На правах рукописи



ВАХИТОВА ЮЛИЯ ВЕНЕРОВНА

МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ КОМПЛЕКСА ПСИХОСТИМУЛИРУЮЩЕЙ, АНКСИОЛИТИЧЕСКОЙ И ИММУНОТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ ОРИГИНАЛЬНОГО ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ЛАДАСТЕНА

14.00.25 - фармакология, клиническая фармакология
03.00.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва - 2007

Работа выполнена в ГУ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН (г. Москва) и Институте биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН

Научный консультант: академик РАМН,
доктор медицинских наук, профессор
Середенин Сергей Борисович

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Островская Рита Ушеровна

доктор биологических наук, профессор
Носиков Валерий Вячеславович

доктор биологических наук,
Гривенников Игорь Анатольевич

Ведущая организация: ГОУ ВПО "Российский государственный медицинский университет" Росздрава

Защита диссертации состоится "25" апреля 2007 г. в 14 часов на заседании Диссертационного совета Д 001.024.01 при ГУ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, по адресу: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

С диссертацией можно ознакомиться в ученой части ГУ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, ул. Балтийская, 8, 125315, Москва.

Автореферат разослан: "23" марта 2007 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
д.м.н. Е.А. Вальдман

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Развитие современной фармакологии получило мощный импульс благодаря открытиям молекулярной биологии и генетики, объяснившим многие, ранее неизвестные процессы регуляции функций клетки и организма. Применение созданной за последние десять лет методической базы открыло новые возможности в изучении механизмов действия лекарств, что определяет перспективы совершенствования фармакотерапии как на этапе поиска и разработки фармакологических препаратов, так и при их применении с основной целью повышения эффективности и максимального снижения побочного действия.

Рецепторная теория, оставаясь главной доктриной фармакологии, в свете современных данных о пострецепторных системах вторичных мессенджеров и их взаимоотношениях с геномом дополняется пониманием многокомпонентности фармакодинамических процессов, объясняя системный характер фармакологического воздействия, что согласуется с классическими физиологическими принципами (Анохин, 1975; Судаков, 1979; Середенин, 2004). Благодаря этому определились подходы к анализу комплекса процессов, изменения которых формируют спектр фармакологического влияния. В настоящей работе предприняты попытки изучить механизмы действия нового оригинального препарата ладастена.

Ладастен (N-(2-адамантил) N-парабромфениламин) синтезирован и фармакологически изучен в ГУ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН (Климова и соавт., 1990; Морозов и соавт., 1993-2001). Выбор препарата в качестве объекта исследования обусловлен его высокой фармакологической активностью, подтвержденной во 2-ой фазе клинических испытаний (Незнамов и соавт., 2006), а главное, сложным фармакологическим спектром, включающим психостимулирующие, анксиолитические и иммунотропные свойства (Морозов и соавт., 1993, 2001; Середенин и соавт., 2001).

В доступной литературе данные о лекарственных веществах с подобным спектром действия не обнаружены, что определяет необходимость изучения механизмов действия ладастена. Поскольку ранее использованные нейрохимические методы не позволяли прийти к заключениям о том, как реализуются его эффекты, в настоящей работе в качестве концептуального избран подход оценки функционального состояния потенциальных фармакологических мишеней препарата – генов и кодируемых ими белков.

Предполагалось, что применение биочипов, количественной ОТ-ПЦР в режиме реального времени, двумерного электрофореза, данных биоинформатики позволят выявить комплексные изменения клеточного метаболизма, вызываемые ладастеном, анализ которых в сопоставлении с его известными фармакологическими эффектами даст возможность сформулировать научные положения о молекулярных механизмах действия препарата.

Цель исследования. Изучить молекулярные механизмы формирования психостимулирующего, анксиолитического и иммунотропного действия ладастена.

Задачи исследования. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить влияние ладастена (50 мг/кг; ***in vivo***) на активность цАМФ-, Ca^{2+}-фосфолипид-, Ca^{2+}-кальмодулин-зависимых и митогенактивируемых протеинкиназ в клетках головного мозга крыс.
2. Выявить спектр дифференциально экспрессирующихся генов в клетках головного мозга крыс при однократном введении ладастена в дозе 50 мг/кг.
3. Определить количественный уровень экспрессии генов-мишеней ладастена методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.
4. Установить эпигенетические механизмы регуляции экспрессии отдельных генов-мишеней ладастена.
5. Методами протеомного анализа выявить спектр экспрессирующихся под влиянием ладастена белков в головном мозге крыс.
6. Изучить влияние ладастена (10 μM; ***in vitro***) на синаптическую пластичность в гиппокампе.
7. Изучить влияние ладастена на пролиферативную и апоптическую активность лимфоцитов.

Научная новизна. Впервые проведено комплексное молекулярно-биологическое исследование оригинального препарата ладастена, обладающего широким спектром фармакологической активности. Показано, что ладастен при однократном внутрижелудочном введении в дозе 50 мг/кг в клетках головного мозга крыс в большой степени фосфорилирует мембранные белки и в зависимости от структуры мозга дифференциально активирует протеинкиназы цАМФ-, Ca^{2+}- и МАП-киназных сигнальных каскадов. Впервые выявлено, что ладастен преимущественно активирует Ca^{2+}-зависимые протеинкиназы, что обусловлено высвобождением Ca^{2+} из внутриклеточных депо эндоплазматического ретикулума. Впервые идентифицированы дифференциально экспрессирующиеся под действием ладастена гены и белки в клетках головного мозга крыс, *функциональное состояние которых позволяет обосновать психостимулирующую*, анксиолитическую и иммунотропную активности препарата. Впервые установлено, что ладастен увеличивает экспрессию гена тирозингидроксилазы и содержание соответствующего белка, коррелирующее с накоплением продуктов реакции – L-ДОФА и дофамина в гипоталамусе, гиппокампе и вентральной области покрышки экспериментальных животных. Синтез *de novo* данного катехоламина под действием ладастена рассматривается в качестве основного механизма, определяющего особенности психоактивирующего действия препарата. Впервые показано, что изменение транскрипционной активности гена тирозингидроксилазы в клетках гипоталамуса крыс под действием ладастена может быть связано с изменением характера метилирования CpG-

динуклеотидов в промоторной области этого гена: выявлено увеличение частоты деметилирования CpG-динуклеотидов в последовательностях, ассоциированных с сайтами связывания отдельных транскрипционных факторов. Установлено, что ладастен ингибирует активность гистондеацетилаз в стриатуме и гиппокампе крыс. Впервые показано, что ладастен оказывает влияние на синаптическую пластичность в гиппокампе, способствуя переходу кратковременной потенциации в долговременную. Данный процесс обусловлен усилением дофаминергической нейропередачи на фоне препарата и является зависимым от синтеза белка ***de novo***. Экспериментально установлено, что комитогенный эффект ладастена в культуре Т-лимфоцитов сопряжен с активацией конечных эффекторов МАП-киназного каскада – протеинкиназ ERK1/2. Впервые показано, что ладастен снижает чувствительность Т-лимфоцитов к Fas-индуцированному апоптозу. Эти результаты подтверждают наличие у ладастена иммуностимулирующих свойств.

Научно-практическая значимость. Установленные геномные и внутриклеточные механизмы действия ладастена подтверждают данные о спектрах фармакологической активности препарата, что определяет целесообразность его использования в клинике при необходимости коррекции ряда состояний. Полученные данные учтены при составлении инструкции по применению ладастена в качестве антиастенического средства. Выявленные фармакологические мишени препарата могут быть рассмотрены как в качестве "маркеров" состояния, что необходимо для молекулярной диагностики, так и в качестве предикторов назначения ладастена. При выполнении фармакогеномного и фармакопротеомного исследования апробирован комплекс молекулярно-биологических методов, внедрение которых целесообразно при выполнении фундаментальных фармакологических исследований. Результаты выполненного исследования включены в комплект документов, представленных в Минздравсоцразвития РФ для регистрации ладастена в качестве лекарственного средства.

Внедрение результатов исследования в практику. Методические подходы, использованные в данной работе, могут найти применение на этапах доклинического исследования потенциальных лекарственных препаратов с целью уточнения спектра действия и анализа механизмов их активностей. Материалы диссертации используются в учебном процессе при чтении лекций студентам на кафедре фармакогенетики Российского государственного медицинского университета, общей биологии и генетики Башкирского государственного педагогического университета, а также на кафедре фармакологии № 2 Башкирского государственного медицинского университета.

Основные положения, выносимые на защиту. Предметом защиты данной работы являются следующие основные результаты исследований:

1. Реализация фармакологических эффектов ладастена сопряжена с активацией протеинкиназ различных сигнальных каскадов (PKA, PKC, CaMKII, ERK1/2).

2. Одним из механизмов, обеспечивающим особенности психоактивирующего действия ладастена является усиление экспрессии гена и белка тирозингидроксилазы и биосинтеза дофамина в отдельных структурах мозга крыс. В регуляцию транскрипционной активности данного гена вовлекаются эпигенетические механизмы, что проявляется в увеличении частоты деметилирования цитозинов в сайтах связывания отдельных транскрипционных факторов в промоторной его области, а также в ингибировании активности гистондеацетилаз.

3. Ладастен при однократном воздействии оказывает влияние на функциональное состояние многих генов и белков в мозге крыс, которые могут быть охарактеризованы в качестве мишеней препарата и определять направление протекания метаболических процессов.

4. Иммунопротективные свойства ладастена связаны с его комитогенной активностью и способностью снижать чувствительность Т-лимфоцитов к Fas-индуцированному апоптозу.

5. Механизмы нейропластичности, которые реализуется при действии ладастена, связаны с усилением экспрессии везикулярных, транспортных, цитоскелетных и некоторых других белков.

6. Влияние ладастена на синаптическую пластичность в гиппокампе обусловлено усилением дофаминергической нейропередачи и является зависимым от синтеза *de novo* дофамина и белка.

Конкурсная поддержка работы. Исследования были поддержаны грантами Программы фундаментальных исследований Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология" (10002-251/П-10/142-448/260503-196), Государственной поддержки ведущих научных школ РФ (НШ – 2217.2003.4), РФФИ – Агидель (02-04-97904), ФЦНТП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники" на 2002-2006 годы.

Апробация работы. *Основные результаты работы были представлены на* VIII-м *и* X-м Российском национальном конгрессе "Человек и лекарство" (Москва, 2001, 2003); 3-й Международной Конференции " Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам" (Суздаль, 2001); 5-м Конгрессе "Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии" (Москва, 2002); 2-м Съезде Российского Научного Общества Фармакологов (Москва, 2003); 7-й Пущинской школе-конференции молодых ученых (Пущино, 2003); Международной конференции "Рецепция и внутриклеточная сигнализация"(Пущино, 2003); Научно-практической конференции "Проблемы создания новых лекарственных средств" (Уфа, 2003); FEBS Special Meeting 2003 on Signal Transduction (Brussels, 2003); XVI-й зимней молодежной научной школе "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (Москва, 2004); III-м Съезде ВОГиС "Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития" (Москва, 2004); XXIV CINP Congress (Paris, 2004); 6th Meeting of the German Neuroscience Society (Göttingen, 2005); 8th ECNP Regional Meeting (Moscow, 2005); V-м Съезде Российского общества медицинских генетиков (Уфа, 2005); 4-й Международной конференции "Биологические основы индивидуальной чувствительности к

психотропным средствам" (Москва, 2006); Научно-практической конференции "Новая технологическая платформа биомедицинских исследований (биология, здравоохранение, фармация)" (Ростов-на-Дону , 2006). Работа апробирована на заседании Ученого совета Института биохимии и генетики УНЦ РАН (протокол № 9 от 15 сентября 2006г.)

Публикации. По теме диссертации опубликована 31 работа, в том числе в зарубежных изданиях – 6.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 324 страницах, содержит 12 таблиц и 60 рисунков и состоит из введения, обзора литературы (главы 1), описания объектов и методов исследования (глава 2), результатов исследования и их обсуждения (главы 3-8), заключения, выводов и списка литературы, включающего 486 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Эксперименты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 180-250 г и 25-ти дневных крысах-самцах линии Вистар. Во всех опытах использовали две группы животных - контрольную и опытную - по 5-12 крыс в каждой Исследуемые препараты вводили внутрижелудочно зондом в виде суспензии: ладастен, нифедипин - в физиологическом растворе с добавлением Tween 80 (0.04%), циннаризин - в физиологическом растворе, контрольным животным – физиологический раствор с добавлением Tween 80. Дозы: ладастен (опытно-технологический отдел ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН) 50 мг/кг, циннаризин (ICN, США) 50 мг/кг, нифедипин (ICN, США) 10 мг/кг. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с "Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных" (1977). Декапитацию крыс проводили после однократного введения препаратов через 15 мин, 0.5 ч, 1 ч, 1.5 ч, 2 ч, 2.5 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 12 ч. Сразу после декапитации извлекали головной мозг, и в зависимости от целей исследования использовали в экспериментах либо целый головной мозг, либо выделяли структуры головного мозга (стриатум, гипоталамус, гиппокамп, вентральную область покрышки, прилежащее ядро) (Glowinski, Iversen, 1966). Ткани замораживали в жидком азоте и хранили при -70°С. В исследованиях использовали также лимфоциты периферической крови здоровых доноров–добровольцев.

Суммарные препараты ДНК из структур головного мозга получали с использованием стандартной методики, включающей в себя инкубацию с протеиназой К и последующей фенольно-хлороформной очисткой (Sambrook et al., 2001). **Бисульфитную модификацию ДНК** проводили по методу Olek et al. (1996). **Полимеразную цепную реакцию (ПЦР)** проводили по стандартному протоколу с использованием Taq ДНК-полимеразы (MBI Fermentas, США).

Модифицированные бисульфитом натрия образцы ДНК амплифицировали с двумя парами праймеров – "внешними" и "внутренними" (метод "гнездовой" ПЦР). Подбор праймеров к исследуемому фрагменту гена тирозингидроксилазы осуществляли с помощью программы MethPrimer v.1.1 b (последовательности AF069036 EMBL; X04914 GenBank). Аналитический и препаративный гель-электрофорез ДНК в неденатурирующих условиях, элюцию ДНК из агарозных гелей, подготовку компетентных клеток и их трансформацию проводили в соответствии с (Sambrook et al., 2001). **Клонирование** элюированных из геля продуктов ПЦР проводили с помощью набора "pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems" (Promega, США) по методике фирмы – изготовителя. **Выделение и очистку плазмидной ДНК** осуществляли "Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System"(Promega, США). Реакцию **автоматического прямого секвенирования** проводили на приборе ABI Prism 310 с использованием набора "BigDye™ Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction" (Applied Biosystems, Великобритания) по протоколам производителя. Результаты секвенирования обрабатывали с использованием программы Chromas 3.01. Очистку продукта ПЦР для секвенирования проводили согласно протоколу "Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System" (Promega, США).

