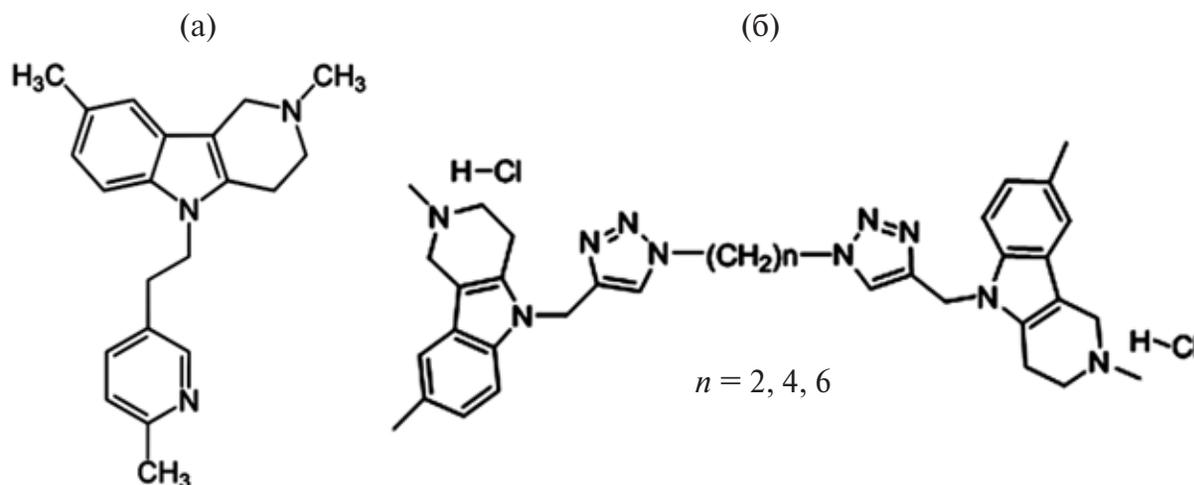


Рис. 1. Димебон (а) и бинарные конъюгаты тетрагидро- γ -карболинового фрагмента Димебона (ТГК), объединённые дитриазолсодержащими спейсерами разной длины (б).

спейсера используется для улучшения аффинности связывания лигандов с терапевтически значимыми белками и расширения спектра их фармакологической активности [7]. В этой связи нам представлялось интересным создание бинарных препаратов, используя в качестве фармакофора тетрагидро- γ -карболиновый (ТГК) фрагмент препарата Димебон.

Цель настоящей работы — исследование биологической активности новых оригинальных бинарных соединений на основе ТГК-фрагмента Димебона, объединённых дитриазолсодержащими спейсерами разной длины (рис. 1). В первую очередь исследование их антихолинэстеразной активности, способности вытеснять пропилий из ПАС АХЭ и антиоксидантной активности. Синтез соединений описан ранее [8].

Для кинетических исследований использовали коммерческие препараты (“Sigma-Aldrich”, США) АХЭ эритроцитов человека, БХЭ из сыворотки крови лошади и структурно близкого холинэстеразам фермента — карбоксилэстеразы печени свиньи (КЭ, КФ 3.1.1.1). Активность АХЭ и БХЭ определяли методом Элмана ($\lambda = 412$ нм), в качестве субстрата использовали ацетилтиохолин (1 мМ) и бутирилтиохолин (1 мМ) соответственно, как детально описано в работе [9]. Условия определения: 100 мМ фосфатный буфер, pH 7,5; 25°C. Активность КЭ определяли спектрофотометрически ($\lambda = 405$ нм) по выделению 4-нитрофенола, субстрат — 1 мМ 4-нитрофенилацетат, как описано в [9]. Условия определения: 100 мМ фосфатный буфер, pH 8,0, 25°C. Измерения проводили с помощью микропланшетного ридера FIUOSTAR Optima (“LabTech”, Германия). Соединения растворяли в ДМСО, инкубационная смесь содержала 2%

