

**К 40-летию Института физиологически активных веществ РАН****ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ****БИОИЗОСТЕРНЫЕ АНАЛОГИ КОРИЧНОЙ КИСЛОТЫ  
В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ НЕЙРОПРОТЕКТОРОВ**

**М.Е. Неганова<sup>1\*</sup>, В. Семенов<sup>2</sup>, М. Семенова<sup>3</sup>, О.М. Редкозубова<sup>4</sup>, Ю.Р. Александрова<sup>5</sup>,  
Е.А. Лысова<sup>1</sup>, С.Г. Клочков<sup>1</sup>, Е.Ф. Шевцова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт физиологически активных веществ РАН,  
142432, г. Черноголовка, Московская обл. Северный проезд, д. 1; \*эл. почта: neganova83@mail.ru

<sup>2</sup>Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, 119991, Москва, Ленинский проспект, 47

<sup>3</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, д. 26

<sup>4</sup>ООО "Нейроботикс", 124498, Москва, Зеленоград, Южная промзона, проезд 4922, д.4, стр.2

<sup>5</sup>Ивановский государственный университет, биолого-химический факультет, кафедра общей биологии и физиологии,  
Иваново, пр. Ленина, 136, кор. 4

Соединения, направленно действующие на митохондриальные функции, рассматриваются как перспективные лекарственные препараты для лечения нейродегенеративных заболеваний и возрастных деменций. В качестве основы для создания таких потенциальных лекарственных средств были выбраны биоизостерные аналоги коричной кислоты и производные полиметоксибензолов. Производные коричной кислоты имеют широкий спектр биологических активностей, который может иметь значение для лекарственных препаратов, направленных на лечение нейродегенеративных заболеваний, в частности болезни Альцгеймера. В данной работе исследована нейропротекторная активность биоизостерных аналогов коричной кислоты и производных полиметоксибензолов. Среди исследованных соединений выявлены вещества-лидеры **3**, **4** и **7**. Эти соединения не проявляют собственной токсичности и оказывают нейропротекторный эффект на клеточной модели нейродегенерации, связанной с кальциевым стрессом. Механизм их цитопротекторной активности, возможно, обусловлен влиянием на функции митохондрий, поскольку эти соединения эффективно подавляют кальций-индуцированный процесс скачка митохондриальной проницаемости. Кроме того, одно из исследованных веществ (**7**) обладает антиоксидантными свойствами, проявляя способность к ингибированию перекисного окисления липидов (ПОЛ) гомогената мозга крыс, что может быть дополнительным механизмом нейропротекторного эффекта. Полученные данные позволяют рекомендовать исследованные вещества в качестве основы для создания эффективных нейропротекторных препаратов, способных повлиять на ранние стадии развития нейродегенеративных заболеваний.

**Ключевые слова:** коричная кислота; нейропротекторы; нейродегенеративные заболевания; митохондрии; антиоксиданты

**DOI:** 10.18097/BMCRM00052

**ВВЕДЕНИЕ**

Высокий интерес исследователей к нейродегенеративным заболеваниям объясняется неутешительной статистикой заболеваемости, значительными социальными проблемами, с которыми сталкивается пациент, и отсутствием эффективных методов лечения данных состояний.

Болезнь Альцгеймера (БА) является хроническим прогрессирующим заболеванием, характеризующимся значительными нарушениями когнитивных функций и патоморфологическими особенностями в мозге: внеклеточными амилоидными бляшками и внутриклеточными нейрофибрилярными пучками, основными компонентами которых являются скопления агрегатов амилоидного бета-пептида (Аβ) и агрегатов тау-белка, соответственно. Важно, что одним из значимых факторов риска для развития наиболее многочисленной спорадической формы заболевания является старение. Этот факт и наличие большого количества данных о нарушениях митохондриальных функций и окислительных повреждениях, которые обнаруживаются в мозге больных и животных моделей БА раньше проявлений основной симптоматики и специфических патоморфологических признаков, позволяют

предположить триггерную роль дисфункции митохондрий и окислительного стресса в развитии нейродегенерации при БА [1, 2]. При фармакологическом воздействии на вышеуказанные элементы ключевых этапов нейродегенерации можно приостановить прогрессирование заболевания.