Суммарную РНК выделяли с использованием "TRIzol Reagent" (Invitrogen, США) в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя. Примеси ДНК удаляли с помощью ДНКазы I (Promega, США) с последующей очисткой смесью фенол-хлороформ. **Реакцию обратной транскрипции РНК** проводили с использованием oligo$(dT)_{12\text{-}18}$-праймера (Invitrogene, США) и обратной транскриптазы M-MuLV (MBI Fermentas, США) в термоциклере „Терцик" ("ДНК-Технология", Россия).

Анализ экспрессии изучаемых генов проводили методом количественной ОТ-ПЦР в режиме реального времени на приборе "iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System" (BioRad, США) с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I и программного обеспечения "iCycler iQ Real-Time Detection System software" версия 3.0 6070 (BioRad, США). Праймеры к нуклеотидным последовательностям анализируемых генов подбирали с помощью программы Primer 3 (www_genome.wi.mit.edu/cgi.bin/primer/primer3www.cgi) с последующим анализом в программах "DNAStar" ("LaserGene") и OLIGO 6.0. Изменения в уровнях экспрессии генов рассчитывали с использованием значений пороговых циклов с помощью специализированной программы REST Tool V1 9.9 (Corbertt Research, США), обладающей возможностью статистической обработки данных (Pfaffl et al., 2002).

Гибридизацию меченых ^{32}P или ^{33}P кДНК проводили на "Atlas™ Rat cDNA Expression Array" и "Atlas Rat 1.2 cDNA Expression Array" (BD Biosciences, США), содержащих 588 и 1176 амплифицированных фрагментов кДНК известных генов крысы соответственно. Получение меченых проб, гибридизацию и анализ проводили согласно протоколу производителя. Результаты

гибридизации анализировали с использованием программы "ImageQuant software 5.0" (Molecular Dynamics, США) и "Microsoft Excel" (Microsoft corporation, США).

Поиск и идентификацию белков-мишеней ладастена проводили в Центре Протеомных исследований Института биомедицинской химии РАМН (г. Москва) методом двумерного электрофоретического разделения белков с последующей их идентификацией методом времяпролетной масс-спектрометрии (2D-PAGE – MALDI-TOF, http://www.expasy org/ch2d/; Shevchenko et al., 1996). Белки идентифицировали с использованием алгоритма анализа пептидного фингерпринта с помощью программного обеспечения Mascot и базы данных NCBI.

Выделение **цитоплазматических и мембранных белков** проводили по методам, описанным в (Hjelmand, 1990). Концентрацию белков оценивали спектрофотометрически (спектрофотометр "SmartSpec™ Plus", BioRad, США) по методу Bradford (1976), используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта. **Протеинкиназную активность** определяли по методу Киккава с соавт. (1983). Определение **активности Ca^{2+}–АТФазы** проводили по методу, описанному Скулачевым (1962). Для определения **фосфорилирования белков *in vivo*** (Loeb, 1970) через 15 минут после введения ладастена внутрибрюшинно вводили [^{32}P]-ортофосфорную кислоту в количестве 80 МБк. **Электрофорез белков** проводили по методу Laemmli (1970) в полиакриламидном геле (ПААГ) с 0.1%-ным ДДС-Na с линейным градиентом акриламида (6-16%). Количественную оценку оптической плотности полос на радиоавтографах осуществляли с помощью программы TotalLab. 2.0. (США). Эксперименты проводили в трех биологических повторностях от 2–х до 9 раз. Процедуру **иммуноблоттинга** (оборудование производства BioRad США) и гибридизацию с антителами (антитела фирм Biosource, Cell Signaling, США) проводили в соответствии с протоколами, рекомендованными производителями.

Ядерный экстракт клеток головного мозга крыс получали в соответствии с протоколом Dignam et al. (1983). **Поиск и идентификацию транскрипционных факторов**, проводили с помощью коммерческого набора "TranSignal™ Protein/DNA Arrays" (Panomics, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя.

Содержание дофамина и L-ДОФА в гипоталамусе, стриатуме и гиппокампе головного мозга крыс анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ- детекцией.

Электрофизиологические эксперименты проводили на модели долговременной потенциации (LTP). Использовали поперечные срезы гиппокампа толщиной 350 мкм (VIBRATOME 3000, Saint Louis, США), полученные от 25-ти дневных крыс-самцов линии Вистар. Индивидуальные срезы помещались в экспериментальную камеру, перфузируемую искусственной спиномозговой жидкостью (ИСМЖ). Внеклеточный регистрирующий электрод (стеклянная микропипетка, наполненная ИСМЖ) устанавливался в поле CA1 str. radiatum, для регистрации

полевых возбуждающих постсинаптических потенциалов (пВПСП). Коллатерали Шаффера стимулировались через стальные электроды (A-M Systems, INC, Sequim, WA, США) двухфазными прямоугольными импульсами тока с интенсивностью 15-30 μA. Индукцию кратковременной потенциации вызывали стимуляцией синапсов коллатералей Шаффера с частотой 100 Гц в течение 200 мс (Wilsch et al., 1998). Аппликация в среду ладастена (10 микроМ), антагониста $Д_1/Д_5$ рецепторов дофамина SCH23390 (1 микроМ) и ингибитора трансляции анизомицина (20 микроМ) проводилась в зависимости от целей эксперимента как до, во время, так и после стимулирующей тетанизации.

Иммунологические исследования проводили в культурах лимфоцитов периферической крови, полученных от здоровых доноров-добровольцев. Лимфоциты выделяли стандартным методом центрифугирования в градиенте плотности фикола и культивировали в течение 72 час (37°C, 5% CO_2) в среде RPMI-1640. В качестве митогена использовали моноклональные антитела против CD3 рецептора (aCD3 МКА, 2.5 мкг/мл, клон ICO-90), обеспечивающие селективную активацию Т-клеток через Т-клеточный рецептор. Ладастен растворяли в DMSO (0 4%) и добавляли в культуры одновременно с митогеном в конечной концентрации 0.1 и 1 μM. В контрольные культуры добавляли только DMSO. Для оценки пролиферативной активности лимфоцитов использовали традиционный морфологический метод. Апоптоз оценивали флюорометрическим методом, определяя суммарную активность каспаз 3, 7, 10 (Cs-3,7,10) в лизатах лимфоцитов, используя стандартный набор реагентов "FuorAce Apopain Assay Kit" (BioRad, США). Интенсивность флюоресценции регистрировали на флюориметре VersaFluor 1.3 (BioRad, США). Морфологическую документацию апоптоза лимфоцитов осуществляли методом суправитального окрашивания клеток бис-бензимидом - Hoechst 33342. Учет результатов производили на люминесцентном микроскопе МБИ-15А (светофильтр возбуждения флюоресценции 360±5 нм, эмиссия – 490 нм). Оценку экспрессии в клетках белков, продуктов генов-регуляторов апоптоза осуществляли иммуногистохимическим методом, используя первичные антитела против bcl-2, p53 (DAKO, США), и „визуализирующую" систему EnVision™+ Systems/HRP Rabbit DAB+ (DAKO, США). Оценку экспресии Fas рецептора (CD95) осуществляли стандартным иммунофлюоресцентным методом. После окончания инкубации лимфоциты отмывали раствором CellWash, ресуспендировали в этом же растворе и окрашивали FITC-мечеными МКА против CD3 рецептора и PE-мечеными МКА против CD95 рецептора (Caltag, США) согласно протоколу, предложенному изготовителем антител. После окрашивания клетки подвергали проточной цитофлюорометрии на цитометре FACS Calibur ("Becton Dickinson", США). Полученные данные анализировали в рамках программного обеспечения CellQuest ("Becton Dickinson", США).

Статистическая оценка результатов. Результаты обрабатывались с помощью программ Statsoft Statistica 6.0. (Microsoft Corp., США), REST Tool V1.9.9 (Corbertt Research, США),

BiQ_Analyser (http://biq-analyser.bioinf.mpi-inf.mpg.de/), BioEdit V. 5.0.9. (США). Достоверности различий групповых средних оценивались с помощью дисперсионного анализа. На графиках представлены средние значения с учетом стандартной ошибки среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Краткая характеристика изучаемого препарата.

Бромпроизводное 2-аминоадамантана ладастен (N-(2-адамантил) N-парабромфениламин), синтезированный и фармакологически изученный в ГУ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, разработан в качестве лекарственного средства, обладающего психостимулирующими, селективными анксиолитическими и иммунотропными свойствами (Морозов и соавт., 1993; Середенин и соавт., 2001; Яркова и соавт., 2001). Препарат обладает также антиоксидантной, детоксицирующей активностью, повышает резистентность организма к действию различных экстремальных факторов. Физико-химические особенности молекулы ладастена, в частности, липофильность, определяют фармакокинетические свойства препарата, а именно, способность интенсивно и быстро распределяться в органы и ткани экспериментальных животных и человека, а также проникать через гематоэнцефалический барьер. Показано, что уже через 10 мин после однократного *per os* введения (100 мг/кг, 2% ПЭГ-400) препарат обнаруживается в мозге крыс, а максимальный уровень препарата регистрируется через 60 мин (Сергеева, Красных, 1994). Как показывают проведенные ранее психофармакологические, нейрохимические, электрофизиологические исследования, нейротропные эффекты ладастена обусловлены сложным модулирующим влиянием на центральные дофамин-, серотонин- и ГАМКергические системы мозга (Морозов и соавт, 2001), однако, механизмы формирования и реализации комплекса психотропных активностей препарата остаются во многом неясными. В связи с этим в настоящей работе основное внимание было уделено изучению молекулярно-генетических механизмов, определяющих и обосновывающих нейротропные и иммунотропные свойства ладастена.

2. Влияние ладастена на фосфорилирование белков и активность протеинкиназ различных систем внутриклеточной передачи сигнала.

Влияние ладастена на активность мембраносвязанных и цитоплазматических белков мозга крыс оценивалось по включению [^{32}P]-ортофосфата. Показано, что ладастен усиливает включение радиоактивного фосфора как в цитоплазматические (более, чем в три раза), так и мембраносвязанные (более, чем в пять раз) белки головного мозга крыс по сравнению с контролем. Обращает на себя внимание высокий уровень включения радиоактивного фосфора в мембранные белки мозга, что, возможно, обусловлено изменениями функционального состояния

рецепторов и ионных каналов клетки под действием ладастена вследствие его мембранотропных свойств (влияние на параметры физико-химических свойств и липидные компоненты мембран). Изложенный выше экспериментальный материал, несмотря на его значимость, не дает ответа на вопрос о внутриклеточных путях передачи сигнала после введения препарата животным. Поэтому в последующем основное внимание мы концентрировали на изучении влияния ладастена на активность 4-х основных, наиболее исследованных типов протеинкиназ: Ca^{2+}-фосфолипид, Ca^{2+}-кальмодулин, цАМФ–зависимых и митоген-активируемых киназ.

2.1. Влияние ладастена на активность цАМФ – зависимых протеинкиназ в клетках головного мозга крыс

Определение динамики активности протеинкиназы А (ПКА) в растворимой фракции белков гомогената (супернатант после центрифугирования при 20000 g) головного мозга крыс проводили в пределах 30 мин после извлечения мозга и гомогенизации в соответствующем буфере. Активность ПКА идентифицировали с помощью высокоспецифичного ингибитора цАМФ-зависимых протеинкиназ (5 мг/кг) по уровню подавления им базальной или стимулированной цАМФ активности. Как видно из рис. 1, ладастен на базальный уровень активности ПКА оказывает влияние во всех исследованных промежутках времени. Наибольшее ее увеличение (около 10%) выявляется после одно- и шестичасового действия препарата. Следует отметить, что под действием ладастена через 0.5, 2 и 12 ч в клетках головного мозга крыс проявляется протеинкиназная активность, которая не подавляется ингибитором, специфичным для ПКА.

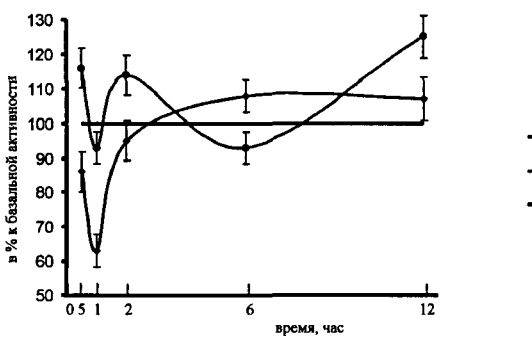


Рис. 1. Влияние ладастена на активность ПКА в растворимой фракции белков головного мозга крыс (субстрат - гистон III-S) в присутствии высокоспецифичного ингибитора ПКА.

Представленные выше данные свидетельствуют об участии цАМФ-зависимого сигнального каскада в опосредовании действия ладастена на клетку. Как известно, активация цАМФ-зависимого сигналинга инициируется специфической или неспецифической стимуляцией рецепторов, сопряженных с G-белками, что приводит к увеличению концентрации цАМФ и активации ПКА. Последняя фосфорилирует по остаткам серина и треонина многочисленные белки-субстраты, набор которых определяется типом клеток. К рецепторам, сопряженным с G-

белками относится большая группа рецепторов, включая рецепторы дофамина, адреналина, некоторые подтипы рецепторов серотонина (5-HT_4, 5-HT_6, 5-HT_7), метаботропные рецепторы глутамата mGluR II, в частности mGluR2, mGluR3, 4, 6, 7, 8 и др. Рецепторы, позитивно или негативно регулирующие аденилатциклазу посредством G_s или G_i белков, являются мишенями для многих психотропных лекарственных средств – нейролептиков, антидепрессантов, психостимуляторов, анксиолитиков, и соответственно, реализация их биологических эффектов обусловлена цАМФ-зависимыми ПК. Можно предположить, что ладастен неспецифически модулирует активность рецепторов, разнонаправленно регулирующих активность ПКА, с преобладанием вовлечения рецепторов, негативно сопряженных с аденилатциклазой. Этим, вероятно, объясняется незначительное увеличение активности ПКА при действии ладастена. Не так давно показано, что ладастен обладает тропностью к $Д_3$ рецепторам дофамина в стриатуме, которые, как известно, относятся к $Д_2$ - $Д_4$ подтипу рецепторов негативно сопряженных с аденилатциклазой (Абаимов, Ковалев, 2007) Другой возможной причиной незначительного увеличения активности ПКА может быть взаимное регуляторное влияния цАМФ- и Ca^{2+}-зависимых сигнальных каскадов. Наиболее часты примеры взаимоингибирующего действия этих путей, которое может осуществляться на разных этапах передачи сигнала. Тем не менее, на уровне конечной мишени – транскрипционного фактора CREB действие этих путей однонаправленно (активация). Не исключено также, что индуцируется активность протеинфосфатаз, дефосфорилирующих ПКА и ограничивающих, таким образом, ее активность.