растворителя. Первичную оценку ингибиторной активности соединений проводили путём определения степени ингибирования ферментов при концентрации соединения, равной 20 мкМ. Для определения IC_{50} АХЭ, БХЭ и КЭ образец соответствующего фермента инкубировали с исследуемым соединением в диапазоне концентраций $1 \cdot 10^{-11}$ – $1 \cdot 10^{-4}$ М в течение 5 мин, затем определяли остаточную активность фермента. Каждый эксперимент проводили в трёхкратной повторности. Такрин и бис-4-нитрофенилфосфат (BNPP) — классические ингибиторы соответственно холинэстераз и карбоксилэстеразы — использовали в качестве положительного контроля. Вычисление IC_{50} проводили с использованием программы Origin 6.1 для Windows (“OriginLab”, США).

Исследование эстеразного профиля бинарных конъюгатов ТГК 1–3 (рис. 1) показало (табл. 1), что все соединения более эффективно ингибируют АХЭ и БХЭ по сравнению с их прототипом Димебоном. Степень ингибирования холинэстераз зависела от длины межтриазольного алкиленового спейсера. Параллельно мы исследовали действие синтезированных соединений на КЭ-фермент, который отвечает за гидролиз многочисленных лекарств, содержащих сложноэфирные группы [10]. Известно, что ингибирование КЭ антихолинэстеразными соединениями может приводить к нежелательным лекарственным взаимодействиям [11]. Мы установили, что все исследуемые соединения не ингибировали КЭ.

Как видно из табл. 1, бинарные конъюгаты ТГК с межтриазольными этиленовым ($n = 2$, соединение 1) и тетраметиленовым ($n = 4$, соединение 2) спейсерами с одинаковой эффективностью ингибировало БХЭ ($IC_{50} = 38,3 \pm 2,6$ и $IC_{50} = 41,9 \pm 2,9$ мкМ соответственно). Тогда как введение

Таблица 1. Эстеразный профиль бинарных конъюгатов ТГК и их способность вытеснять пропидий из периферического анионного сайта *EeAXЭ*

Соединение	Межтриазольный спейсер	IC ₅₀ (мкМ) или ингибирование активности фермента соединением в концентрации 20 мкМ, %			Вытеснение пропидия 20 мкМ соединения, %
		АХЭ	БХЭ	КЭ	
1	–(CH ₂) ₂ –	9,2 ± 1,6%	38,3 ± 2,6	3,2 ± 0,8%	н.о.
2	–(CH ₂) ₄ –	22,4 ± 2,2	41,9 ± 2,9	3,7 ± 1,0%	13,1 ± 1,1
3	–(CH ₂) ₆ –	0,77 ± 0,06	4,75 ± 0,38	7,4 ± 0,4%	23,7 ± 1,8
	Димебон	36,3 ± 3,59	5,76 ± 0,51	н.а.	4,0 ± 0,5
	Донепезил	н.о.	н.о.	н.о.	10,5 ± 0,8
	Такрин	0,60 ± 0,05	0,029 ± 0,0002	н.а.	н.о.
	BNPP	н.а.	н.а.	1,80 ± 0,11	н.о.

н.а. – неактивен, н.о. – не определялось. Здесь и в табл. 2 $M \pm m$, $n = 3$.

гексаметиленового спейсера ($n = 6$, соединение **3**) приводило к возрастанию на порядок ингибиторной активности в отношении БХЭ (IC₅₀ = 4,75 ± ± 0,38 мкМ). При ингибировании АХЭ мы наблюдали иное соотношение структура–активность: резкое возрастание ингибиторной активности с увеличением длины межтриазольного алкиленового спейсера от очень слабой активности (9,2 ± ± 1,6% при 20 мкМ) для соединения **1** с этиленовым спейсером ($n = 2$) до высокой субмикромольной (IC₅₀ = 0,77 ± 0,06 мкМ) активности для соединения **3** с гексаметиленовым спейсером ($n = 6$).