Таким образом, разработка веществ, направленно действующих на митохондриальные функции, может обеспечить терапевтические преимущества в борьбе с нейродегенеративными заболеваниями и возрастной деменцией.

В качестве основы для создания таких потенциальных лекарственных средств мы выбрали биоизостерные аналоги коричной кислоты и производные полиметоксибензолов (вещества **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **7** – аналоги коричной кислоты; **6**, **8**, **9**, **10** – полиметоксибензолы).

Производные коричной кислоты имеют широкий спектр биологической активности, включая контроль над воспалительными заболеваниями [3], гипополидеммическую активность [4] и улучшение депрессивного поведения у мышей, индуцированного стрессом [5]. Этот спектр активностей может иметь значение для лекарственных препаратов, направленных на лечение БА.



Разнообразные производные полиметоксибензолов входят в состав эфирных масел растений, которые считаются перспективными пищевыми антиоксидантами [6].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Материалы

Химические соединения **1–10** были синтезированы в ИОХ им Н.Д. Зелинского РАН. Их структура и чистота были подтверждены данными элементного анализа, спектрами ЯМР  $^1\text{H}$  и масс-спектрами.

### Животные

В экспериментах использовались самцы нелинейных беспородных крыс весом 200–220 г. Животных содержали в условиях стандартного вивария с 12-часовым световым режимом и свободным доступом к воде и пище. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с решениями комиссии по Биоэтике ИФАВ РАН. В работе использовалось оборудование Центра коллективного пользования ИФАВ РАН.

### Влияние соединений на процесс перекисного окисления липидов гомогената мозга крыс

Для оценки действия исследуемых веществ на процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ) гомогената мозга крыс, спонтанного и инициируемого ионами  $\text{Fe(III)}$ , был применен модифицированный вариант ТБК-теста в микропланшетном формате [7]. Измерения оптической плотности проводили на многофункциональном планшетном анализаторе Victor<sup>3</sup> (“PerkinElmer”, США) при длине волны 540 нм. Данные нормировались по отношению к контролю (100%).

### Исследование влияния соединений на митохондриальные характеристики

Митохондрии печени крыс выделяли стандартным методом дифференциального центрифугирования [8].

Трансмембранный потенциал митохондрий печени крыс измеряли по флуоресценции потенциал-зависимого индикатора сафранина О на планшетном анализаторе Victor<sup>3</sup>. Регистрировали флуоресценцию при  $\lambda_{\text{ex}}=485$  нм,  $\lambda_{\text{em}}=590$  нм [9].

Процесс “набухания” митохондрий регистрировали спектрофотометрически в 96-луночных планшетах с прозрачным дном при 540 нм на планшетном анализаторе Victor<sup>3</sup>. В качестве индуктора “набухания” (скачка митохондриальной проницаемости) митохондрий использовали  $\text{CaCl}_2$  [10]. Скорость “набухания” определяли в программе Excel как  $dA540/dt$ . Данные нормировались по отношению к контролю (100%).

### Оценка цитопротекторного потенциала соединений

Адгезивная перевиваемая клеточная линия нейробластомы человека (SH-SY5Y) была получена из Европейской коллекции клеточных культур (Europan

Collection of Cell Cultures – ECACC, №94030304). Клетки культивировали в среде DMEM/F12 (“Gibco”, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (“Gibco”, США) и 1% смеси пенициллина/стрептомицина (НПП “ПанЭко”, Россия) при 37°C в атмосфере  $\text{CO}_2$  (5%). Культуру SH-SY5Y вели, не допуская монослоя, перевивая каждые 3–4 дня. Проводили не более 20 пассажей.

### Иономицин-индуцированная нейротоксичность

Клетки нейробластомы человека (SH-SY5Y) рассеивали в 96-луночный планшет (10000/луночку). Через 24 ч к клеткам добавляли различные концентрации тестируемых соединений. Для индукции токсического действия после обработки веществами в среду вводили иономицин в концентрации 2 мкМ и культивировали клетки ещё 24 ч.

Выживаемость клеток нейробластомы оценивали стандартным МТТ-тестом, который основан на способности дегидрогеназ живых клеток, в частности сукцинатдегидрогеназы, восстанавливать неокрашенные формы 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиума (МТТ-реакта) до голубого кристаллического формазана, растворимого в диметилсульфоксиде. МТТ-тест проводили по методике, описанной в работе [11], с небольшими модификациями. Количество восстановленного продукта измеряли фотометрически на планшетном анализаторе Victor<sup>3</sup> по разнице светопоглощения пробы при длинах волн 540–620 нм. Данные нормировали по отношению к контролю (100%) и выражали в процентах.

### Статистический анализ результатов

Каждый измеряемый параметр исследовали не менее чем в трёх независимых экспериментах.

Достоверность различий определяли с помощью GraphPad Prism версии 5.00 для Windows. Для сравнения двух групп (контрольной и в присутствии каждого соединения) применяли непарный  $t$ -критерий. Уровень достоверности был установлен на 95% ( $p < 0.05$ ), данные в графиках представлены как среднее значение  $\pm$  ошибка среднего.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Исследуемые соединения

В качестве тестируемых веществ в данной работе использовали биоизостерные аналоги коричной кислоты. Шифр и структурные формулы соединений представлены в таблице 1.

### Антиоксидантная активность

Изучение антиоксидантных свойств в ряду биоизостерных аналогов коричной кислоты и полиметоксибензолов проведено на модели ПОЛ гомогената мозга крыс (по стандартному ТБК-тесту). Окислительный стресс, неотъемлемым компонентом которого является процесс ПОЛ, играет важную роль в развитии многих заболеваний человека, в том числе и нейродегенеративных. В биологических

**Таблица 1.** Структурные формулы исследуемых соединений

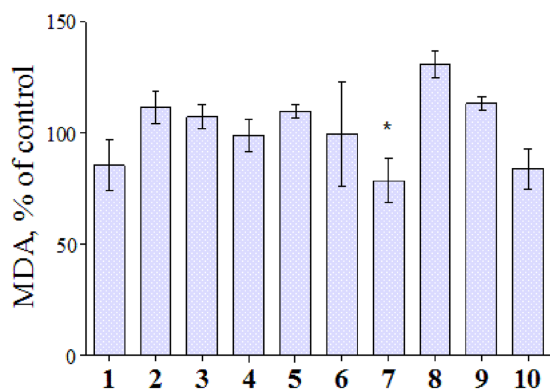
Compound	Structure	Compound	Structure
1		6	
2		7	
3		8	
4		9	
5		10	

системах реакции свободнорадикального окисления инициируются, главным образом, под действием активных форм кислорода и в присутствии ионов металлов переменной валентности. Важно отметить, что нарушения гомеостаза ряда ионов, в том числе ионов меди и железа, является характерной чертой нейродегенеративных заболеваний, в частности БА. Анализ аутопсийных проб из мозга больных БА выявил аномально высокие концентрации ионов  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$  в сенильных бляшках и нейрофибриллярных пучках – до 1 мМ [12, 13]. В связи с этим нами были выбраны в качестве инициаторов ПОЛ ионы трёхвалентного железа ( $\text{Fe}^{3+}$ ).

Данные исследования антиоксидантных свойств биоизостерных аналогов коричной кислоты и полиметоксибензолов представлены на рисунке 1. Исследуемые производные проявляют незначительную антиоксидантную активность в данном тесте. Наиболее активным соединением оказалось вещество 7, которое достоверно ингибировало ПОЛ гомогената мозга крыс более чем на 20% относительно контроля (рис. 1).

#### *Влияние на митохондриальные характеристики*

Для предварительной оценки нейропротекторного потенциала и/или токсичности биоизостерных аналогов коричной кислоты и полиметоксибензолов



**Рисунок 1.** Антиоксидантная активность биоизостерных аналогов коричной кислоты и полиметоксибензолов (влияние на ПОЛ гомогената мозга крыс, инициируемое ионами  $Fe^{3+}$ ). Концентрация тестируемых соединений – 30 мкМ. Контрольные образцы содержали ДМСО ( $\leq 1\%$ ) вместо тестируемых соединений. \* –  $p < 0.05$  по сравнению с контролем (Т-тест).

было исследовано их влияние на мембранный потенциал митохондрий ( $\Delta\Psi_m$ ) с потенциал-зависимым флуоресцентным зондом сафранин О при использовании ФАД-зависимого субстрата сукцината в присутствии ингибитора комплекса I дыхательной цепи ротенона. Также исследовано влияние соединений на изменение светопоглощения суспензии митохондрий в результате кальций-вызванного “набухания” митохондрий. Последний показатель характеризует влияние на процесс скачка митохондриальной проницаемости (mitochondrial permeability transition, МРТ), являющегося ключевым этапом каскадов клеточной гибели. Такой набор тестов позволяет произвести оценку митохондриальной токсичности, поиск слабых разобщителей дыхательной цепи и ингибиторов МРТ.

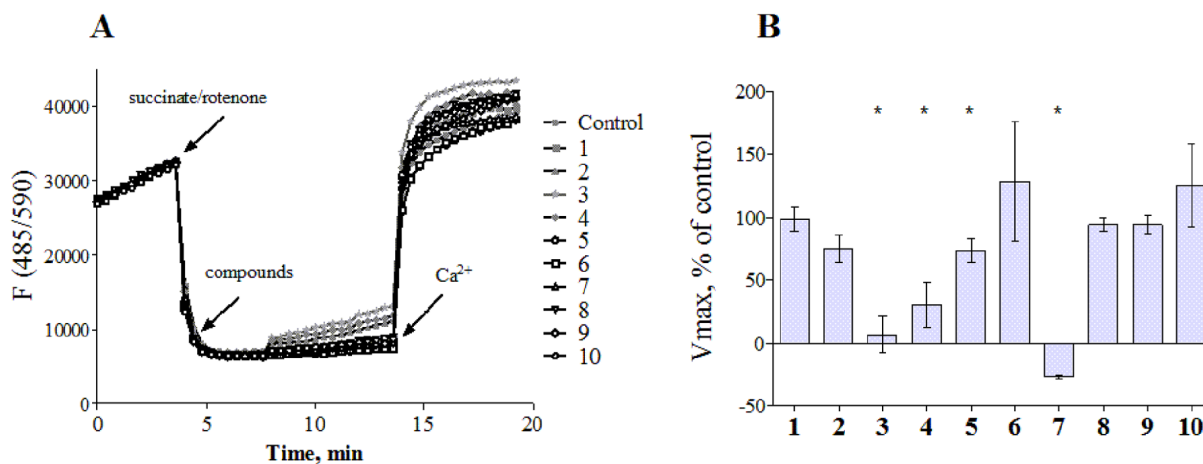
На рисунке 2А показано влияние биоизостерных аналогов коричной кислоты и полиметоксибензолов на мембранный потенциал митохондрий печени крыс. Видно, что большинство веществ не влияют

на трансмембранный потенциал, в то время как соединения 2, 3 и 4 деполаризуют мембрану при энергизации сукцинатом в присутствии ротенона, причём деполаризация развивается во времени, но не превышает 10% после 5 мин инкубации. Эти данные позволяют говорить об отсутствии значительной митохондриальной токсичности соединений.

На рисунке 2В показаны данные нормированных значений скорости  $Ca^{2+}$ -индуцированного набухания митохондрий под действием всех тестируемых производных. Статистически значимые результаты отмечены звёздочками (\* –  $p < 0.05$ ). Энергизацию митохондрий в данном случае проводили сукцинатом калия в присутствии ингибитора комплекса I дыхательной цепи – ротенона. Конечная концентрация исследуемых соединений составляла 30 мкМ. Как видно из представленной диаграммы, соединения 3-5 и 7 достоверно подавляют процесс “набухания” митохондрий, причём в присутствии веществ 3, 4 и 7 в концентрации 30 мкМ наблюдается высокая (более 50%) степень ингибирования открытия поры скачка митохондриальной проницаемости. Если для соединений 3 и 4, вызывающих также слабую деполаризацию митохондрий, этот эффект может быть связан со снижением потенциал-зависимого входа кальция в митохондрии, то в случае соединения 7 возможно непосредственное ингибирование пор МРТ.

#### Цитопротекторные свойства

На следующем этапе нашей работы мы изучили влияние исследуемых соединений на выживаемость нейрональной культуры клеток (нейробластомы SH-SY5Y) с целью выявления собственной цитотоксичности и потенциального цитопротекторного действия при иономицин-индуцированной гибели клеток. Одной из причин гибели нейронов при разных сценариях нейротоксичности (гипоксия, эксайтотоксичность,  $\beta$ -амилоидная токсичность и т.п.) является аномальное повышение внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$ . Кальциевый ионофор иономицин



**Рисунок 2.** Влияние биоизостерных аналогов коричной кислоты и полиметоксибензолов на митохондриальные характеристики. А – влияние на мембранный потенциал митохондрий печени крыс. В – изменение скорости  $Ca^{2+}$ -индуцированного “набухания” митохондрий печени крыс. Концентрация тестируемых соединений – 30 мкМ. Концентрация ионов  $Ca^{2+}$  – 12.5 мкМ. Контрольные образцы содержали ДМСО ( $\leq 1\%$ ) вместо тестируемых соединений. \* –  $p < 0.05$  по сравнению с контролем (Т-тест).

применяется для обеспечения нерегулируемого входа ионов кальция в клетку, моделируя кальциевый стресс как причину гибели клетки, и широко используется для изучения влияния соединений на выживаемость клеток.

Жизнеспособность клеток измеряли по стандартной методике МТТ-теста.

Все исследуемые соединения не оказывали заметного собственного токсического действия на культуру клеток нейробластомы (рис. 3А). При индукции нейротоксичности иономицином, связанной с кальциевым стрессом, для соединения **7** наблюдалась тенденция нейропротекторного эффекта ( $p=0.065$ ), а соединения **3** и **4** достоверно увеличивали количество выживших клеток (рис. 3В). Таким образом, соединения **3**, **4** и **7** могут представлять интерес как скаффолды для создания новых потенциальных нейропротекторов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведённых исследований среди биоизостерных аналогов коричной кислоты и полиметоксибензолов была выделена группа веществ-лидеров: **3**, **4** и **7**. Данные соединения не проявляют собственной токсичности и оказывают нейропротекторный эффект на клеточной модели нейродегенерации, связанной с кальциевым стрессом. Механизм их цитопротекторной активности, возможно, обусловлен влиянием на функции митохондрий, поскольку эти соединения эффективно подавляют кальций-индуцированный процесс МРТ. Кроме того, одно из исследованных веществ (**7**) обладает антиоксидантными свойствами, проявляя способность к ингибированию ПОЛ гомогената мозга крыс, что может быть дополнительным механизмом нейропротекторного эффекта.

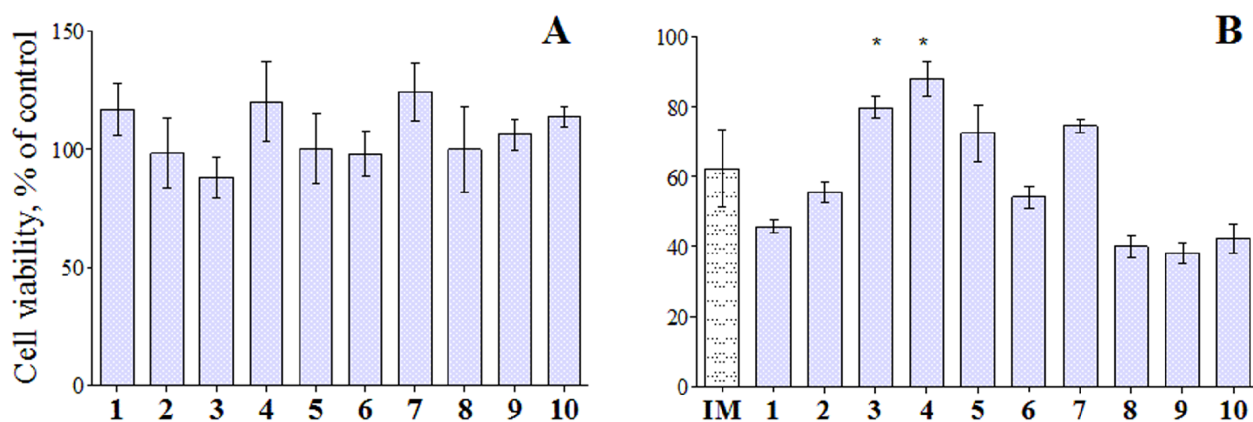
Полученные данные позволяют рекомендовать данные вещества в качестве основы для создания эффективных нейропротекторных препаратов, способных повлиять на ранние стадии развития нейродегенеративных заболеваний.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках Госзадания 0090-2017-0019 и при финансовой поддержке гранта РФФИ\_16-03-00079.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Leuner K., Müller W.E., Reichert A.S. (2012) From mitochondrial dysfunction to amyloid beta formation: novel insights into the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol*, 46(1), 186–193. DOI: 10.1007/s12035-012-8307-4.
2. Emerit J., Edeas M., Bricaire F. (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother*, 58, 39-46. DOI: 10.1016/j.biopha.2003.11.004
3. Kumar, S., Arya, P., Mukherjee, C., Singh, B.K., Singh, N., Parmar, V.S., Prasad, A.K., Ghosh, B. (2005) Novel aromatic ester from *Piper longum* and its analogues inhibit expression of cell adhesion molecules on endothelial cells. *Biochemistry*, 44, 15944–15952. DOI: 10.1021/bi050941u
4. Duchnowicz, P., Broncel, M., Podśędek, A., Koter-Michalak, M. (2012) Hypolipidemic and antioxidant effects of hydroxycinnamic acids, quercetin, and cyanidin 3-glucoside in hypercholesterolemic erythrocytes (*in vitro* study). *Eur J Nutr*, 51, 435–443. DOI: 10.1007/s00394-011-0227-y
5. Yabe, T., Hirahara, H., Harada, N., Ito, N., Nagal, T., Sangi, T., Yamada, H. (2010) Ferulic acid induces neural progenitor cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. *Neuroscience*, 165, 515–524. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2009.10.023
6. Amorati et al. (2013) Antioxidant Activity of Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.*, 61, 10835-10847. DOI: 10.1021/jf403496k
7. Klochkov S.G., Neganova M.E., Afanas'eva S.V., & Shevtsova E.F. (2014) Synthesis and antioxidant activity of securinine derivatives. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 48(1), 15-17. DOI: 10.1007/s11094-014-1035-5
8. Bachurin, S.O., Shevtsova, E.P., Kireeva, E.G., Oxenkrug, G.F. & Sablin, S.O. (2003) Mitochondria as a target for neurotoxins and neuroprotective agents. *Annals of the New Biochimica et Biophysica Acta*, 1804(8), 1626–1634. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07541.x
9. Akerman K.E., Wikström M.K. (1976) Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett*, 68(2), 191-197. DOI: 10.1016/0014-5793(76)80434-6



**Рисунок 3.** Влияние биоизостерных аналогов коричной кислоты и полиметоксибензолов на жизнеспособность клеток нейробластомы SH-SY5Y. **А** – собственная токсичность. **В** – влияние на иономицин (ИМ)-индуцированную токсичность. Концентрация тестируемых соединений – 30 мкМ. Концентрация ИМ – 3 мкМ. Контрольные образцы содержали ДМСО ( $\leq 1\%$ ) вместо тестируемых соединений. \* -  $p \leq 0.05$  по сравнению с контролем (Т-тест).

10. Neganova M.E., Klochkov S.G., Afanasieva S.V., Serkova T.P., Chudinova E.S., Bachurin S.O., Reddy V.P., Aliev G., Shevtsova E.F. (2016) Neuroprotective effects of the securinine-analogues: identification of allomargaritarine as a lead compound. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, 15(1), 102-107. DOI: 10.2174/1871527314666150821111812
11. Nix M., Otto M. (1990) Towards an optimized MTT assay. *J Immunol.*, 130(1), 149-151. DOI: 10.1016/0022-1759(90)90309-J
12. Lovell MA, Robertson J.D., Teesdale W.J., Campbell J.L., Markesbery W.R. (1998) Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci.*, 158(1), 47-52. DOI: 10.1016/S0022-510X(98)00092-6
13. Frederickson C.J., Koh J.Y., Bush A.I. (2005) The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat Rev Neurosci.*, 6(6), 449-62. DOI: 10.3233/JAD-2005-8208

Поступила: 28. 06. 2018.

Принята к публикации: 16. 07. 2018.

## BIOISOSTERIC ANALOGUES OF CINNAMIC ACID AS EFFECTIVE NEUROPROTECTORS

*M.E. Neganova<sup>1\*</sup>, V. Semenov<sup>2</sup>, M. Semenova<sup>3</sup>, O.M. Redkozubova<sup>4</sup>, Yu.R. Aleksandrova<sup>5</sup>,  
E.A. Lysova<sup>1</sup>, S.G. Klochkov<sup>1</sup>, E.F. Shevtsova<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Physiologically Active Substances, Russian Academy of Sciences,  
1 Severny proezd, Chernogolovka, 142432 Russia; \*e-mail: neganova83@mail.ru

<sup>2</sup>Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 47 Leninsky av., Moscow, 119991 Russia

<sup>3</sup>Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, 26 Vavilova str., Moscow, 119334 Russia

<sup>4</sup>"OOO Neurobotics", Directions 4922, 4-2, Southern Industrial Area, Zelenograd, 124498 Russia

<sup>5</sup>Ivanovo State University, School of Biology and Chemistry, Department of General Biology and Physiology,  
136 Lenina av., Ivanovo, Russia

Compounds that act on mitochondrial functions are considered as promising drugs for the treatment of neurodegenerative diseases and age-related dementias. As a basis for the creation of such potential drugs, bioisosteric cinnamic acid analogs and polymethoxybenzene derivatives were selected. Derivatives of cinnamic acid have a wide range of biological activities, which can be important for drugs aimed at the treatment of neurodegenerative diseases, in particular Alzheimer's disease. In this work, the neuroprotective activity of bioisosteric cinnamic acid analogs and polymethoxybenzene derivatives was studied. Among the compounds studied, lead substances **3**, **4**, and **7** have been identified. These compounds show no intrinsic toxicity and have a neuroprotective effect on the cellular model of neurodegeneration associated with calcium stress. The mechanism of their cytoprotective activity is probably due to the influence on mitochondrial functions, because these compounds effectively suppress the calcium-induced process of mitochondrial permeability jump. In addition, one of the substances investigated (**7**) has antioxidant properties, showing the ability to inhibit lipid peroxidation (LPO) of rat brain homogenate, which may be an additional mechanism of neuroprotective effect. The data obtained make it possible to recommend the investigated substances as a basis for the creation of effective neuroprotective drugs capable of influencing early stages of the development of neurodegenerative diseases.

**Key words:** cinnamic acid; neuroprotectors; neurodegenerative diseases; mitochondria; antioxidants

## ACKNOWLEDGMENTS

The work was financially supported by RFBR grant No. 16-03-00079 and within the framework of the State Task of 2018 (topic No. 0090-2017-0019).