Следует отметить, что под действием ладастена через 0.5, 2 и 12 ч в клетках головного мозга крыс проявляется протеинкиназная активность, которая не подавляется ингибитором, специфичным для протеинкиназы А, что свидетельствует об участии других сигнальных систем в опосредовании действия препарата

2.2. Влияние ладастена на активность Ca^{2+} - фосфолипид-зависимых протеинкиназ в клетках головного мозга крыс

Как известно, существует ряд рецепторов, стимуляция которых приводит к активации фосфолипазы С (ФЛС), которая далее гидролизует мембранный фосфоинозитид PIP_2 с образованием двух вторичных мессенджеров: IP_3, вызывающего мобилизацию Ca^{2+} из депо, и DAG, активирующего протеинкиназу С (ПКС) (Крутецкая и соавт., 2003). Активации этого сигнального каскада может происходить и независимо от стимуляции рецепторов, сопряженных с ФЛС. Имеются данные, свидетельствующие о том, что изменения композиции липидных компонентов мембран являются важным факторов, оказывающим влияние на функциональное состояние ФЛС и как следствие, других участников этого сигнального каскада, в частности ПКС (Seydel and Wiese, 2002). Принимая во внимание наличие у ладастена мембранотропных свойств, а также быстроту реализации фармакологических эффектов препарата, можно предположить, что

активация сигнального каскада, зависимого от мембранных фосфолипидов и запускающего Ca^{2+}-зависимые процессы, является одним из первичным этапов действия ладастена на клетку.

Определение активности ПКС проводили в растворимой фракции белков головного мозга крыс в системе *in vitro* с использованием в качестве субстрата гистона III-SS (Sigma, США), а также с введением в реакционную среду Ca^{2+} и без него. Как видно из рис. 2, в исследованном интервале времени ладастен оказывает существенное влияние на активность ПКС в клетках головного мозга. Выявлены три пика увеличения активности ПКС - через 0.5 ч, 4 ч и 8 ч. На наш взгляд, особого внимания заслуживает более чем 2.5-кратное увеличение активности ПКС через 0.5 ч после введения ладастена, так как это свидетельствует о преимущественной и выраженной активации фосфоинозитидного сигнального пути при действии препарата.

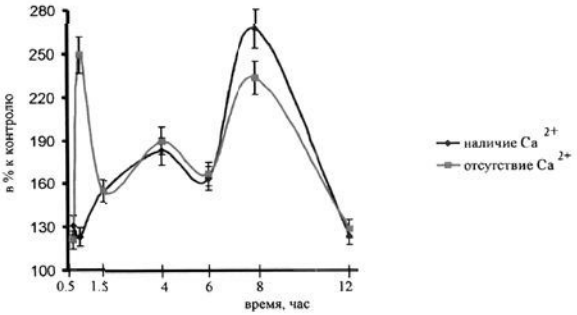


Рис. 2. Динамика активности ПКС в цитозольной фракции белков головного мозга крыс при однократном внутрижелудочном введении ладастена (50 мг/кг). Субстрат – гистон III-SS.

Увеличение концентрации Ca^{2+} в цитозоле может быть связано как с их высвобождением из эндоплазматического ретикулума (ЭР), так и поступлением из межклеточного пространства через мембранные кальциевые каналы. С целью выявления механизмов повышения внутриклеточного Ca^{2+} при действии ладастена активность ПКС в растворимой фракции белков головного мозга крыс определяли после селективной блокады Ca^{2+}-каналов ЭР циннаризином (50 мг/кг) и мембранных – нифедипином (10 мг/кг). В экспериментах с блокатором Ca^{2+}-каналов ЭР показано, что при совместном введении циннаризина и ладастена в использованных нами концентрациях происходит ингибирование активности ПКС, независимо от наличия в среде экзогенного Ca^{2+}. В то же время, при введении нифедипина активность ПКС при отсутствии экзогенного Ca^{2+} не изменяется, а при их наличии – несколько увеличивается (рис. 3).

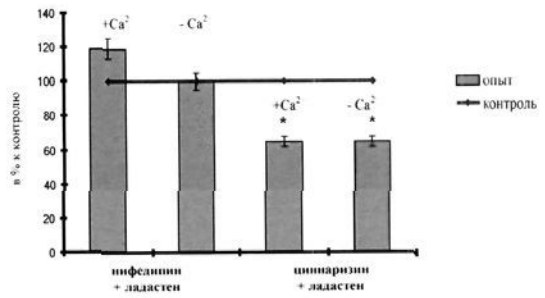


Рис. 3. Влияние нифедипина и циннаризина на активность ПКС в цитозольной фракции белков головного мозга крыс на фоне действия ладастена (50 мг/кг) через 30 мин после однократного его внутрижелудочного введения. Контроль – нифедипин (10 мг/кг);циннаризин (50 мг/кг). Субстрат – гистон III-SS.

Анализ полученных данных позволяет предположить, что увеличение уровня Ca^{2+} при действии ладстена происходит как за счет стимуляции высвобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо ЭР (а также, возможно, и из митохондриального пула), так и путем входа Ca^{2+} через другие типы потенциал-зависимых кальциевых каналов, не чувствительные к дигидропиридинам, либо же через рецептор-управляемые каналы.

Оптимальная концентрация Ca^{2+} в цитоплазме при их повышении поддерживается разными механизмами, в том числе за счет изменения активности Ca^{2+}-АТФаз клеток Нами показано резкое увеличение активности Ca^{2+}-АТФазы в клетках головного мозга крыс через 0.5 ч после введения ладастена что, вероятно, связано с необходимостью удаления избыточной концентрации Ca^{2+} из цитоплазмы. Следующий пик активности Ca^{2+}-АТФазы выявляется в интервале времени от 8 до 12 ч после введения препарата, что фактически совпадает со вторым максимумом увеличения активности ПКС в клетках мозга (рис. 4). Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что однократное внутрижелудочное введение ладастена в дозе 50 мг/ кг вызывает активацию Ca^{2+}-фосфолипид-зависимого сигнального каскада в клетках мозга крыс, о чем судили по увеличению активности ПКС. Косвенные данные указывают также на то, что на фоне действия ладастена происходит возрастание внутриклеточной концентрации Ca^{2+}, вероятно, в большей степени за счет высвобождения из внутриклеточных депо, что продемонстрировано в экспериментах с блокатором Ca^{2+}-каналов ЭР циннаризином.

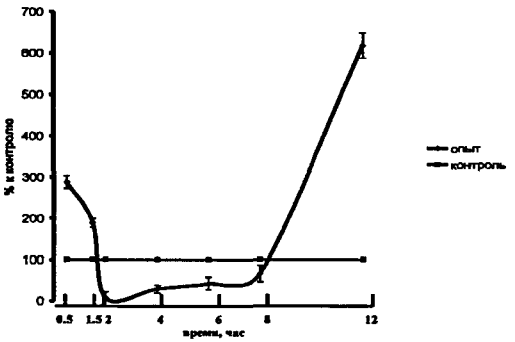
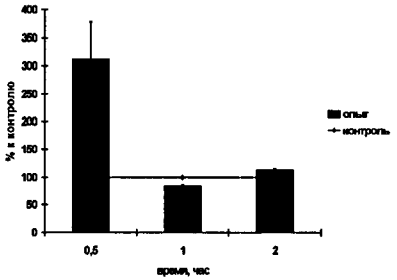


Рис 4 Динамика активности Ca^{2+}-АТФазы в растворимой фракции белков головного мозга крыс при однократном введении ладастена.

2.3. Влияние ладастена на активность Ca^{2+}- кальмодулин-зависимой протеинкиназы II в клетках стриатума, гипоталамуса и гиппокампа головного мозга крыс

При повышении внутриклеточной концентрации Ca^{2+} образует комплекс с кальций-связывающим белком кальмодулином (КМ). Этот комплекс активирует далее многие цитоплазматические белки, в том числе и различные протеинкиназы К числу мишеней, регулируемых комплексом Ca^{2+}/КМ, относятся Ca^{2+}/КМ-зависимые протеинкиназы (СаМК). Участию различных типов СаМК в регуляции нейрональных функций посвящена обширная литература. Отметим лишь, что СаМК являются одними из наиболее представленных в клетках

мозга протеинкиназ и участвуют в регуляции процессов нейрональной возбудимости, отдельных этапов нейропередачи, а также играют ключевую роль в механизмах индукции и поддержания кратко- и долговременной потенциации в гиппокампе (McGuinness et al., 1985; Soderling, 2000). Нами методом иммуноблоттинга изучено влияние ладастена на динамику уровня фосфорилированной формы Ca^{2+}- кальмодулин-зависимой протеинкиназы II (pCaMKII) в стриатуме, гипоталамусе и гиппокампе крыс.



а) б)

Рис. 5. Уровень pCaMKII (Thr286) в клетках а) стриатума и б) гипоталамуса головного мозга крыс после однократного внутрижелудочного введения ладастена (50 мг/кг, в % к контролю)

Как видно из рис. 5а, ладастен через 0 5 ч после внутрижелудочного введения более чем в три раза увеличивает уровень pCaMKII в клетках стриатума. Более продолжительное действие ладастена к данному эффекту не приводит, наоборот, наблюдается незначительное ингибирование pCaMKII. В отличие от клеток стриатума, в клетках гипоталамуса через 0 5 ч и 1 ч после введения ладастена уровень pCaMKII увеличивается примерно на 25%, достигая почти 200% к 2-м ч после введения препарата (рис. 5б). В клетках гиппокампа отмечается увеличение уровня pCaMKII на протяжении всего периода наблюдений – в среднем возрастание данного показателя в этой структуре составляет 60% от уровня контрольных значений (рис. 6).

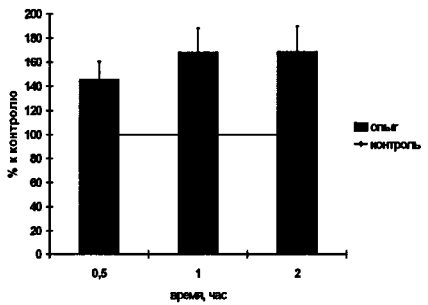


Рис. 6. Уровень pCaMKII (Thr286) в клетках гиппокампа головного мозга крыс после однократного внутрижелудочного введения ладастена (50 мг/кг, в % к контролю).

Таким образом, как видно из представленных данных, однократное введение ладастена в дозе 50 мг/кг приводит к дифференциальной временной и структуро-специфичной активации pCaMKII

в мозге крыс, обусловленной, вероятно, особенностями регуляции данной протеинкиназы в той или иной структуре, субстратной специфичностью и другими факторами. Поскольку CaMKII участвует в регуляции практически всех аспектов нейрональных функций, последствия активации CaMKII в разных структурах могут быть весьма разнообразны. Так, можно предполагать, что значительное увеличение уровня pCaMKII в стриатуме через 0.5 ч после введения ладастена, вероятно, свидетельствует об усилении высвобождения нейромедиаторов терминалями данной структуры и, соответственно, об интенсификации процессов экзоцитоза. Как уже отмечалось выше, ладастен длительно стимулирует высвобождение дофамина в дорсальном стриатуме крыс (Грехова и соавт. 1995). Продолжительная активация CaMKII в гиппокампе и гипоталамусе, возможно, отражает вовлечение данной киназы в процессы, связанные с регуляцией генной экспрессии и синтеза белков, а также в механизмы синаптической пластичности. Кроме того, как показано Consogno et al (2001), продолжительная активация CaMKII в гиппокампе при действии антидепрессантов обусловлена независимым от Ca^{2+} аутофосфорилированием киназы.

2.4. Влияние ладастена на активность митоген-активируемых киназ

Каскад митоген-активируемых киназ (МАПК) является основным путем сигнальной трансдукции, вовлекаемой в систему внутриклеточного сигналинга при активации тирозинкиназных рецепторов ростовых факторов. Рецепторы последних сопряжены с эффекторными G-белками, в частности, Ras-семейства, которые активируют МАП-киназный каскад при трансдукции митогенного сигнала (Brunet et al., 1995; Kalab et al., 1996). Активность Ras-каскада (Ras→Raf→MEK1/2→ERK1/2) связана с функциональным состоянием четырех киназ. Конечная киназа ERK1/2 фосфорилирует ряд белковых субстратов, в том числе транскрипционные факторы, которые повышают экспрессию "среднеранних генов" клеточного ответа на митогенный сигнал. Активность МАП-киназ регулируется также протеинкиназами цАМФ- и Ca^{2+}-зависимых сигнальных каскадов. Основываясь на полученных нами данных о влиянии ладастена на экспрессию ряда генов и белков, участвующих в процессах нейритогенеза, синаптической пластичности, а также о вовлечении ПКА и ПКС в опосредование действия ладастена, исследовалось влияние препарата на уровень фосфорилированных форм ERK1/2 (pERK1/2) в клетках гипоталамуса, стриатума и гиппокампа.

Как видно из рис 7, через 0.5 ч в гипоталамусе количество pERK1/2 увеличивается на 60-70%, тогда как к 1.5 ч происходит значительное увеличение содержания pERK2 и в меньшей степени - pERK1.

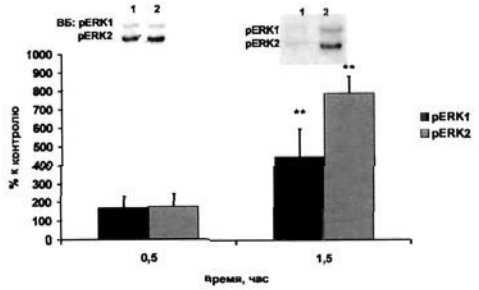


Рис. 7. Уровень pERK1/2 в клетках гипоталамуса крыс после однократного внутрижелудочного введения ладастена (50 мг/кг, в % к контролю). ВБ – вестерн-блот; 1-контроль, 2 – опыт.

В стриатуме ладастен оказывает выраженное активирующее влияние на уровень преимущественно pERK2 как через 0.5 ч, так и через 1.5 ч после введения (рис. 8).

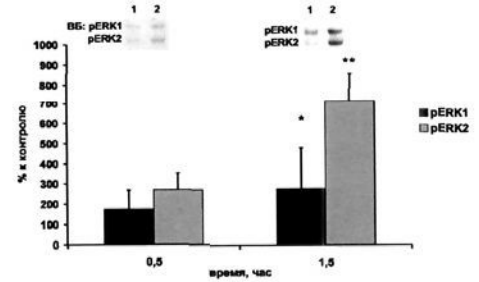


Рис. 8. Уровень pERK1/2 в клетках стриатума крыс после однократного внутрижелудочного введения ладастена (50 мг/кг, в % к контролю). ВБ – вестерн-блот; 1-контроль, 2 – опыт.

В гиппокампе более значимые изменения касались уровня pERK1/2 через 1.5 ч после введения ладастена (рис. 9).