Способность соединений конкурентно вытеснять пропидий иодид – селективный лиганд периферического анионного сайта АХЭ – оценивали флуоресцентным методом, который применяется в качестве первичного скрининга опосредованной оценки соединений на ингибирование проагрегационной активности АХЭ [12]. В качестве источника фермента использовали АХЭ из *Electrophorus electricus* (*EeAXЭ*, фракция VI-S). Для определения степени вытеснения пропидия в 1 мМ трис-НСI-буфере (рН 8,0) проводили инкубацию исследуемого соединения в концентрации 20 мкМ с раствором *EeAXЭ* (7 мкМ) в течение 15 мин при 25°C. Затем добавляли раствор иодида пропидия (конечная концентрация 8 мкМ) и инкубировали ещё 15 мин. Спектр флуоресценции регистрировали при длине волны 530 нм (возбуждение) и 600 нм (эмиссия). В качестве контрольного соединения использовали Донепезил. Измерения проводили в трёхкратной повторности на микропланшетном ридере FLUOStar OPTIMA (“LabTech”). Степень вытеснения пропидия из ПАС АХЭ рассчитывали в процентах от контроля (интенсивность флуоресценции связанного с *EeAXЭ* иодида пропидия в отсутствие исследуемого соединения).

Как видно из табл. 1, соединения **2** и **3**, ингибирующие АХЭ, способны вытеснять пропидий из ПАС *EeAXЭ*. При этом увеличение длины межтриазольного спейсера с $n = 4$ (соединение **2**) до $n = 6$ (соединение **3**) привело почти к двукратному повышению степени вытеснения пропидия (13,1 ± ± 1,1 и 23,7 ± ± 1,8% соответственно), что значительно превысило степень вытеснения пропидия Димебоном.

Таким образом, объединение двух ТГК-фрагментов посредством дитриазолсодержащего спейсера изменило эстеразный профиль конъюгатов по сравнению с их прототипом Димебоном. Конъюгат **3** с межтриазольным гексаметиленовым спейсером, в отличие от Димебона, не только ингибировал БХЭ в микромолярной области, но и приобретал способность более эффективно и селективно ингибировать АХЭ с IC₅₀ в субмикромольной области, а также эффективно вытеснять пропидий из ПАС *EeAXЭ*, что указывает на его способность блокировать АХЭ-индуцируемую агрегацию β-амилоида.

Известно, что головной мозг по сравнению с другими тканями более чувствителен к повреждению свободными радикалами. Эффективность работы антиоксидантной системы в головном мозге постепенно снижается в процессе старения, причём в головном мозге больных БА это снижение происходит ещё более резко. Всё это обуславливает целесообразность использования антиоксидантов в терапии БА [13].

Антиоксидантные свойства синтезированных конъюгатов оценивали по их способности подавлять перекисное окисление липидов (ПОЛ) в грубой мембранной фракции (1500 g) гомогената головного мозга крыс. Среда инкубации для определения ПОЛ содержала суспензию мембран в конечной концентрации 2,5 мг белка/мл и исследуемые соединения в разных концентрациях (опытные пробы)

или растворитель (ДМСО) в контрольных пробах. Концентрацию белка в суспензии митохондриальных мембран определяли с помощью биуретового метода. Реакцию ПОЛ инициировали внесением в среду инкубации в качестве окислителя раствора ионов Fe^{3+} , используя $Fe(NH_4)(SO_4)_2$ в конечной концентрации 0,5 мМ. Степень ПОЛ оценивали по образованию триметинового комплекса вторичного продукта ПОЛ — малонового диальдегида (МДА) — с 2-тиобарбитуровой кислотой [14]. Результаты выражали в процентах отношения величины поглощения, измеренного в опытных пробах, к величине поглощения, измеренного в контрольных пробах.

Мы обнаружили, что все изученные бинарные конъюгаты ТГК, в отличие от Димебона, эффективно подавляли Fe^{3+} -индуцированное ПОЛ (табл. 2). Степень подавления ПОЛ не зависела от длины межтриазольного алкиленового спейсера.

Потенциальным механизмом антиоксидантного эффекта соединений может быть их способность связывать свободные радикалы. Эту способность мы исследовали с использованием модельного радикала АБТС^{•+} (2,2'-азинобис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат)) в соответствии с методом [15], основанном на определении степени обесцвечивания раствора стабильного катион-радикала АБТС^{•+} в присутствии исследуемого соединения при длине волны 734 нм. Соединения растворяли в ДМСО, его содержание в реакционной смеси составляло 4%. Вещества тестировали в диапазоне концентраций $1 \cdot 10^{-6}$ — $1 \cdot 10^{-4}$ М. Реакцию проводили при 30 °С в темноте, время инкубации соединений с АБТС^{•+} 1 ч. Детальное описание метода приведено в работе [9]. Тролокс использовали в качестве стандартного антиоксиданта. Все измерения проводили в трёхкратной повторности для трёх независимых экспериментов на микропланшетном ридере xMark™ (“Bio-Rad”, США).

Антирадикальную активность соединений представляли как величину ТЕАС (trolox equivalent antioxidant capacity — антиоксидантная способность, выраженная в тролокс-эквивалентах) посредством сравнения изменения интенсивности окрашивания

раствора АБТС^{•+} в присутствии Тролокса (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхромо-2-карбоновая кислота) и в присутствии тестируемого соединения при их одинаковой концентрации (20 мкМ). Значения ТЕАС рассчитывали по формуле

$$TEAC = (A_0 - A_{test}) / (A_0 - A_{trolox}),$$

где A_0 — оптическая плотность контрольного раствора АБТС^{•+} в отсутствие соединений; A_{test} и A_{trolox} — оптическая плотность раствора АБТС^{•+} после добавления исследуемого соединения и Тролокса соответственно.

Полученные результаты (табл. 2) показывают, что бинарные конъюгаты ТГК, объединённые дитриазолсодержащими спейсерами, в отличие от Димебона, эффективны как скэвенджеры свободных радикалов. Способность соединений связывать АБТС^{•+} зависела от структуры спейсера. Так, конъюгаты с более короткими межтриазольными спейсерами (соединение **1**, $n = 2$, и соединение **2**, $n = 4$) связывали свободные радикалы с высокой эффективностью на уровне стандартного антиоксиданта Тролокса. Введение гексаметиленового спейсера (соединение **3**, $n = 6$) несколько снизило антирадикальную активность. Следовательно, в отличие от Димебона, бинарные конъюгаты ТГК, обладают значительным антиоксидантным потенциалом, подавляя Fe^{3+} -индуцированное ПОЛ и эффективно связывая свободные радикалы.

Таким образом, в результате проведённого исследования мы установили, что бинарные конъюгаты ТГК, объединённые дитриазолсодержащими спейсерами разной длины, в отличие от препарата сравнения Димебона, обладали выраженными антихолинэстеразными и антиоксидантными свойствами, а также потенциальной способностью блокировать АХЭ-индуцируемую агрегацию β -амилоида. Это существенно расширяет спектр нейропротекторной активности данных конъюгатов и делает их весьма перспективными кандидатами для дальнейшего исследования в качестве препаратов для лечения болезни Альцгеймера. Особого внимания заслуживает конъюгат с межтриазольным

Таблица 2. Способность бинарных конъюгатов ТГК ингибировать перекисное окисление липидов и их радикалсвязывающая активность в тесте АБТС

Соединение	Межтриазольный спейсер	Ингибирование Fe^{3+} -индуцированного ПОЛ IC ₅₀ , мкМ	Антирадикальная активность, единицы ТЕАС
1	—(CH ₂) ₂ —	3,0 ± 0,5	1,1
2	—(CH ₂) ₄ —	3,1 ± 0,6	1,0
3	—(CH ₂) ₆ —	2,8 ± 0,6	0,39
Димебон		>100	0,004
Тролокс		31 ± 6	1,0

гексаметиленовым спейсером, который можно рассматривать как препарат — лидер в данном ряду соединений.

В работе использовали оборудование ЦКП ИФАВ РАН.