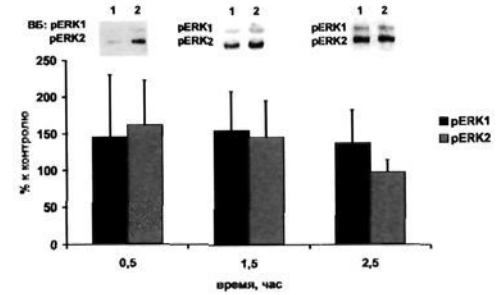


Рис. 9. Уровень pERK1/2 в клетках гиппокампа крыс после однократного внутрижелудочного введения ладастена (50 мг/кг, в % к контролю). ВБ – вестерн-блот; 1-контроль, 2 – опыт.

Анализируя экспериментальные данные о влиянии ладастена на МАПК-зависимые киназы ERK1/2, отметим, что во всех исследованных нами структурах мозга максимумы активности данных киназ приходятся на 1.5 ч после введения препарата. Обращает на себя внимание различия *содержания pERK1 и pERK2 в исследованных структурах. Так, в стриатуме и гипоталамусе* наиболее значимые изменения уровня pERK2 отмечены через 1.5 ч *после* введения ладастена. Это может быть связано с селективной регуляцией фосфорилирования данной изоформы ПКС и рецепторами глутамата (English et al., 1993, 1997). Существует также гипотеза, согласно которой, селективная регуляция pERK может определяться присутствием scaffolding белков,

обеспечивающих локальную пространственную специфичность (Zanke et al., 1996). Отметим также, что в гиппокампе повышенное содержание обеих форм pERK поддерживается на протяжении всего периода наблюдений, так же как и pCaMKII. Эти данные представляют интерес также и в связи с раскрытием механизмов индукции и поддержания долговременной потенциации в гиппокампе при действии ладастена.

Таким образом, изложенный выше материал свидетельствует о том, что в передаче внутриклеточных сигналов, индуцированных ладастеном, участвуют цАМФ- Ca^{2+}- и митогензависимые сигнальные системы, взаимодействующие как на уровне регуляции активности друг друга, так и посредством координированного влияния на биохимические процессы, происходящие в клетке

3. Влияние ладастена на ДНК-связывающую активность транскрипционных факторов.

Известно, что одним из эффектов активированных протеинкиназ различных сигнальных каскадов является фосфорилирование определенных транскрипционных факторов (ТФ), регулирующих далее экспрессию генов-мишеней. С целью идентификации ТФ, активируемых сигнальными каскадами, нами была проведена гибридизация с помощью коммерческого набора "TranSignal™ Protein/DNA Arrays II" (Panomix Inc., США), позволяющего оценить функциональное состояние 96 ТФ одновременно. Нами идентифицированы 6 ТФ, позитивно регулируемых ладастеном (ADR1, HFH-8, HBS/xbp1, Pax4, Pax2, SAA) и 9 ТФ, ДНК – связывающая активность которых ингибирована (Freac-4, FKHR, GATA-4, MEF-3, MT-Box, Nkx-2.5, PPARa, ZID, NPAS2).

ADR1- фактор, фосфорилируемый цАМФ-зависимыми ПК, регулирует экспрессию гена алкогольдегидрогеназы 2 и ряда генов, участвующих в биогенезе и функционировании пероксисом (Taylor et al., 1990). HFH8 (*forkhead box F1a*) – транскрипционный фактор семейства Forkhead, участвующий в контроле ранних стадий эмбрионального развития. Последовательности, специфичные для HFH8 обнаружены в промоторах генов раннего нейрогенеза, а также $Д_2$–рецепторов дофамина, нейрональной ацетилхолинэстеразы, β-рецептора ретиноевой кислоты. Недавно показано наличие сайта связывания для HSH-8 в промоторе гена *oct2*, кодирующего белок нейронального переносчика моноаминов в клетках мозга (Granadino et al., 2000). HBS (*HIF binding sequence*) – фактор, связывающийся с промоторными последовательностями многих индуцируемых гипоксией или NO генов (VEGF, переносчик глюкозы, эритропоэтин и др.) Регуляция HBS-опосредуемого пути активации генов ангиогенеза, энергетического метаболизма, нейротрофических факторов и цитокинов, играющих важную роль в механизмах нейропротекции, представляет интерес с точки зрения новых мишеней терапевтического воздействия при некоторых неврологических заболеваниях (Aitola, 2002). Данный транскрипционный фактор

регулируется МАП-киназным сигнальным каскадом, а также протеинканазами класса В, активируемыми факторами роста, цитокинами и клеточным стрессом (Tan et al., 1998; Kops 2000). SAA – регуляторный элемент гена предшественника β-амилоидного белка, который в норме участвует в организации межнейрональных контактов и играет важную роль в патогенезе болезни Альцгеймера. SAA последовательность содержит сайты связывания транскрипционных факторов Sp-1, AP-4, USF, AP-1 (Hoffman,1995).

Полученные нами данные о транскрипционных факторах и регуляторных последовательностях, ДНК-связывающая активность которых регулируется при активации систем внутриклеточного сигналинга в ответ на действие ладастена, позволяет углубить представления о путях передачи сигнала и механизмах их реализации, а также о потенциальных генах-мишенях препарата.

4. Дифференциальная экспрессия генов и белков в клетках головного мозга крыс под действием ладастена

В настоящее время на ранних этапах разработки лекарств, а также при углубленном изучении механизмов действия как новых, так и хорошо известных лекарственных средств широко применяются различные методы анализа функционального состояния потенциальных биологических мишеней – генов и кодируемых им белков (Collins, 1999; Luo et al., 2001; Marcotte et al., 2001). Различные биочипы, количественная ОТ-ПЦР в режиме реального времени, 2D-электрофорез белков и другие методы анализа дифференциально экспрессирующихся генов и белков являются стандартными инструментами поиска, идентификации и последующей валидации генов и белков, ассоциированных как с терапевтическими, так и с возможными побочными эффектами лекарственных средств. В соответствии с целями исследования нами был проведен поиск генов и белков, изменяющих свое функциональное состояние под действием ладастена

4.1. Анализ дифференциальной экспрессии генов в клетках головного мозга крыс при однократном воздействии ладастена методом гибридизации на макрочипах и ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

Поиск генов, дифференциально экспрессирующихся в клетках головного мозга крыс проводили через 1.5 ч после однократного введения препарата (50 мг/кг). С этой целью использовались коммерческие макрочипы "Atlas™ Rat cDNA Expression Array", “Atlas Rat 1.2 cDNA Expression Array” (BD Biosciences, США). В первом случае на каждой положительно заряженной нейлоновой мембране было иммобилизовано 588 амплифицированных фрагментов кДНК известных генов крысы, каждый из которых нанесен дважды. Во втором - 1176 фрагментов кДНК, нанесенных без повторностей.

Количественный анализ результатов 3-х гибридизаций, проведенный на макрочипах обоих форматов позволил нам выявить 15 из 588 генов и 23 из 1176 соответственно, воспроизводимо меняющих уровень экспрессии в клетках мозга крыс в ответ на однократное воздействие ладастена Выявлено усиление транскрипционной активности генов *apc, rb, tubα1, β-actin, cpg2, 140-kD ncam, rEXO70, rabphilin-3A, cell cycle progression-related protein D123, rab7, gro* (от 1.5 до 4.2 раз); и ингибирование - *hsp70, calm, plp, nse, gapdh, syn IA&IB, IIA&IIB, pmca, gat3, carb H, pkcip, bhlh, RNA polymerase I 127 kDa subunit, thymus cell surface antigen, cis-Golgi matrix protein GM130, galanin receptor 3, noggin, hypocretin (orexin) neuropeptide precursor, skeletal muscle tyrosine kinase receptor* и *emerin* (в пределах 2% - 77% от уровня контроля). Дальнейшее подтверждение данных о дифференциально экспрессирующихся генах проводили методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Данный метод позволяет провести полуколичественную оценку изменений экспрессионного статуса генов. Из 38 генов, изменения экспрессии которых были установлены на макрочипах обоих форматов, данным методом подтверждена дифференциальная экспрессия 26 генов. Применение экспрессионных кДНК-макрочипов и количественной ОТ-ПЦР позволило нам установить, что ладастен влияет на экспрессию генов структурно и функционально различных белков (табл. 1)

Гены ферментов метаболизма

Однократное введение ладастена ингибирует экспрессию генов *nse* (82% от уровня контроля) и *gapdh* (63%), кодирующих ферменты аэробного гликолиза - нейрон-специфичную енолазу [ЕС 4.2.1.11] и глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназу [ЕС 1.2.1.12]. Ладастен, как показано ранее, снижает уровень глюкозы и инсулина в крови, что, вероятно, обусловлено незначительным активирующим влиянием на симпато-адреналовую систему (Халимов и соавт., 1997). Подавление ладастеном транскрипции генов некоторых ферментов гликолитического пути может свидетельствовать об адаптивном снижении интенсивности гликолиза в ответ на уменьшение поступления глюкозы в клетки головного мозга.

Гены регуляторных нейропептидов

Карбоксипептидаза Н (CARB Н) – один из основных ферментов посттрансляционного процессинга предшественников эндогенных опиоидов (β-эндорфинов, Met- и Leu-энкефалинов) и регуляторных пептидов (адренокортикотропный гормон, вазопрессин, окситоцин, меланотропин; Akil et al., 1998). Гипоталамо–гипофизарно–кортикоадреналовая система (ГГКС) - важнейшая пептидергическая нейросекреторная система, активация которой под действием различных стрессовых факторов обеспечивает перестройку и адаптацию механизмов поддержания гомеостаза (Хайдарлиу, 1989) Обнаружено, что однократное введение ладастена приводит к длительному снижению содержания кортизола в сыворотке крови крыс (Халимов и соавт , 1997). Еще один возможный механизм регуляции активности ГГКС, частично определяющий антистрессовое действие ладастена, - его влияние на биосинтез нейропептидов Ингибирующее влияние ладастена

на экспрессию гена *carb H* (10% от контроля) может свидетельствовать об участии регуляторных пептидов в проявлении его нейротропных, иммуномодулирующих и антистрессовых активностей.

Гипокретины (орексины) – регуляторные нейропептиды, специфически экспрессирующиеся в латеральном гипоталамусе. Установлена роль этих нейропептидов в регуляции циклов сна и бодрствования, пищевого поведения, функций автономной нервной системы, стрессовых реакций (Kukkonen et al., 2002). Влияние ладастена на экспрессию гена предшественника гипокретина (32% от уровня контроля), выявленное в наших экспериментах, свидетельствует об участии данной нейропептидной регуляторной системы в механизмах стресспротекторных и, возможно, противотревожных свойств препарата. Не так давно выявлено, что дефицит орексинов, возникающий в результате дегенерации орексинергических нейронов гипоталамуса, является одним из ведущих патогенетических звеньев, ответственных за возникновение нарколепсии (Mignot, 2000). В настоящее время в качестве основных средств терапии нарколепсии используются психостимуляторы, в частности, модафинил (Saletu et al., 2005). Принимая во внимание способность ладастена оказывать влияние на ГАМК-, дофамин- и норадренергическую нейропередачу, и, вероятно, на пептидергическую систему орексинов, можно предполагать возможную эффективность ладастена при этом состоянии, что, однако, требует дополнительного изучения.

Как показывают результаты наших исследований, еще одной пептидергической системой, вовлеченной в механизмы нейротропных эффектов ладастена, является система галанина. Ладастен выраженно ингибирует экспрессию гена рецептора галанина 3 (13% от контрольных значений). Данный подтип рецептора преимущественно экспрессируется в коре, гиппокампе, миндалевидном комплексе, гипоталамусе и сопряжен с Gi/o-белками, а также с K^+-каналами, связанными с G-белками (Smith et al., 1998). Галанин – ингибиторный нейропептид, экспрессируется совместно с ингибиторными нейромедиаторами – ГАМК, нейропептидом Y, веществом Р и регулирует высвобождение ацетилхолина, норадреналина, серотонина и дофамина (Bartfai et al., 1993). Галанин проявляет широкий спектр биологической активности – участвует в регуляции пищевого поведения, болевой чувствительности, контроле высвобождения инсулина и др. Установлена роль галанина в патогенезе болезни Альцгеймера, а также в механизмах обучения и памяти (Counts et al., 2003).

Гены синаптических белков и цитоскелета

За последние годы накоплено много данных о влиянии психостимуляторов, антидепрессантов и других психоактивных веществ на структуру и активность компонентов синаптического проведения сигнала, на функциональную активность везикулярных, мембранных, транспортных и цитоскелетных белков (Berke et al., 1998). Продукт гена GAT - осуществляет обратный захват и перенос высвободившегося в синаптическую щель ГАМК, что является одним

из механизмов поддержания оптимального уровня нейромедиатора (Masson et al., 1999). Ладастен, как показано ранее, обладает анксиолитической активностью, реализация которой сопряжена преимущественно с активацией ГАМКергической нейромедиаторной системой (Середенин и др., 1999). Полученные нами данные о влиянии ладастена на обратный захват ГАМК (ингибирование гена *gat3* на 35%) согласуются с известными ранее фактами, поскольку увеличение уровня ГАМК в области $ГАМК_A$ – бензодиазепинового рецепторного комплекса повышает его связывание с бензодиазепиновым сайтом. Таким образом, *gat3* можно рассматривать как новую молекулярную мишень для ладастена.

Протеолипидный белок (PLP) - один из основных компонентов миелина (50% белка миелина; Boggs et al., 1978). PLP способствует компактизации и стабилизации миелиновой оболочки, необходимой для нормального функционирования цитоскелета аксонов (MacMillan et al., 2000). Ввиду разнообразия функций PLP сложно однозначно интерпретировать полученные нами данные о влиянии ладастена на экспрессию гена *plp* (ингибирование на 46%), однако можно предположить, что изменение его транскрипционной активности приводит к нарушению образования миелина или является неспецифической реакцией на индуцированное препаратом усиление активности нейронов. Синапсины – локализованные в пресинаптических нервных окончаниях фосфопротеины, специфически ассоциированные с внешней поверхностью мембраны синаптических везикул. Они взаимодействуют со многими белками цитоскелета и обратимо связывают синаптические везикулы с актиновыми микрофиламентами. Фосфорилирование PKA или CaMKIV и CaMKII синапсина I приводит к диссоциации тройного комплекса везикулы–синапсин I–актин, высвобождению везикул с последующим экзоцитозом нейромедиаторов и сопровождается увеличением содержания свободного синапсина I в цитозоле (Greengard et al., 1993). Нами показано, что однократное воздействие ладастена вызывает усиление фосфорилирования CaMKII в гипоталамусе и стриатуме крыс. Наблюдаемое подавление транскрипции гена *syn IA&IB* (42 % от контроля) происходит, возможно, по механизму обратной связи в ответ на повышение уровня синапсина I. Rabphillin3a и RAB7 являются представителями семейства белков малых ГТФаз (Stenmark et al., 2001), участвующих в процессах направленного перемещения и прикрепления (targeting and docking) везикул к активным зонам плазматической мембраны пресинаптического нервного окончания (Ali et al., 2005). Помимо участия в экзоцитозе, Rab белки регулируют механизмы внутриклеточного мембранного переноса, транспортируя вновь синтезированные молекулы от комплекса Гольджи к другим клеточным компартментам (Chen et al., 2001).

Таблица 1 - Гены, дифференциально экспрессирующиеся в клетках мозга крыс в ответ на однократное введение ладастена

Название гена	Уровень экспрессии ОТ-ПЦР (доверит. интервал)	*P*	Характер изменения
hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferas (hprt)	**1,000** (0,804 - 1,219)	1,000	=
adenomatosis polyposis coli protein (apc)	**2,076** (1,598 - 2,656)	0,003	↑
cytoplasmic β-actin (actin)	**1,814** (1,480 - 2,217)	0,001	↑
retinoblastoma susceptibility-associated protein (rb)	**1,754** (1,307 - 2,436)	0,001	↑
tubulin alpha-1 (tubα1)	**1,635** (1,231 - 2,295)	0,054	↑
PKC inhibitor protein-1(pkcιp)	**0,855** (0,742 - 0,985)	0,003	↓
neuron-specific enolase (nse)	**0,820** (0,617 - 1,070)	0,055	↓
plasma membrane calcium-transporting ATPa (pmca)	**0,796** (0,629 - 1,009)	0,156	↓
myelin proteolipid protein (plp)	**0,648** (0,513 - 0,821)	0,001	↓
glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (gapdh)	**0,631** (0,339 - 0,950)	0,052	↓
GABA transporter 3 (gat3)	**0,625** (0,546 - 0,725)	0,001	↓
synapsins 1A&1B (syn1A&1B)	**0,440** (0,335 - 0,574)	0,001	↓
carboxypeptidase H (carb h)	**0,095** (0,079 - 0,109)	0,001	↓
cell cycle progression-related protein D123	**4,502** (3,402 - 6,083)	0,001	↑
rabphilin-3A	**2,547** (2,118 - 3,135)	0,001	↑
rEXO70	**2,542** (2,229 - 2,875)	0,001	↑
CPG2 protein (cpg2)	**1,862** (1,506 - 2,334)	0,001	↑
RAB7/ member RAS oncogene family	**1,479** (1,206 - 1,873)	0,028	↑
140-kD NCAM polypeptide (140-ncam)	**1,455** (1,163 - 1,736)	0,001	↑
gro	**1,308** (0,946 - 2,037)	0,098	↑
thymus cell surface antigen	**0,872** (0,741 - 1,028)	0,222	↓
emerin	**0,681** (0,586 - 0,782)	0,002	↓
basic helix-loop-helix transcription factor (bhlh)	**0,580** (0,415 - 0,800)	0,056	↓
RNA polymerase I 127 kDa subunit	**0,442** (0,325 - 0,567)	0,001	↓
noggin	**0,345** (0,275 - 0,448)	0,001	↓
hypocretin neuropeptide precursor	**0,32** (0,29 - 0,36)	0,001	↓
galanin receptor 3	**0,136** (0,112 - 0,169)	0,001	↓

Статистически значимые различия в экспрессии генов при $p<0,05$ ↑ и ↓ - повышение и понижение экспрессии, соответственно.

Полученные нами данные позволяют предположить, что ладастен оказывает влияние на процессы аксонального транспорта и экзоцитоза везикул, о чем свидетельствует воздействие препарата на транскрипционную активность генов *rEXO70* (увеличение уровня мРНК в 2.5 раза), *rabphilin-3A* (индукция в 2.5 раза), *rab7* (увеличение в 1.5 раза) Влияние ладастена на экспрессию генов *rEXO70, rabphilin-3A*, *rab7* позволяет раскрыть детали механизмов действия препарата на различные этапы процесса синаптической нейропередачи (экзоцитоза, мембранного транспорта) и вносят вклад в понимание молекулярных основ мембранотропных свойств препарата. В ряде работ показано, что общими мишенями для соединений, индуцирующих нейрональную активность, служат гены структурных белков цитоскелета (Freeman et al., 2002, Sokolov et al., 2003, Jayanthi et al., 2002; Freeman et al., 2001). Увеличение транскрипционной активности генов тубулина (в 1.6 раза) и актина (в 1.8 раза) под действием ладастена свидетельствует, вероятно, об адаптивных изменениях структурных элементов клетки, что является проявлением феномена синаптической пластичности.

Гены компонентов сигнальных путей

Выше было показано участие cAMP-, Ca^{2+}-фосфолипид- и Ca^{2+}/кальмодулин-зависимых сигнальных систем в проявлении активностей ладастена. В данной серии экспериментов нами установлено изменение под действием ладастена экспрессии генов *pmca* (80% от значений контроля) и *pkcip* (85%). Ген *pkcip* кодирует специфический белковый ингибитор ПКС, модулирующий ее активность. Белок PKCIP связывает фосфорилированные белки-мишени, действуя как адапторный белок компонентов сигнальных путей, и препятствует их прямому взаимодействию друг с другом (Yaffe, 2002). Ca^{2+}-АТРаза плазматических мембран (PMCA) - интегральный компонент системы, контролирующей уровень Ca^{2+}в нейронах. PMCA играет ключевую роль в восстановлении базального уровня Ca^{2+} в цитоплазме после воздействия стимулов, вызывающих приток Ca^{2+} в клетку (Carafoli, 2002). Нами обнаружено резкое увеличение активности в клетках мозга Ca^{2+}-АТРазы через 0.5 ч после введения ладастена и постепенное снижение активности фермента в течение следующих 1.5 ч (рис. 4). Подавление транскрипции гена *pmca* происходит, вероятно, в ответ на избыточную активацию Ca^{2+}-АТРазы по механизму обратной связи

Гены нейротрофинов

Принимая во внимание полученные нами данные о вовлечении МАП-зависимых протеинкиназ в опосредовании эффектов ладастена, а также существующие в настоящее время представления о нейротрофинах, как о ключевых молекулах, участвующих в процессах поддержания жизнеспособности нейронов, формирования кратко- и долговременных адаптаций синаптических функций в ответ на различные воздействия, нами было изучено влияние ладастена на экспрессию генов *bdnf* и *ngf* в гипоталамусе, гиппокампе и стриатуме крыс. Данные, представленные на рис. 10 показывают, что однократное введение ладастена существенного

влияния на уровень мРНК *bdnf* и *ngf* в гипоталамусе и гиппокампе не оказывает. Тогда как в стриатуме отмечено ингибирование транскрипционной активности исследуемых генов через 30 мин. Через 1.5 ч в стриатуме уровень мРНК *ngf* остается приблизительно на том же уровне, а *bdnf* – увеличивается в 2 раза.

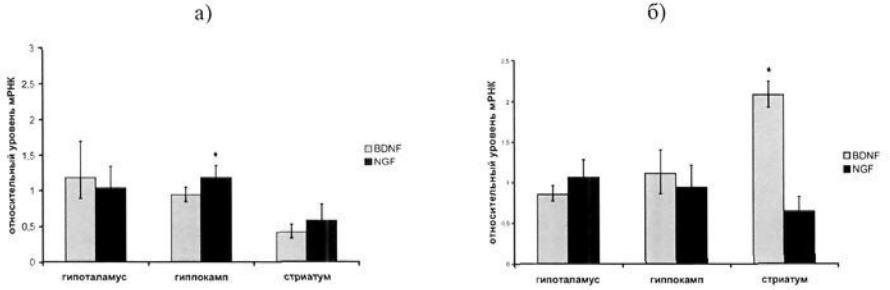


Рис. 10. Влияние ладастена на уровень мРНК *bdnf* и *ngf* в различных структурах головного мозга крыс через 0.5 (а) и 1.5 (б) часа после введения ладастена

Обращает на себя внимание синхронная динамика активации pERK1/2 и экспрессии гена *bdnf* в стриатуме, что подтверждает наше предположение о зависимой от ростовых факторов индукции МАП-зависимого сигнального каскада под действием ладастена (см. рис. 8), по крайней мере, в этой структуре. Полученные нами данные о способности ладастена позитивно регулировать экспрессию генов нейротрофинов могут служить дополнительным аргументом в пользу новых перспектив клинического использования препарата, в частности в терапии ряда нейродегенеративных заболеваний, а также вносят вклад в понимание механизмов реализации его психотропных свойств.

Следует отметить, что лишь часть идентифицированных нами генов может рассматриваться в качестве фармакологически значимых мишеней ладастена (*gat3*, *carb H, hypocretin, galanin receptor3, bdnf, ngf*). Изменения активности транскрипции генов, кодирующих белки компонентов различных сигнальных путей (*pmca*, *pkcip*), структурных элементов нервных клеток (*syn IA&IB, plp, rEXO70*, *rabphilin-3A*, *rab7, actin, tubα*), ферменты (*nse, gapdh*), могут быть связаны с проявлением пластичности нейронов и отражать процессы координированной компенсаторной перестройки структурно-метаболических потребностей клеток в ответ на лекарственное воздействие.

4.2. Поиск и идентификация белков-мишеней ладастена

Как уже отмечалось выше, анализ экспрессионных профилей позволяет осуществлять поиск генов, отвечающих на лекарственный препарат, и таким образом получать представление о направлении и механизмах протекания метаболических процессов в клетке. В то же время, этот метод не лишен недостатков и основным из них является ограниченность числа генов, фрагменты

которых иммобилизованы на чипах. С другой стороны, в ряде случаев отмечено отсутствие прямой корреляции между уровнем транскрипционной активности какого-либо гена и уровнем биосинтеза кодируемого им белка. Информация о спектре белков, дифференциально экспрессирующихся при действии лекарств, позволяет говорить о собственно мишенях лекарственного воздействия. В связи с этим, нами с использованием 2D - электрофореза и MALDI-TOF-масс-спектрометрии проведен поиск и идентификация белков в клетках головного мозга крыс через 1.5 ч после однократного введения ладастена. Выявлено 14 белков, различающихся по уровню их экспрессии, которые условно можно подразделить на следующие функциональные группы. белки-ферменты гликолитического метаболизма; стрессовые белки и белки-шапероны; защитные белки, синаптические белки (табл. 2).

Установлено увеличение экспрессии ряда белков-шаперонов – proteasome 26S ATPase subunit 4 (139%), hypoxia up-regulated 1 (163% от контроля), heat shock 70kD protein 5 (122%), valosin-containing protein (122%) – которые осуществляют селективную деградацию белков, участвуют в фолдинге белков, выполняют транспортные функции (Dai et al., 2001; Calabrese et al., 2002; Stacchiotti et al., 1997; Wynn et al., 1994). Выявленное ранее защитное действие ладастена на клетки при интенсивных физических нагрузках (Морозов и др., 1993) может быть обусловлено вовлечением стрессовых белков в механизмы цитопротективного эффекта препарата. Незначительное ингибирование экспрессии ферментов гликолиза - fructose-bisphosphate aldolase A (90% от контроля) и glyceraldehyde 3-phosphate-dehydrogenase (79%), вероятно, свидетельствует о снижении гликолиза в клетках мозга при действии ладастена. Увеличение экспрессии синаптических белков – tubulin (151%), alpha-internexin (129%), нейронального белка промежуточных филаментов, clathrin light chain A (158%;- основной компонент окаймленных пузырьков, участвующих в эндоцитозе и осуществляющих транспорт между аппаратом Гольджи, лизосомами, эндосомами и цитоплазматической мембраной, Pearse et al., 1975); collapsin response mediator protein 2 (125%, участвует в механизмах увеличения конусов роста аксона, ассоциации микротрубочек; ассоциирован с патогенезом болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных заболеваний, Gu et al., 2000, Yoshida et al., 1998; Inagaki et al., 2001); neuronal protein 22 (38%, взаимодействует с элементами цитоскелета, Depaz et al., 2005) – вероятно, сопряжено с морфологическими и пластическими адаптивными изменениями в клетках, увеличением интенсивности процессов экзо- и эндоцитоза в ответ на усиление нейрональной активности, индуцированной ладастеном.

Таблица 2 - Протеомный анализ белков головного мозга крыс при однократном внутрижелудочном введении ладастена

Название белка	Молекулярная масса, Da	Изоэлектрическая точка, Pi	Уровень экспрессии ± стантд. отклонение	*p*
Hypoxia up-regulated 1	111220	5,11	**1,633±0,04**	0,102
Clathrin light chain A	26964	4,41	**1,582±0,034**	0,124
Tubulin alpha 6	63023	5,86	**1,513±0,038**	0,163
Proteasome 26S ATPase subunit 4	47379	5,09	**1,391±0,030**	0,079
Alpha-internexin (Alpha-Inx)	56082	5,2	**1,296±0,092**	0,052
Dihydropyrimidinase-like 2	62239	5,95	**1,233±0,016**	0,033
Heat shock 70kD protein 5	72302	4,7	**1,226±0,032**	0,046
Valosin-containing protein	89293	5,14	**1,226±0,028**	0,061
Fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13) A	39235	8,31	**0,900±0,411**	0,096
Glyceraldehyde 3-phosphate-dehydrogenase	35813	8,26	**0,799±0,036**	0,117
Glycoprotein Ib (platelet)	43892	6,34	**0,764±0,038**	0,054
Similar to CCT (chaperonin containing TCP-1) epsilon subunit	69428	6,70	**0,625±0,029**	0,078
Similar to Electron transfer flavoprotein alpha-subunit	34929	8,62	**0,490±0,050**	0,114
Neuronal protein 22	22486	6,84	**0,387±0,043**	0,069

Статистически значимые различия в экспрессии белков при $p<0.05$.

5. Экспрессия гена тирозингидроксилазы в разных структурах головного мозга крыс под действием ладастена и механизмы его регуляции

Как уже отмечалось выше, ладастен, наряду с другими веществами, проявляющими психостимулирующую активность, обладает способностью увеличивать содержание нейромедиаторов – дофамина (ДА) и серотонина преимущественно в лимбических структурах мозга (во фронтальной коре, гиппокампе, гипоталамусе), стимулировать высвобождение дофамина из пресинаптических терминалей стриатума (Кудрин и соавт., 1995; Грехова и соавт., 1995) и ингибировать обратный захват дофамина, норадреналина и серотонина изолированными синаптосомами головного мозга крыс (Морозов и соавт., 1999). Предположения о способности ладастена активировать биосинтез нейромедиатора подтвердились в экспериментах с блокадой ДОФА-декарбоксилазы специфическим ингибитором 3-оксибензгидразином. Было установлено, что ладастен в условиях ингибирования ДОФА-декарбоксилазы способствует накоплению в

стриатуме и фронтальной коре L-ДОФА, что может быть следствием прямого влияния препарата на биосинтез и/или активность тирозингидроксилазы в клетках мозга (Lapa et al., 2005).

5.1. Влияние ладастена на экспрессию гена и белка тирозингидроксилазы и содержание дофамина в различных структурах головного мозга крыс

Как известно, в вентральной области покрышки сконцентрированы тела дофаминергических нейронов, дающих проекции в вентральный стриатум, в том числе в прилежащее ядро, гиппокамп, лобную кору, гипоталамус, миндалину и другие структуры лимбической системы мозга. Это определяет широкие функции мезолимбической системы – участие в механизмах формирования памяти, эмоций, обучения, нейроэндокринной регуляции. Кроме того, ДА нейроны мезолимбической системы мозга являются нейрохимическим субстратом подкрепления и "награды", а также вовлекаются в механизмы действия многих психостимулирующих веществ и определяют их аддиктивный потенциал (Robinson et al., 1993; Di Chiara, 1995). Принимая во внимание данные психофармакологических и нейрохимических исследований ладастена нами был проанализирован ряд параметров, характеризующих динамику состояния системы биосинтеза катехоламинов при однократном введении препарата, а именно - содержание L-ДОФА и дофамина, оценка экспрессии гена и белка тирозингидроксилазы (ТГ) в вентральной области покрышки, прилежащем ядре, гипоталамусе, стриатуме, и гиппокампе крыс.

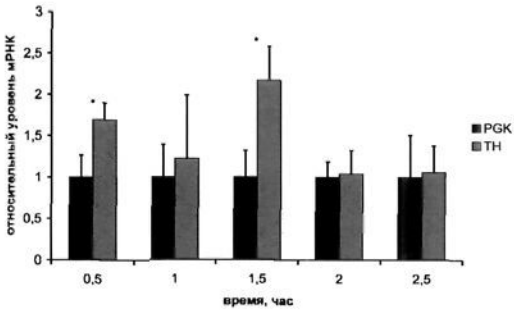


Рис. 11. Влияние ладастена на уровень экспрессии мРНК гена тирозингидроксилазы в вентральной области покрышки. Уровень мРНК гена ТГ показан относительно уровня мРНК гена «домашнего хозяйства» PGK.

Наши исследования выявили определенную специфичность влияния ладастена на динамику экспрессии гена и белка ТГ, а также накопление L-ДОФА и ДА в зависимости от отдела мозга. Так, однократное введение ладастена вызывает быстрое (уже через 30 мин) увеличение уровня мРНК гена *ТГ* в вентральной области покрышки. Как видно из рис. 11., максимальный уровень мРНК гена *ТГ* отмечается через 1.5. ч после введения препарата. Обращает на себя внимание быстрота и длительность ответа данного гена на воздействие ладастена, что, вероятно, свидетельствует об индукции *de novo* транскрипции гена *ТГ* в данной структуре мозга. Содержание L-ДОФА и ДА изучали в прилежащем ядре, где локализованы терминали ДА-содержащих нейронов, проецирующихся из вентральной области покрышки. Данные,

представленные на рис. 12 показывают, что уровень дофамина в этой структуре увеличивается уже через 1 ч после введения ладастена и достигает максимальных значений через 2 ч. Иная динамика накопления отмечена для L-ДОФА: через 2 ч после введения препарата наблюдается значительное возрастание уровня L-ДОФА, сохраняющееся на высоком уровне и через 2.5 ч.

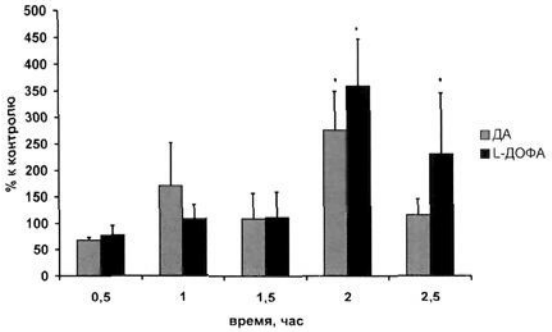


Рис. 12. Влияние ладастена на содержание ДА и L-ДОФА в прилежащем ядре.

Таким образом, ладастен при однократном введении увеличивает уровень мРНК *ТГ* в вентральной области покрышки, и это коррелирует с динамикой накопления L-ДОФА и ДА в прилежащем ядре и максимумом проявлений поведенческих эффектов ладастена. Отметим, что способность ладастена оказывать позитивное влияние на ДА нейропередачу именно в вентральной области покрышки - прилежащем ядре подтверждает наличие выраженных психостимулирующих свойств препарата. В то же время, способность индуцировать *de novo* биосинтез катехоламинов, детектируемый по накоплению L-ДОФА, определяет "неистощающий" тип действия ладастена, выгодно отличающий препарат от "классических" психостимуляторов.

Как показывают результаты наших исследований, однократное введение ладастена сопровождается изменениями уровня L-ДОФА и дофамина в гипоталамусе (рис. 13а). Как видно из рис. 13б, в клетках гипоталамуса индуцируемые ладастеном изменения уровня мРНК гена и белка ТГ имеют линейный характер, достигая максимума к 2 ч после однократного воздействия препарата, и коррелируют с содержанием продукта реакции - L-ДОФА. Как известно, отдельные популяции ДА-содержащих нейронов гипоталамуса опосредуют центральную регуляцию поведенческих и эндокринных функций за счет ко-локализации с клетками, продуцирующими нейрорегуляторные пептиды (Maurer et al. 1997). Таким образом, активация ладастеном синтеза *дофамина в гипоталамусе, выполняющего роль нейромедиатора, нейромодулятора и* нейрогормона в этой структуре, может, по крайней мере, частично, обуславливать опосредованную ДА-нейронами регуляцию нейроэндокринных функций и, как следствие, реализацию стресспротекторных, метаболических, иммуномодулирующих эффектов препарата.

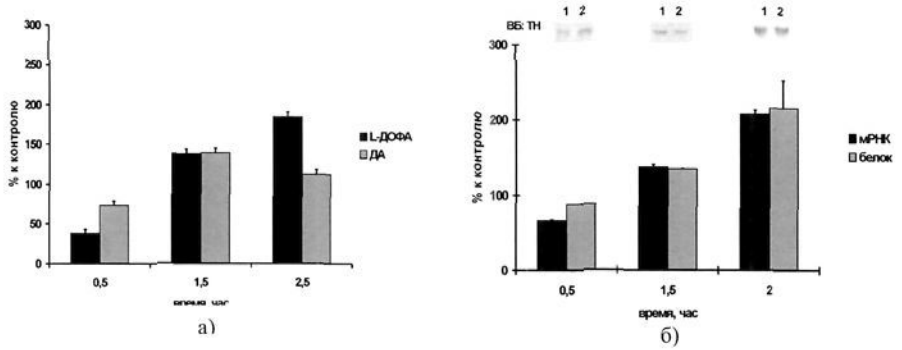


Рис. 13. Влияние ладастена на содержание в гипоталамусе крыс: а) L-ДОФА и дофамина, б) на экспрессию гена и уровень белка тирозингидроксилазы. ВБ – вестерн-блот, 1 - контроль, 2 - опыт.

В стриатуме через 0.5 ч после воздействия уровень ДА и в большей степени L-ДОФА значительно снижается (рис. 14а). Однако, к 2 - 2.5 ч содержание L-ДОФА увеличивается почти в два раза. Влияние ладастена на экспрессию гена и белка ТГ в стриатуме представлено на рис. 14б. Через 0.5 ч уровень мРНК гена *ТГ* значительно ингибирован (20%) и сохраняется приблизительно на том же уровне до 1.5 ч наблюдений (33% от уровня контрольных значений). Интересно, что в стриатуме ладастен во всех исследованных промежутках времени не оказывает влияния на содержание белка ТГ. Ранее было показано, что ладастен длительно стимулирует высвобождения ДА из дорсального стриатума крыс (Грехова и соавт., 1995). Подобный эффект является характерным для психостимуляторов типа кокаина, амфетамина и ряда его производных, вызывающих усиление высвобождения ДА в стриатуме, сопровождающееся истощением внутриклеточного пула нейромедиатора (Shishido et al., 1997). Способность ладастена стимулировать накопление L-ДОФА в стриатуме и других исследованных структурах мозга крыс может свидетельствовать в пользу потенциальной противопаркинсонической активности препарата, направленной на основное патогенетическое звено паркинсонизма.

Как следует из рис. 15а, в гиппокампе содержание и L-ДОФА и ДА через 1.5 ч после введения ладастена увеличивается почти в 3 раза, и практически не изменяется во всех остальных исследованных временных промежутках. Как следует из рис. 15б, существенных изменений уровня мРНК *ТГ* в данной структуре под действием ладастена не выявляется: во всех исследованных временных интервалах данный показатель находится на уровне контрольных значений. Что касается влияния препарата на изменение содержания белка ТГ в гиппокампе, то, небольшое повышение данного показателя отмечается через 0.5 ч, и более значительное - через 1.5 ч после введения ладастена.

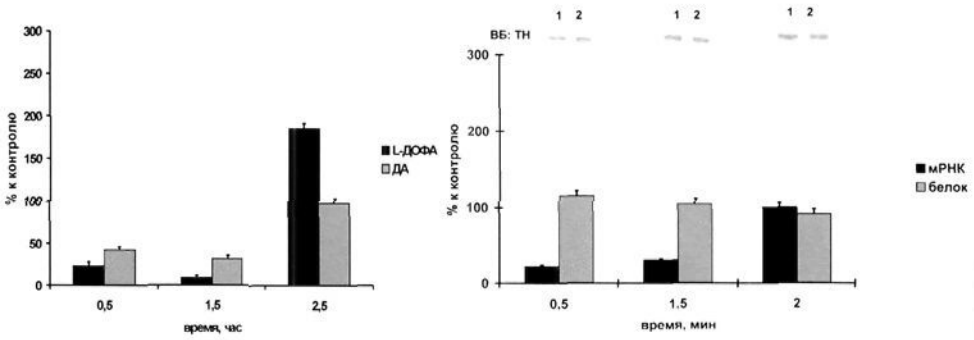


Рис. 14. Влияние ладастена на содержание в стриатуме крыс: а) L-ДОФА и дофамина, б) на экспрессию гена и уровень белка тирозингидроксилазы. ВБ – вестерн-блот, 1 - контроль, 2 - опыт.

Увеличение уровня L-ДОФА и ДА в этой структуре требует дополнительного внимания, поскольку известно, что дофаминергические нейроны гиппокампа вовлекаются в процессы консолидации памяти, что продемонстрировано многими исследователями на *in vivo* и *in vitro* моделях долговременной потенциации (Frey et al., 1990, 1991).

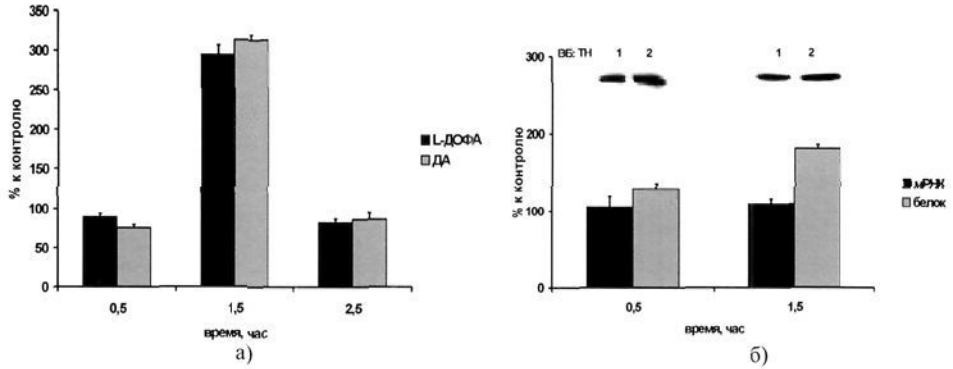


Рис. 15. Влияние ладастена на содержание в гиппокампе крыс: а) L-ДОФА и дофамина, б) на экспрессию гена и уровень белка тирозингидроксилазы. ВБ – вестерн-блот, 1 - контроль, 2 - опыт.

5.2. Влияние ладастена на характер метилирования остатков цитозина в промоторной области гена тирозингидроксилазы в клетках гипоталамуса головного мозга крыс

Несмотря на то, что к настоящему времени механизмы тканеспецифической регуляции экспрессии гена *TH* достаточно полно и подробно исследованы, немногое известно о роли

эпигенетических механизмов в регуляции экспрессии данного гена. В качестве одного из возможных механизмов, обуславливающих изменение транскрипционной активности гена *TT* под действием исследуемого нами препарата мы предположили возможность его влияния на характер метилирования цитозина в CpG-динуклеотидах в промоторной его области. Анализ эффектов ладастена (однократное внутрижелудочное введение, декапитация через 1.5 ч) на характер метилирования цитозинов в 5′-фланкирующей области гена *TT*, экспрессирующегося в клетках гипоталамуса, проводили методом бисульфитного секвенирования. Этот метод позволяет определять статус метилирования всех CpG-динуклеотидов в исследуемом фрагменте ДНК.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что ладастен при однократном введении экспериментальным животным вызывает изменение характера метилирования CpG-динуклеотидов, локализованных в 5'-фланкирующей области гена *TT* в клетках гипоталамуса головного мозга крыс. Оно проявляется в увеличении частоты деметилирования остатков цитозина в последовательностях, расположенных непосредственно в сайтах связывания транскрипционных факторов AP-2 (в позиции -218), Egr-1/Sp-1 (-117), CRE-1 (-43), CRE-2 (-95) или в непосредственной близости от них – AP-2 (-228, -225), HEPT (-156, -143, -140), Egr-1/Sp-1 (-134), AP-1-CRE-1 enhancer element (-19, -8) (рис. 16). Как показывают результаты наших исследований, в опытном варианте частота метилирования цитозина в позиции -43 CRE-1-элемента снижена почти в 2 раза по сравнению с контролем, тогда как остаток цитозина в позиции -95, расположенный в сайте CRE-2, деметилирован в меньшей степени. Можно предположить, что наблюдаемое нами усиление транскрипционной активности гена *TT* в клетках гипоталамуса, по крайней мере, частично ассоциировано с процессами метилирования/деметилирования цитозинов CRE-последовательности промоторной области данного гена. Нами также установлено, что ладастен индуцирует деметилирование цитозина в положении -218, локализованного непосредственно в последовательности AP-2, и 2-х цитозинов в позициях -228 и -225, прилегающих к сайту связывания данного транскрипционного фактора.

Таким образом, полученный нами экспериментальный материал, в совокупности с известными литературными данными, позволяет предположить, что усиление активности транскрипции гена *TT* в клетках гипоталамуса головного мозга крыс при введении ладастена может быть связано с избирательным деметилированием цитозина в CpG-динуклеотидах в сайтах связывания отдельных транскрипционных факторов или в прилегающих к ним последовательностях.

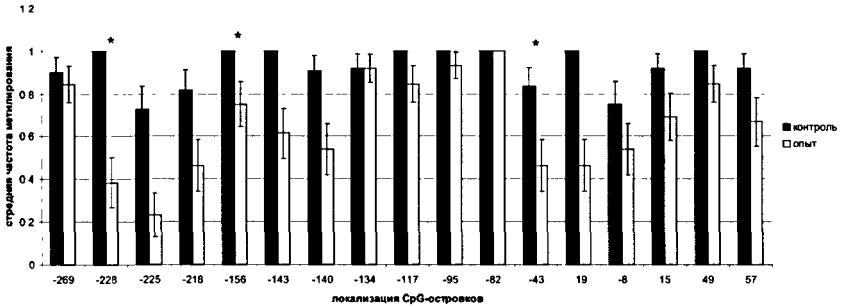


Рис 16 Диаграмма частоты метилирования 376 п.о. 5'фланкирующего региона гена тирозингидроксилазы(-292 - +84) гипоталамуса мозга крыс Данные представлены в виде средней частоты метилирования каждого CpG-динуклеотида ± стандартная ошибка Звездочками отмечены достоверные различия Достоверность рассчитывали с помощью точного двустороннего критерия Фишера ($p \leq 0,05$).

5.3. Влияние ладастена на уровень гистондеацетилаз в различных структурах мозга крыс

Как известно, с метилированными цитозинами в составе CG-динуклеотидов взаимодействует ряд метил-связывающих белков, например, MeCP2, MBD1, которые мобилизуют белковые комплексы, способные ковалентно модифицировать гистоны (гистонацетилазы/гистондеацетилы, HAT/HDAC), и ферменты ремоделинга хроматина (например, семейства SWI/SNF), изменяющие структуру нуклеосом (Fischle et al., 2003). Согласно существующим представлениям, биохимическая модификация гистонов и локальный ремоделинг хроматина являются важными факторами, модулирующими экспрессию генов, в частности путем регуляции доступности транскрипционных факторов (Felsenfeld et al., 2003). HDAC осуществляют деацетилирование гистонов H3 и H4 по остаткам лизина, и эта модификация сопряжена с ингибированием транскрипции определенных генов. Не так давно стали появляться сведения, указывающие на то, что некоторые психотропные средства (кокаин, вальпроевая кислота, антидепрессанты) обладают способностью модифицировать гистоны в области промоторов генов-мишеней (Kumar et al., 2005; Newton and Duman, 2006).

Нами исследовано однократное влияние ладастена на динамику уровня HDAC1 в гипоталамусе, гиппокампе и стриатуме крыс. Установлено, что наиболее выраженные изменения уровня HDAC1 на фоне ладастена имеют место в стриатуме – на протяжении всего периода наблюдений отмечается снижение уровня этого фермента (рис. 17). Снижение уровня гистондеацетилаз, как известно, сопровождается гиперацетилированием гистонов и, как следствие, активацией транскрипции. Полученные нами данные дают основание предполагать, что контроль на уровне структуры хроматина играет важную роль в механизмах индуцируемых ладастеном изменений транскрипционной активности многих генов-мишеней в клетках мозга.

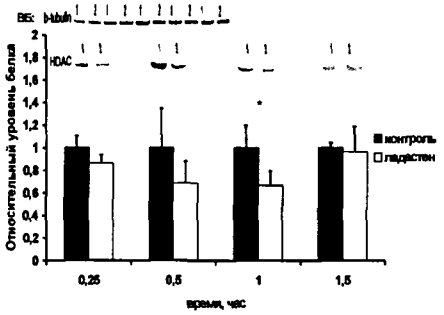


Рис. 17. Уровень белка HDAC1 в клетках стриатума крыс после однократного внутрижелудочного введения ладастена (50 мг/кг, в % к контролю). Нормализацию проводили по уровню белка b-tubulin в тех же образцах. ВБ – вестерн-блот; 1-контроль, 2 – опыт.

6. Влияние ладастена на синаптическую пластичность в гиппокампе

В настоящее время феномен долговременной потенциации (LTP) в гиппокампе является интенсивно изучаемой экспериментальной моделью процессов пластичности, зависящей от активности и имеющей, возможно, отношение к механизмам научения и памяти. Нами совместно с отделом нейрофизиологии Института Нейробиологии им. Лейбница (Магдебург, Германия) проведено изучение возможного влияния ладастена на индукцию и поддержание синаптической пластичности в гиппокампе на модели LTP. Изучен также механизм опосредуемой ладастеном трансформации кратковременной потенциации в долговременную.

Показано, что ладастен усиливает кратковременную потенциацию в области гиппокампа CA1 и поддерживает ее в течение последующих 6-х часов, а также способствует переходу ранней фазы LTP в позднюю – собственно долговременную потенциацию (рис. 18а).

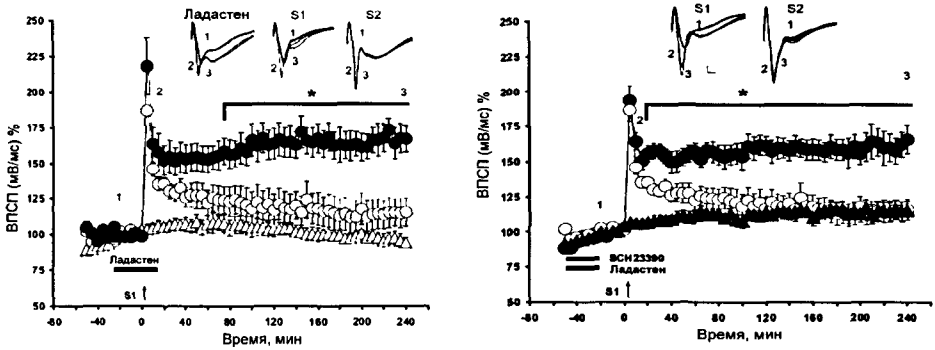


Рис 18. 18(а) - Индукция кратковременной потенциации (0 02% ДМСО) полевых возбуждающих постсинаптических потенциалов (n=10, S1 – серые круги), которая снижается до базального уровня в течение 40 мин (S2 – серые треугольники). Введение ладастена (10 микроМ) во время тетанизации способствует переходу кратковременной потенциации в долговременную (n=8, черные круги). 18(б) - Совместное введение ладастена и SCH 23390 (1 микроМ) способствует трансформации кратковременной потенциации в долговременную (n=9; S1- черные круги; S2 – черные треугольники)

Как известно, переход кратковременной фазы потенциации в долговременную является процессом, зависимым от *de novo* синтеза мРНК и белков. В серии экспериментов с ингибитором трансляции анизомицином продемонстрировано ингибирование продолжительного стимулирующего эффекта ладастена на LTP. Далее установлено также, что эффекты ладастена на кратко- и долговременную потенциацию в гиппокампе являются также дофаминзависимыми и опосредованы непрямой активацией Д1/Д5-подтипа рецепторов дофамина, что показано в экспериментах с антагонистом данного подтипа дофаминовых рецепторов (рис. 18б).

Эти данные представляют интерес в связи с раскрытием механизмов синаптической пластичности в ответ на лекарство – а именно способность усиливать и длительно поддерживать высокий уровень синаптической эффективности клеток, а также в связи с прикладными аспектами – возможного использования препарата при заболеваниях или состояниях, сопровождающихся нарушениями памяти или способности к обучению.

7. Механизмы иммунотропной активности ладастена

7.1.Влияние ладастена на пролиферативную активность и апоптотическую реактивность Т-лимфоцитов

Ценным свойством ладастена является иммуномодулирующая активность, проявляющаяся в том числе и при возникших в результате стрессовых воздействий иммунодефицитных состояний. Механизм иммуномодулирующего действия ладастена недостаточно изучен и, вероятно, связан как с нормализацией психонейроэндокринной регуляции иммунных функций, так и с прямым воздействием на иммунокомпетентные клетки В рамках изучения механизмов реализации иммуномодулирующих свойств ладастена нами исследовано влияние препарата на: (а) пролиферативную активность и апоптоз стимулированных антиCD3 моноклональными антителами (МКА) Т-лимфоцитов периферической крови здоровых доноров, (б) экспрессию основных белков – регуляторов апоптоза, (в) чувствительность активированных Т-лимфоцитов к нерецепторно-индуцированному апоптозу Показано, что в диапазоне концентраций 0.1 – 1 μM ладастен проявлял комитогенный эффект, не изменял активности каспазы 3 и содержания клеток, *находящихся в поздней фазе апоптоза* (окраска Hoechst 33342), *экспрессии* bcl-2, *но вызывал* тенденцию к увеличению экспрессии p53 в активированных клетках (табл. 3, 4).

Установлено также, что комитогенный эффект, более выраженный при использовании низких концентраций ладастена, сопровождался нарастанием pERK2. В зависимости от природы действующего агента и типа ткани фосфорилирование ERK1/2 может стимулировать синтез разных циклинов, которые в комплексе с циклинзависимыми киназами в конечном счете и определяют переход клеток из одной фазы в другую.

Таблица 3 - Влияние ладастена на пролиферативную активность Т-лимфоцитов периферической кровичеловека (M±m)

Условия культивирования		Жизнеспособность и пролиферативная активность в РБТЛ (n = 14)		
АнтиCD3 МКА, мкг/мл	Ладастен, μM	Жизнеспособность, %	Содержание бластных форм,%	Индекс стимуляции
-	-	96.3±0 6	1 5±0.5	
-	0 1	95 0±0 8	1 2±0 2	
-	1 0	94 2±0 9	1.5±0 3	
-	10 0	95 0±1.2	1 4±0 3	24 7±5 8
2 5	-	95 8±0 8	39 0±6 3	31.3±4 6*
2..5	0 1	95 9±0 7	49 9±5 0*	32.2±5 7*
2 5	1 0	95 2±0 9	46 5±5 9	25 3±4 4
2.5	10 0	94 0±1 3	39 4±4 7	

* значение статистически значимо (P < 0 05) отличается от соответствующей контрольной культуры Использован t- критерий Стьюдента для сопряженных признаков.

Таблица 4 - Влияние ладастена на апоптоз и экспрессию основных белков-регуляторов апоптоза в 72-часовых культурах Т-лимфоцитов периферической крови человека (M±m)

Условия культивирования		Апоптоз (n = 10)		Экспрессия основных белков – регуляторов апоптоза (n=5)	
АнтиCD3 МКА, мкг/мл	Ладастен, μM	Активность каспазы 3, ΔS/Δt	Содержание клеток с признаками фрагментации ядра, %	содержание bcl-2+ лимфоцитов, %	Содержание p53+ лимфоцитов, %
-	-	1 4±0 3			
-	0 1	1 2±0 2			
-	1 0	1 5±0 3			
-	100	1 4±0 4	90±0 6	7.8±2 4	8 5±1 9
2 5	-	6 8±2 1	97±0 9	8 1±1 2	10 8±3 1
2 5	0 1	8 2±2 2	100±1 5	6 4±2 2	11 8±2 9
2 5	1 0	8 0±1 9	100±1 6	6 5±1 5	9 3±2 5
2 5	100	7 3±2 2			

* - значение статистически значимо (P < 0 05) отличается от соответствующей контрольной культуры. Использован t- критерий Стьюдента для сопряженных признаков.

Анализируя имеющиеся в литературе сведения, а также полученные нами данные об увеличении фосфорилирования киназы ERK2 в Т-лимфоцитах под действием ладастена, можно полагать, что его комитогенный эффект, возможно, сопряжен с активацией циклинзависимой киназы Cdk 2, образующей комплексы с циклином Е – основным циклином, обеспечивающим

переход клеток из G_1 фазы в S – фазу клеточного деления. Выяснение данного вопроса требует дальнейших исследований.

Выявлено, что независимо от концентрации в культуре, ладастен обеспечивал защиту активированных лимфоцитов от апоптоза, индуцированного ингибитором топоизомеразы I камптотецином и перекисью водорода при добавлении в культуру одновременно с индуктором. В то же время, лимфоциты, культивируемые в присутствии ладастена, приобретали устойчивость к апоптозу, индуцированному перекисью водорода, но не камптотецином. Предполагается, что комитогенный эффект, сопровождаемый активацией киназ МАП-киназного каскада, и повышение резистентности активированных Т-лимфоцитов к нерецепторно-индуцированному апоптозу лежат в основе иммуномодулирующего действия препарата.

7.2. Влияние ладастена на активационно-индуцированную экспрессию FAS-рецептора на Т-лимфоцитах и их чувствительность к FAS-индуцированному апоптозу

Апоптоз Т-лимфоцитов, реализуемый через систему Fas/FasL, является ключевым механизмом удаления "невостребованных" в процессе иммунного ответа Т-клеток и регуляции их численности (Kramer, 2000; Sharma et al., 2000). Дефектность этого механизма приводит к значительным нарушениям иммунного гомеостаза. Так, недостаточная интенсивность Fas-зависимой элиминации клеток вследствие генетического дефекта Fas или FasL приводит к развитию аутоиммунных расстройств (Nagata et al., 1995), а избыточная элиминация клеток - к развитию иммунодефицитных состояний (Badley et al., 2000). Нами было изучено влияние ладастена на активационно-индуцированную экспрессию Fas-рецептора и чувствительность лимфоцитов к Fas-индуцированному апоптозу. Рис. 19 иллюстрирует экспрессию Fas-рецептора CD3+ на Т-лимфоцитах. Ладастен не изменял экспрессию Fas-рецептора в контрольных (нестимулированных) культурах. Активация Т-лимфоцитов aCD3 МКА приводила к резкому увеличению экспрессии CD95, что связано с зависимой от PKC активацией т.н. гена ассоциированного с Т-клеточной смертью (T - cell death-associated gene 51, TDAG51) (Sharma et al., 2000). Ладастен (0.1 μM) незначительно усиливал активационно - индуцированную экспрессию CD95 (статистически значимых отличий от культур лимфоцитов стимулированных aCD3 МКА без ладастена не было), что закономерно связано с более интенсивным митогенезом. Ладастен не увеличивал интенсивности активационно-индуцированной экспрессии Fas на Т-лимфоцитах, а наблюдаемое незначительное увеличение экспрессии Fas связано, вероятно, с комитогенным эффектом препарата. В то же время, ладастен снижал чувствительность клеток к Fas-индуцированному апоптозу, т.е. в условиях избыточной экзогенной активации Fas. Этот механизм может лежать в основе иммунопротективного эффекта ладастена и, скорее всего, связан с известным антиоксидантным действием препарата.

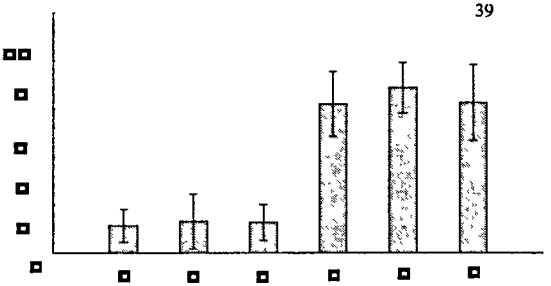


Рис 19 Влияние ладастена на активационно - индуцированную экспрессию Fas-рецептора на Т лимфоцитах в 72 – часовых культурах мононуклеаров периферической крови здоровых доноров По оси абсцисс· 1-контрольные культуры, 2-ладастен 0 1 мкМ, 3-ладастен 1.0 мкМ, 4-aCD3 МКА 2 5 мкг/мл, 5- aCD3 МКА 2 5 мкг/мл + ладастен 0 1 мкМ, 6- aCD3 МКА 2 5 мкг/мл + ладастен 1.0 мкМ. по оси ординат – относительное содержание CD3+CD95+клеток, % Результаты представлены как среднее значение (М) ± стандартное отклонение (SD)

ВЫВОДЫ

На основании совокупности результатов выполненных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Доказано участие в механизме формирования фармакологического действия ладастена при введении в дозе 50 мг/кг внутрь 4-х сигнальных систем трансдукции: цАМФ-, Ca^{2+}-фосфолипид-, Ca^{2+}/кальмодулин-зависимых и митогенактивируемых киназ. Показано, что ладастен преимущественно влияет на Ca^{2+}-зависимые системы, обеспечивая увеличение концентрации Ca^{2+} в клетках мозга и его регуляцию за счет освобождения Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума и модуляции активности Ca^{2+}-АТФазы.

2. С использованием макрочипа "TranSignal™ Protein/DNA Arrays II" идентифицированы транскрипционные факторы, изменяющие ДНК-связывающую активность при введении ладастена. Увеличение ДНК-связывающей активности выявлено для 6-ти транскрипционных факторов: ADR 1, HFH-8, HBS/xbp 1, Pax4, Pax2 SAA), а снижение для 9-ти транскрипционных факторов: Freac-4, FKHR, GATA-4, MEF-3, MT-Box, Nkx-2.5, PPARa, ZID, NPAS2.

3. Установлено, что при однократном введении внутрь в дозе 50 мг/кг ладастен в клетках головного мозга крыс вызывает изменения уровня экспрессии 26 генов, относящихся к функциональным группам онкогенов и опухолевых супрессоров (*apc, rb*), компонентов цитоскелета (*tubal, actin*), внутриклеточного сигналинга (*pkcip, pmca*), мембранных транспортеров (*gat3*), метаболизма (*gapdh, nse*), синаптических белков (*syn IAIB, plp, cpg2, rEXO70, rabphilin-3A, rab7, ncam*), ферментов, участвующие в синтезе опиоидных и других регуляторных пептидов (*carb H, hyrocretin, receptor galanin 3*), нейротрофинов (*bdnf, ngf*). Сформулированы научные положения о потенциальных фармакологически значимых мишенях ладастена: генах *carb H, hyrocretin, receptor galanin 3, gat3, bdnf, ngf*, изменения экспрессии которых сопряжены с механизмами формирования психотропных эффектов препарата.

4. Идентифицированы 14 белков головного мозга крыс, экспрессия которых изменяется при введении ладастена в дозе 50 мг/кг. В их числе – ферменты гликолитического метаболизма – fructose-bisphosphate aldolase A и glyceraldehyde 3-phosphate-dehydrogenase; белки-шапероны – proteasome 26S ATPase subunit 4, hyroxia up-regulated 1, heat shok 70kD protein 5, valosin-containing protein; транспортные, везикулярные белки и белки цитоскелета – tubulin, alpha-internexin, clathrin light chain A, collapsin response mediator protein 2, neuronal protein 22. Обоснована гипотеза об участии в механизме фармакологического действия ладастена белков-ферментов гликолитического метаболизма, collapsin response mediator protein 2, neuronal protein 22.

5. Установлено, что ладастен в дозе 50 мг/кг при однократном введении внутрь вызывает дифференциальную экспрессию гена тирозингидроксилазы в клетках вентральной области покрышки, стриатума, гипоталамуса и гиппокампа головного мозга крыс. В отдельных структурах мозга показано адекватное уровню экспрессии гена тирозингидроксилазы увеличение синтеза фермента и образование дофамина. Сформулировано научное положение о том, что синтез *de novo* дофамина опосредует механизмы психостимулирующей активности ладастена.

6. Охарактеризовано влияние ладастена на метилирование цитозина в CpG-динуклеотидах в промоторной области гена тирозингидроксилазы. Показано, что препарат вызывает селективное деметилирование цитозина в сайгах связывания отдельных транскрипционных факторов. Показано, что ладастен в дозе 50 мг/кг при однократном введении внутрь снижает уровень гистондеацетилаз (HDAC1) в стриатуме, не вызывая существенных изменений в гиппокампе и гипоталамусе.

7. В культуре клеток Т-лимфоцитов, активированных моноклональными антителами к CD3 обнаружена комитогенная активность ладастена, опосредованная увеличением уровня pERK1/2.

8. Показано, что механизм иммунопротекторного эффекта ладастена сопряжен с его способностью снижать чувствительность Т-лимфоцитов к Fas-индуцированному апоптозу.

9. Впервые показано, что ладастен оказывает влияние на синаптическую пластичность в гиппокампе, способствуя переходу кратковременной фазы потенциации в долговременную. Установлено также, что данный процесс на фоне ладастена обусловлен усилением дофаминергической нейропередачи в гиппокампе и зависит от синтеза белка *de novo*.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК

1. Середенин С.Б., Вахитова Ю.В., Вахитов В.А. Молекулярно-биологические подходы к созданию геноспецифичных фармакологических препаратов // Эксперим. и клинич. фармакология. - 2001.- № 3.- С.3-12.

2. Вахитова Ю.В., Сибиряк С.В., Курчатова Н.Н., Середенин С.Б. Влияние ладастена на пролиферативную активность и апоптоз Т-лимфоцитов периферической крови // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2002.- Т. 65, № 6. - С. 49-52.

3. Сибиряк С.В., Курчатова Н.Н., Юсупова Р.Ш., Сибиряк Д.С., Ахматова Н.К., Бикмаева А.Р., Вахитова Ю.В. Оценка индуцированного анти-CD3 мАт митогенеза и активности каспазы С как способ характеристики реактивности Т-лимфоцитов в клинических и экспериментальных исследованиях // Росс. Иммунол. Журнал. – 2002.- Т. 7, № 3. – С. 265-267.

4. Вахитова Ю.В., Салимгареева М.Х., Середенин С.Б. Влияние ладастена на активность протеинкиназы С в клетках головного мозга крыс // Эксперим. и клинич. фармакология. - 2004. - Т. 67, № 2. - С.12-15.

5. Вахитова Ю.В., Салимгареева М.Х., Середенин С.Б. Влияние ладастена на активность cAMP–зависимых протеинкиназ и фосфорилирование белков в клетках головного мозга крыс // Эксперим. и клинич. фармакология. - 2004.- Т. 67, № 3. - С. 7-9.

6. Вахитова Ю.В., Ямиданов Р.С., Середенин С.Б. Ладастен индуцирует экспрессию ге нов, регулирующих биосинтез дофамина в различных структурах мозга крыс // Эксперим. и клинич. фармакология. - 2004. - Т. 67, № 4. - С. 7-11.

7. Вахитова Ю. В., Салимгареева М. Х., Сибиряк С. В., Курчатова Н. Н., Середенин С. Б. Влияние ладастена на активационно-индуцированную экспрессию Fas – рецептора на Т-лимфоцитах и их чувствительность к Fas - индуцированному апоптозу // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2004. - Т. 67, № 5. – С. 34-38.

8. Вахитова Ю.В., Ямиданов Р.С., Вахитов В.А., Середенин С.Б. Анализ изменений экспрессии генов в головном мозге крыс после однократного воздействия производного 2-аминоадамантана с использованием кДНК макрочипов // Молекуляр. Биология. – 2005.- Т. 39, № 2. – С. 276-285.

9. Вахитова Ю.В., Ямиданов Р.С., Середенин С.Б. Влияние ладастена на экспрессию генов в мозге крыс // ДАН. - 2005. - Т. 401, № 5.- С. 692-695.

10. Вахитова Ю.В., Садовников С.В., Ямиданов Р.С., Середенин С.Б. Деметилирование остатков цитозина в промоторной области гена тирозингидроксилазы в клетках головного мозга крыс под действием производного аминоадамантана - ладастена // Генетика. – 2006.- Т. 42, № 7. – С. 968-975.

11. Mikhaylova M.G., Vakhitova J.V., Yamidanov R.S., Seredenin S.B., Behnisch T. The effects of ladasten on dopaminergic neurotransmission and hippocampal synaptic plasticity in rats // Neuropharmacology, в печати.

Материалы всероссийских и международных конференций

12. Вахитова Ю.В., Салимгареева М.Х., Хуснутдинова Э.К., Сергеева С.А., Середенин С.Б. Экспрессия гена тирозингидроксилазы в клетках мозга крыс при воздействии бромантаном // Тезисы докладов VIII Национального конгресса "Человек и лекарство". - Москва, 2001.- С. 347.

13. Вахитова Ю.В. Молекулярно-генетическое исследование аминоадамантанов // Тезисы докладов 3 Международной Конференции " Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам". - Суздаль, 2001.- С.-37.

14. Вахитова Ю.В., Сибиряк С.В. Ладастен (бромантан) оппозитно меняет реактивность лимфоцитов в зависимости от характера активирующего сигнала // Тезисы докладов 5-го конгресса "Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии". – Москва, 2002. – Т. II. – С.294.

15. Вахитова Ю.В., Салимгареева М.Х., Середенин С.Б. Влияние ладастена на активность протеинкиназ и фосфорилирование белков в клетках головного мозга крыс // Материалы 2-го Съезда Российского Научного Общества Фармакологов. - Москва, 2003. - С. 88.

16. Салимгареева М.Х., Вахитова Ю.В. Влияние ладастена на активность Ca^{2+}-фосфолипидзависимых протеинкиназ в клетках головного мозга и печени крыс // Материалы 7-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых. - Пущино, 2003. - С. 373.

17. Вахитова Ю.В., Салимгареева М.Х., Середенин С.Б. Фармакологическое действие ладастена сопряжено с активацией cAMP- и Ca^{2+}-фосфолипидзависимых сигнальных систем клетки // Материалы Международной конференции "Рецепция и внутриклеточная сигнализация". - Пущино, 2003. - С. 144-147.

18. Вахитова Ю.В., Середенин С.Б., Вахитов В.А. Молекулярные механизмы психостимулирующего и иммуномодулирующего действия производных аминоадамантана // Материалы научно-практической конференции "Проблемы создания новых лекарственных средств" – Уфа, 2003. – С. 11-12.

19. J. Vakhitova, M. Salimgareeva, R. Yamidanov, S. Seredenin. Effects of the Ladasten upon the activity cAMP- and Ca^{2+}-dependent protein kinases, expression of genes involved in dopamine biosynthesis // Europ. J. Biochem. – 2003. - V. 270, suppl. 1. - P. 139.

20. Ямиданов Р.С., Вахитова Ю.В. Поиск генов, модулируемых производными аминоадамантана // Материалы XVI зимней молодежной научной школы "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". – Москва, 2004. – С. 56.

21 Вахитова Ю.В , Сабиржанов Б Е., Ямиданов Р.С., Середенин С.Б. Гены-мишени производных аминоадамантана и регуляция их активности // Материалы III Съезда ВОГиС "Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития". – Москва, 2004. - С. 322.

22. Vakhitova Y., Sabirzhanov B., Seredenin S. Alteration of tyrosine hydroxylase gene expression in rat brain by 2-aminoadamantane compound is related to DNA methylation // The Inter. J. Neuropsychopharmacol. – 2004. – V. 7, suppl. 1. – P. S455.

23. Yamidanov R.S, Vakhitova J.V, Mikhaylova M.G, Seredenin S.B. Gene expression patterns associated with psychostimulating drug. Ladasten action in rat brain // Abstracts of 6th Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen, Germany, 2005. – P. 244.

24. Yamidanov R.S , J.V Vakhitova, S.B. Seredenin Changes in gene expression profiles in rat brain induced by ladasten // Europ. Neuropsychopharmacol. – 2005. – V. 15, suppl. 2. - S184.

25. Vakhitova J.V., Salimgareeva M.Kh , Yamidanov R.S., Seredenin S.B. Use of DNA/Protein Array for profiling transcription factors activated by aminoadamantane compound Ladasten in rat brain // Europ. Neuropsychopharmacol. – 2005. – V. 15, suppl. 2. - S172.

26. Salimgareeva M.Kh., Vakhitova J V., Seredenin S.B. Role of main pathways signal transduction involved in realization of pharmacological effects of Ladasten in rat brain // Europ. Neuropsychopharmacol. – 2005. – V. 15, suppl 2. – S185.

27. Вахитова Ю.В., Ямиданов Р.С., Садовников С.В., Салимгареева М.Х., Середенин С.Б. Геномные подходы к поиску новых терапевтических мишеней психотропных средств // "Медицинская генетика". - 2005. -Т. 4, № 4. - С. 165.

28. Вахитова Ю.В., Салимгареева М.Х., Ямиданов Р.С., Середенин С.Б. К механизмам фармакологической активности ладастена // Материалы 4-ой Международной конференции "Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам". Москва, 2006. - С. 18.

29. Ямиданов Р.С., Вахитова Ю.В., Середенин С.Б. Протеомный анализ действия психостимулятора ладастена // Материалы 4-ой Международной конференции "Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам". Москва, 2006. - С. 83-84.

30. Вахитова Ю.В., Салимгареева М.Х., Ямиданов Р.С., Середенин С.Б. Перспективные подходы поиска и идентификации биомишеней лекарственных препаратов // Материалы научно-практической конференции "Новая технологическая платформа биомедицинских исследований (биология, здравоохранение, фармация)". Ростов-на-Дону , 2006. – С. 39.

31. Садовников С.В., Вахитова Ю.В., Ямиданов Р.С. Влияние нейротропного лекарственного средства ладастена на статус метилирования CpG-динуклеотидов в промоторной области гена тирозингидроксилазы в клетках гипоталамуса головного мозга крыс // Материалы научно-практической конференции "Новая технологическая платформа биомедицинских исследований (биология, здравоохранение, фармация)". Ростов-на-Дону, 2006 – С. 21.

Формат 60x84 1/16 Бумага офсетная
Гарнитура «Таймс» Печать на ризографе
Усл -печ л 2,55 Уч -изд л 3,17
Тираж 100 экз Заказ № 15

Отпечатано на оборудовании
издательства «Гилем»
450077, г.Уфа, ул. Кирова, 15
Тел (347) 273-05-93, 272-36-82