Источник финансирования. Исследование эстеразного профиля полученных соединений выполнено за счёт средств гранта Российского научного фонда 14–23–00160П, изучение их радикалсвязывающих и антиоксидантных свойств выполнено в рамках Государственного задания 2018 г. (тема № 0090–2017–0019).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ustyugov A., Shevtsova E., Bachurin S.* // *Mol. Neurobiol.* 2015. V. 52. № 2. P. 970–978.
2. *Doody R. S., Gavrilova S. I., Sano M., Thomas R. G., Aisen P. S., Bachurin S. O., Seely L., Hung D.* // *Lancet.* 2008. V. 372. № 9634. P. 207–215.
3. *Bharadwaj P. R., Bates K. A., Porter T., Teimouri E., Perry G., Steele J. W., Gandy S., Groth D., Martins R. N., Verdile G.* // *Trans. Psychiatry.* 2013. V. 3. P. e332.
4. *Bachurin S., Bukatina E., Lermontova N., Tkachenko S., Afanasiev A., Grigoriev V., Grigorieva I., Ivanov Y. U., Sablin S., Zefirov N.* // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006. V. 939. № 1. P. 425–435.
5. *Lane R. M., Potkin S. G., Enz A.* // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2006. V. 9. № 1. P. 101–124.
6. *Inestrosa N. C., Dinamarca M. C., Alvarez A.* // *FEBS J.* 2008. V. 275. № 4. P. 625–632.
7. *Rosini M., Simoni E., Bartolini M., Soriano E., Marco-Contelles J., Andrisano V., Monti B., Windisch M., Hutter-Paier B., Mccllymont D. W., Mellor I. R., Bolognesi M. L.* // *ChemMedChem.* 2013. V. 8. № 8. P. 1276–1281.
8. *Соколов В. Б., Аксиненко А. Ю., Горева Т. В., Енушина Т. А., Самсонова А. Н.* // *ЖОХ.* 2018. Т. 88. № 6. С. 1266–1269.
9. *Makhaeva G. F., Sokolov V. B., Shevtsova E. F., Kovaleva N. V., Lushchekina S. V., Boltneva N. P., Rudakova E. V., Aksinenko A. Y., Shevtsov P. N., Neganova M. E., Dubova L. G., Bachurin S. O.* // *Pure and Appl. Chem.* 2017. V. 89. № 8. P. 1167–1184.
10. *Hatfield M. J., Potter P. M.* // *Expert Opin. Ther. Pat.* 2011. V. 21. № 8. P. 1159–1171.
11. *Makhaeva G. F., Lushchekina S. V., Boltneva N. P., Serebryakova O. G., Rudakova E. V., Ustyugov A. A., Bachurin S. O., Shchepochkin A. V., Chupakhin O. N., Charushin V. N., Richardson R. J.* // *Bioorg. Med. Chem.* 2017. V. 25. № 21. P. 5981–5994.
12. *Taylor P., Lappi S.* // *Biochemistry.* 1975. V. 14. № 9. P. 1989–1997.
13. *Moreira P. I., Siedlak S. L., Aliev G., Zhu X., Cash A. D., Smith M. A., Perry G.* // *J. Neural. Trans.* 2005. V. 112. № 7. P. 921–932.
14. *Wilbur K. M. B. F., Shapiro O. W.* // *Arch. Biochem.* 1949. V. 24. № 2. P. 305–313.
15. *Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C.* // *Free Radic. Biol. Med.* 1999. V. 26. № 9/10. P. 1231–1237.

ANTICHOLINESTERASE AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF NEW BINARY CONJUGATES OF γ -CARBOLINES

G. F. Makhaeva, E. F. Shevtsova, N. P. Boltneva, N. V. Kovaleva, E. V. Rudakova, L. G. Dubova, P. N. Shevtsov, Corresponding Member of the RAS S. O. Bachurin

Received July 16, 2018

This study presents the synthesis of binary tetrahydro- γ -carbolines with ditriazol spacers of varying length, which exhibit anticholinesterase and antioxidant activity, as compared to the original Dimebon prototype. Anticholinesterase activity suggests the potential ability of the new compounds to block β -amyloid aggregation induced by anticholinesterase, making them promising candidates for further research preparations for the treatment of Alzheimer's disease. Particular attention should be paid to the conjugate with an intertriazol hexamethylene spacer, which can be regarded as the leading compound in this series.

Keywords: conjugates of tetrahydro- γ -carbolines, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase.