

**УДК: 615.21**

**МЕДИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К НАПРАВЛЕННОМУ ПОИСКУ  
ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ БОЛЕЗНИ  
АЛЬЦГЕЙМЕРА.**

**С. О. Бачурин**

Институт физиологически активных веществ РАН,

142432 Черноголовка, Московская область.

Факс: 095-913-2113. Электронная почта: [bachurin@ipac.ac.ru](mailto:bachurin@ipac.ac.ru)

**Ключевые слова:** амилоид, болезнь Альцгеймера, нейропротекторы, стимуляторы когнитивных функций.

## РЕЗЮМЕ

В обзоре проведен анализ и обоснование с позиций медицинской химии принципов направленного поиска препаратов, разрабатываемых для лечения и предупреждения болезни Альцгеймера и родственных нейродегенеративных расстройств. Проведена систематизация имеющихся данных о биохимических и структурных закономерностях взаимодействия физиологически активных веществ с биологическим аппаратом нервной системы, участвующим в развитии болезни Альцгеймера и сходных патологий. Основное внимание при этом уделено холинмиметическому, антиамилоидному и антиметаболическим направлениям исследований на основании результатов, опубликованных в научной литературе за последние 3-4 года и данных по клиническим испытаниям препаратов, приведенным в интернете по состоянию на конец 2000г.

## **ВВЕДЕНИЕ**

Среди широкого спектра различных нейродегенеративных заболеваний (НЗ) особое место по своему негативному значению для общества играет болезнь Альцгеймера (БА). Характерной особенностью БА является постепенное неуклонное прогрессирование расстройств памяти и высших корковых функций вплоть до полного распада интеллекта и психической деятельности [1]. БА является наиболее распространенной формой деменций в пожилом возрасте и поражает от 3% лиц в возрасте 65 лет до 30-35% в возрасте старше 85 лет, что составляет в целом более 20 млн. человек во всем мире [2]. Имеющиеся статистические данные дают основание считать БА, наряду с сердечно-сосудистыми и онкологическими заболеваниями, одной из наиболее серьезных медицинских проблем в развитых странах. Проблема старческого слабоумия является крайне актуальной также и для нашей страны. Так, проведенные в НИЦПЗ РАМН эпидемиологические исследования показали, что 4,5% (более 70 тыс.чел.) московского населения в возрасте 60 и старше лет страдают деменцией альцгеймеровского типа, причем у 1,8% обследованных (более 30 тыс. чел.) выявлены выраженные и тяжелые, т.е. требующие постороннего ухода и надзора, формы слабоумия. Экстраполяция полученных данных на население старших возрастов России в целом позволяет говорить о том, что уже в настоящее время общая численность больных, страдающих болезнью Альцгеймера, в России приближается к 1,4 млн. человек [3].

В настоящее время для лечения БА используется около десяти препаратов, большая часть которых имеет выраженное холиномиметическое действие. Основной фармакологический эффект этих соединений направлен на улучшение когнитивных способностей, сниженных при БА за счет гипофункции холинэргической нейромедиаторной системы, а их нейропротективные свойства выражены довольно слабо. Вместе с тем, особый интерес в настоящее время уделяется подходам, которые опираются на представления о молекулярных механизмах развития БА, и позволяют направленно создавать препараты, сочетающие в себе когнитивно-стимулирующие и нейропротекторные свойства [4].

Как известно, основными нейропатологическими характеристиками БА считается наличие характерных сенильных бляшек (СБ), связанных с бета-амилоидным пептидом, нейрофибриллярных филаментов (НФ), а также выраженная дегенерация нейронов преимущественно в области гиппокампа и базальных ядер Мейнарта. В плане нейромедиаторной специфичности БА характеризуется выраженной деградацией холинэргической системы и нарушением функций ряда других нейромедиаторных систем, в частности, глутаматэргической и серотонинэргической.

В соответствии с выявленными морфологическими и биохимическими характеристиками этой патологии стратегия поиска препаратов для лечения БА может быть представлена следующими основными направлениями:

- холиномиметические средства, направленные на прямую компенсацию гипофункций холинэргической системы при БА;
- препараты, действующие на процессы образования и свойства бета-амилоидного пептида;
- препараты, защищающие нервные клетки от токсических метаболитов, образующихся в ходе нейродегенеративных процессов;
- препараты, активирующие другие нейромедиаторные системы и опосредованно компенсирующие дефицит холинэргических функций;
- препараты, действующие на процесс образования НФ;
- противовоспалительные препараты, действие которых направлено на купирование негативного ответа нервных клеток на патологический процесс.

В рамках данной работы предпринята попытка анализа и медико-химического обоснования принципов направленного поиска препаратов, разрабатываемых для лечения и предупреждения БА и сходных нейродегенеративных расстройств на основе систематизации имеющихся данных о биохимических и структурных закономерностях взаимодействия физиологически активных веществ с биологическим аппаратом нервной системы, участвующим в развитии подобных патологий (в англо-язычной литературе по медицинской химии этот подход получил название “mechanism-based approach”). При этом главное внимание уделено холинмиметическому,

антиамилоидному и антиметаболическим направлениям исследований на основании результатов, опубликованных в научной литературе за последние 3-4 года и данных по клиническим испытаниям препаратов, приведенным в интернете по состоянию на 01.11.2000 на сайте <http://www.alzforum.org/members/research/drugs/index.html>.

## **1. Холиномиметические средства для лечения БА.**

Холинэргическая гипотеза патогенеза БА, сформулированная около 20 лет назад [5], опирается в основном на следующие экспериментальные наблюдения: наличие существенного дефицита маркеров холинэргических нейронов в лимбической и височно-теменной областях коры большого мозга больных БА; значительный когнитивно-стимулирующий эффект у многих холиномиметических препаратов; частичная компенсация гипофункции холинэргической системы при интрацеребральной трансплантации фетальных холинэргических клеток. В соответствии с этой гипотезой для лечения БА, в первую очередь, для улучшения когнитивных функций у больных БА к настоящему времени предложен целый спектр подходов основной целью которых является компенсация, тем или иным путем, дефицита активности холинэргической нейромедиаторной системы в ЦНС (Рис.1).

### **1.1. Ингибиторы ацетилхолинэстеразы (АХЭ).**

Ингибиторы холинэстераз (ИХЭ) являются исторически первой и наиболее развитой группой препаратов, предложенных для лечения БА. В рамках классических представлений о роли АХЭ в нейромедиаторной передаче считается, что основной эффект ИХЭ связан с увеличением времени действия и концентрации нейромедиатора ацетилхолина (АХ) в межсинаптическом пространстве, за счет чего потенцируется активация холинэргических рецепторов, сниженная при патологии типа БА. Эффективность действия ИХЭ зависит, однако, от целостности пресинаптических нейронов и, очевидно, будет снижаться на более глубоких стадиях заболевания, когда общее количество терминалей холинэргических нейронов резко снижается.

Препараты первого поколения ИХЭ, такие как физостигмин (*Physostigmine*), такрин (*Tacrine* или *Cognex*) или амиридин, разработанный в России в ГИАП и ВНЦБАВ (в настоящее время производится в Японии фирмой Nikken под названием NIK-247) неселективно ингибировали АХЭ по отношению к другому ферменту этой группы – бутирилхолинэстеразе (БуХЭ) и проявляли низкую органоспецифичность. Помимо ингибирования холинэстераз (ХЭ) амиридин и такрин блокируют калиевую и в меньшей степени натриевую проницаемость мембран, обладают м-холиномиметическим и седативным эффектом. Клинический эффект этих препаратов является умеренным (такрин, к примеру, улучшал память и когнитивные функции только у 20-30 % больных БА) и проявляется медленно. Побочные эффекты, в частности, гепатотоксичность у этих препаратов достаточно явно выражены и в значительной степени определяют ограничение их применения. Вместе с тем, гепатотоксичность и седативные свойства у амиридина выражены слабее, чем у Такрина, что делает его более перспективным в плане хронического применения.

Один из применяемых подходов к улучшению переносимости препаратов класса ИХЭ предполагает увеличение селективности ингибирования АХЭ по отношению к БуХЭ, что должно понижать периферическую токсичность этих соединений. Это принципы были реализованы при разработке препаратов ИХЭ второго поколения, таких как арисепт (*Aricept*, *Memac* или *Donepezil*), предложенный фирмами Pfizer и Eisai, препарат галантамин (*Galanthamine*), фирмы Janssen, или эптастигмин (*Epastigmine*), фирмы Mediolanum, проявляющих выраженную селективность по отношению к АХЭ. Другой подход, успешно воплощенный, фирмой Novartis на препарате экселон (*Exelon*, *Rivastigmine*, *ENA 713*), заключается в создании веществ с выраженной региоселективностью, обеспечивающей селективное ингибирование АХЭ мозга по сравнению с периферическими формами холинэстераз. Все эти препараты переносятся существенно лучше чем Такрин и проявляют наибольшую эффективность на ранних и умеренных стадиях БА. Альтернативой этой стратегии может считаться разработка ИХЭ с

оптимальной фармакокинетикой. Практически это может быть реализовано путем создания «про-лекарств», медленно высвобождающих в кровь активный компонент за счет чего достигается «мягкое» но длительное ингибирование ХЭ. Примером такого лекарства может служить препарат метрифонат (*Metrifonate*), разработанный фирмой Байер, представляющий собой про-форму ингибитора АХЭ - диметил-2,2-дихлорвинилфосфата, а также новая форма препарата физостигмин, отличающаяся медленной фармакокинетикой высвобождения активного компонента (“sustained-release”), предложенная фирмой Synaton Forest Laboratories.

Наряду с синтетическими ИХЭ для лечения БА предложен препарат гуперзин А (*Hyperzine A*), представляющий растительный алкалоид, применяемый в китайской медицине в качестве жаропонижающего средства.

Несмотря на то, что ИХЭ второго поколения имеют существенные различия в специфичности, они проявляют близкий спектр побочных эффектов. Это дает основание предположить, что селективность ингибирования ХЭ не является определяющим условием в переносимости препаратов ИХЭ. Очевидно, что принципиальным лимитирующим фактором на пути создания оптимальных лекарств этого класса служит сама мишень их действия – фермент АХЭ, ингибирование которого в значительной степени определяет нежелательные токсические и депрессивные эффекты подобных препаратов.

На рис. 2 приведены структурные формулы некоторых из перечисленных ИХЭ.

Помимо «классического» холиномиметического действия ИХЭ, реализующегося в стимулировании когнитивных функций за счет компенсации холинодефицита в ЦНС, в последние годы получены результаты, позволяющие считать, что ИХЭ способны влиять на процессы амилоидоза при БА. Как правило, это связывают с тем, что ингибирование АХЭ приводит к дополнительной активации мускариновых холинорецепторов, участвующих в процессинге белка-предшественника амилоидного пептида, инициирующего каскад нейродегенеративных процессов в мозге (подробно об этом будет говориться далее). В ряде работ было также показано, что АХЭ может влиять

на трансформацию бета-амилоидного пептида в токсическую – агрегированную форму [6]. Аналогичные соображения высказывались об участии БуХЭ в процессе образования компактных форм амилоидных бляшек в мозге больных БА [7]. Таким образом, помимо прямого холиномиметического действия, ингибирование ХЭ может нести нейропротекторный компонент, что представляет несомненный интерес с точки зрения разработки комплексных средств для лечения БА.

## **1.2. Лиганды мускариновых холинорецепторов (мХР)**

Изначально основным стимулом поиска средств для лечения БА в ряду лигандов мХР являлись те же посылки, что и в случае с ИХЭ – необходимость компенсировать дефицит холинэргической иннервации характерный для данной патологии. Вместе с тем необходимо отметить, что данные о количестве и свойствах мХР при БА достаточно противоречивы и простое «возмещение» сниженной активности холинорецепторной системы не позволяет объяснить нейропротекторную активность лигандов мХР. К настоящему времени достоверно установлено, что мХР участвуют в процессах регуляции процессинга белка-предшественника бета-амилоида (APP), в связи с чем возникает новый аспект положительного действия агонистов этих рецепторов на ранних стадиях БА [8]. Механизм подобного нейропротекторного действия агонистов мХР можно представить следующим образом. Известно, что все холинорецепторы осуществляют свои эффекты через G-белки, при этом M1, M3 и M5 подтипы мХР стимулируют гидролиз фосфоинозотида (ФИ) через активацию фосфолипазы C (ФЛС), тогда как M2 и M4 подтипы ХР участвуют в ингибировании аденилатциклазной активности. В то же время, G-белок-связанные рецепторы на мембране нейронов регулируют процесс расщепления белка-предшественника бета-амилоида (APP). Можно считать, что активация M1 подтипа ХР приводит к ФЛС-катализируемому гидролизу фосфоинозотида с образованием диацилглицерола, который активирует протеинкиназу C (ПКС), обеспечивающую фосфорилирование APP, что является триггером процессинга APP с выделением секретируемой

формы амилоидного пептида. Таким образом, опосредованная через мХР активация фосфорилирования APP приводит к увеличению секретируемой (трофической) формы амилоида и, что особенно важно, к снижению образования бета-формы амилоида. Гипоактивность мХР, либо разобщение в функционировании комплекса мХР/G-белок ведет к дезактивации ФКС, нарушению фосфорилирования APP и увеличению выхода патологической формы амилоидного белка.

В ранних работах по исследованию когнитивно-стимулирующих свойств полных агонистов мХР отмечалось их относительно слабая терапевтическая эффективность вследствие низкой биодоступности и наличие целого ряда побочных эффектов. В настоящее время принято считать, что нежелательные побочное действие полных агонистов мХР связано со стимуляцией периферических M2 и M3 подтипов мХР. В этой связи, и с учетом ранее сделанных замечаний о протекторном аспекте действия лигандов мХР, наиболее перспективными представляются специфические агонисты M1 подтипа мХР, который преобладают в ЦНС, а также вещества сочетающие свойства агонистов M1 и антагонистов M2 подтипа ХР [9].

Положительное отличие агонистов мХР от ИХЭ заключается в том, что эффективность их действия не зависит от степени деградации пресинаптических терминалей холинэргических нейронов. Необходимо отметить также, что агонисты мХР оказывают значительно большее влияние на некогнитивные симптомы БА, чем ИХЭ.

Принципиальное ограничение эффективности действия этого класса препаратов связано с участием мХР в активации экспрессии гена АХЭ, что приводит к формированию отрицательной обратной связи в холинэргической нейромедиаторной передаче [10].

К числу наиболее хорошо исследованных препаратов этого класса относятся следующие соединения:

– ксаномелин (*Xanomeline*, Eli Lilly) - селективный агонист M1 и M4 подтипов мХР, который в форме препарата кожно-резорбтивного действия находится на II фазе клинических испытаний.

– Производные хинуклидина: препарат *AF102B* и его аналоги, разработанные в группе А. Fisher, а также препарат *SB 202026* (*Sabcomeline* или *Memric*) фирмы Smith-Kline Beecham, являющиеся частичными агонистами М1 подтипа ХР. Все эти соединения показали хорошие результаты на различных моделях БА и находились на 3-й фазе клинических испытаний на больных БА. Однако по данным приведенным в интернете на ноябрь 2000г. их дальнейшие исследования приостановлены.

Структуры перспективных лигандов мХР приведены на рис. 3.

### **1.3. Лиганды никотиновых холинорецепторов (нХР)**

Как известно, никотиновые холинорецепторы (нХР) представляют собой подгруппу холинорецепторов непосредственно связанную с хемоуправляемыми ионными каналами и играющую важную роль в обеспечении когнитивных процессов в мозге. нХР мозга подразделяются на два класса - альфа (по крайней мере 6 подтипов:  $\alpha 2$ - $\alpha 7$ ) и бета ( $\beta 2$ - $\beta 4$ ). Как правило, нейрональные нХР состоят из двух альфа-субъединиц и трех бета-субъединиц, формирующих канал-образующий пентамерный комплекс. Исключение составляет лишь  $\alpha 7$  подтип нХР, участвующий в регуляции кальциевого гомеостаза в нейронах и играющий значительную роль в процессах обучения и памяти. По данным ауторадиографии и позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) у больных БА отмечено существенное падение общего числа связывающих участков нХР, которое сильно варьируется по различным областям мозга и достигает 70% в области коры. Важно, что снижение содержания нХР отмечается уже на ранних стадиях БА, вероятно еще до развития необратимых нейродегенеративных процессов в мозге [11]. Хотя взаимосвязь между состоянием нХР и развитием БА отмечалась уже давно, конкретные успехи в определении стратегии поиска средств для лечения БА в ряду лигандов нХР были достигнуты лишь в последние годы [12]. В частности, в опытах на культуре клеток было обнаружено, что хроническое воздействие агонистами нХР приводит к увеличению числа связывающих участков по типу «upregulation» и коррелирует с аффинностью агонистов. Особенно

перспективными с точки зрения фармакологического воздействия являются, очевидно специфические агонисты  $\alpha 7$  и  $\alpha 4\beta 2$  подтипов nXP. Так, установлено, что ряд селективных агонистов  $\alpha 7$ -nXP проявляют выраженные когнитивно-стимулирующие свойства на моделях деменции типа БА в опытах на животных. В ряде работ было показано, что активация  $\alpha 7$  и  $\alpha 4\beta 2$  подтипов АХР позволяет защитить нейроны от токсического действия бета-амилоида, а также иксайтотоксичности глутамата [13]. В то же время необходимо отметить, что конкретных примеров препаратов, предложенных для лечения БА на основе лигандов nXP известно очень мало. В частности, можно привести вещество *ABT418*, являющийся селективным агонистом  $\alpha 4\beta 2$  nXP (компания Abbot), прошедшее клинические испытания 2-й фазы на больных БА, и ряд его аналогов (А-98284, А-85380, А-84543), находящихся на стадиях лабораторных испытаний. Прошел предварительную регистрацию в качестве средства для лечения БА препарат нефирацетам (*Nefiracetam, Translon*), когнитивно-стимулирующий эффект которого связывают с активацией nXP, стимуляцией активности холин-ацетилтрансферазы, а также способностью к быстрому (при субмикромольных) и долго-временному (при микромольных концентрациях) угнетению АХ-вызванных токов. В качестве потенциальных средств для лечения БА заявлен известный агонист nXP анабазин, а также алкалоид эпибатин, выделяемый из кожи ядовитой южноамериканской лягушки и ряд его производных. По данным экспериментов на культуре клеток препараты класса ИХЭ такрин и арисепт, а также некоторые эстрогены снижают токсичность бета-амилоида в опытах *in vitro* по механизму активации nАХР. Структуры некоторых отмеченных лигандов nXP приведены на рис. 3.

Принципиальным ограничением, которое может возникнуть при разработке терапевтических средств на основе лигандов nXP является быстрая десенситизация рецепторов при действии агонистов nXP.

#### **1.4. Средства, влияющие на синтез и релиз ацетилхолина (АХ).**

Важным направлением работ в области создания холиномиметических препаратов, компенсирующих дефицит холинэргической системы является

поиск соединений, способных стимулировать синтез и релиз ацетилхолина. По механизму действия эти вещества можно условно разделить на две группы.

**1.4.1. Биохимические предшественники АХ.** В основе холиномиметического действия подобных препаратов лежит увеличение пула предшественника АХ – холина. К числу веществ с таким механизмом когнитивно-стимулирующего действия можно отнести экзогенный холин, лецитин, фосфатидилхолин. Наиболее известным препаратом этой группы является глиатилин (*Gliatilin*, фирма Italfarmaco, или *Brezal* фирмы Sandoz), разрешенный к применению в России. Иногда к этой группе относят препарат препарат ALCAR (ацетил-1-карнитин, фирмы Sigma-Tau), который в настоящее время находится на 3-ей фазе клинических испытаний на больных БА. Ацетил-L-карнитин однако не является истинным предшественником АХ, а действует скорее как слабый агонист ХР, но, самое главное, способствует нормализации метаболизма липидов, и стабилизирует работу митохондрий.

**1.4.2. Стимуляторы релиза ацетилхолина.** Стимулирование релиза ацетилхолина может осуществляться по разным механизмам. В качестве примера можно отметить действие препарата линопидина (*Linopirdine*, DuP 996), который проходил III фазу клинических испытаний. Как было показано, механизм АХ-высвобождающего действия линопидина предусматривает селективное ингибирование М-типа калиевых каналов на пресинаптических окончаниях холинэргических нейронов при микромолярных концентрациях, и неселективное ингибирование ряда других типов потенциал-управляемых кальций-зависимых каналов при высоких концентрациях [14]. Другой механизм стимуляции высвобождения АХ реализуют антагонисты H<sub>3</sub> гистаминовых рецепторов (H<sub>3</sub>-ГР) – одного из подтипов ГР локализованного на пресинаптических терминалях гистамин- и негистаминэргических нейронов в центральной и периферической нервной системе. Так, селективные антагонисты H<sub>3</sub>-ГР ряда 4-замещенных имидазола: тиоперамин (*Thiopramine*) и клобенпропит (*Clobenpropit*) разработанные фирмой Glaxo Wellcome, а также препарат GT-2016 фирмы Gliatech, проявили высокие когнитивно-

стимулирующие свойства в преclinical испытаниях на животных моделях деменции. Хорошие результаты в предварительных испытаниях проявили также ряд других производных имдазола, в частности вещества Iodoproxyfan и UCL-1390 фирмы INSERM а также препарат AQ-0145, синтезированный совместно фирмой Green Cross и Университетом Tohoku (Япония).

Альтернативой рецептор-управляемому релизу АХЭ является механизм стимуляции его выброса за счет усиления захвата пресинаптическими терминалями эндогенного холина, образующегося за счет ферментативного разложения АХ под действием АХЭ. Среди препаратов этого плана наибольшие успехи были получены при испытаниях вещества МКС-231 (фирма Mitsubishi Chemical), который является активатором системы высокоаффинного захвата холина – ключевого звена в ресинтезе АХ.

На рис. 4 приведены структуры некоторых препаратов, отмеченных в этом разделе.

## **2. Фармакологические подходы к терапии БА, основанные на представлениях о роли бета-амилоида в патогенезе БА.**

В ряду многочисленных предположений об этиопатогенезе БА особое место занимает гипотеза о ключевой роли бета-амилоидного пептида (бета-амилоида, АРβ) в развитии нейродегенеративных процессов при БА [15]. За последние 10 лет в литературе накоплен огромный фактический материал по различным аспектам бета-амилоидного каскада. И хотя до настоящего времени многие вопросы в этой области остаются не решенными, в целом анти-амилоидная стратегия поиска новых препаратов и способов коррекции БА рассматривается как наиболее перспективная и обоснованная [16, 17].

В соответствии с современными представлениями о патогенезе БА ключевым звеном развития нейродегенеративных процессов в мозге представляется образование патологической формы амилоидного пептида (АР) из белка предшественника (APP). В “нормальных условиях” АР секретируется преимущественно в растворимой форме ( $sAPP\alpha$ ) в результате действия  $\alpha$ -протеаз и несет трофические функции. С возрастом, либо при наличии мутаций

в гене APP происходит изменение механизма расщепления этого белка, приводящее к снижению уровня  $\text{A}\beta_{40}$  и образованию бета-формы пептида ( $\text{A}\beta$ ) под действием  $\beta$ - и  $\gamma$ -протеаз. Известно, что  $\text{A}\beta$  может образовываться в нескольких формах, отличающихся по числу аминокислотных остатков, а именно:  $\text{A}\beta_{40}$ ,  $\text{A}\beta_{42}$ ,  $\text{A}\beta_{43}$ . Дальнейшая агрегация  $\text{A}\beta$  приводит к образованию нерастворимых (компактных форм) фибрилл, участвующих в формировании сенильных бляшек. Считается, что пептиды  $\text{A}\beta_{42}$  и  $\text{A}\beta_{43}$  способны оказывать токсические эффекты на нейроны будучи как в растворимом, так и в агрегированном состоянии, в отличие от пептида  $\text{A}\beta_{40}$ , который может проявлять нейротоксическое действие только в агрегированной форме [18].

Что касается конкретных механизмов нейродегенерации вызванной бета-амилоидом, то обычно отмечают нарушение кальциевого гомеостаза, усиление окислительного стресса, потенциацию токсичности возбуждающих нейромедиаторных аминокислот (ВАК), а также инициирование процессов апоптоза.

В соответствии с предполагаемым механизмом образования и действия  $\text{A}\beta$  в настоящее время активно рассматривается целый спектр подходов к предупреждению и коррекции развития  $\text{A}\beta$ -вызванной нейродегенерации клеток. Ниже проводится краткая систематизация основных групп потенциальных и уже используемых препаратов для лечения деменции типа БА, по их месту действия в амилоидном каскаде.

### **2.1. Ингибирование образования $\text{A}\beta$ .**

Очевидно, что одними из наиболее привлекательных участков для действия препаратов, блокирующих развитие каскада нейродегенеративных процесс, является стадия образования  $\text{A}\beta$  из белка предшественника APP. Как уже отмечалось ранее, процессинг APP регулируется активацией мХР опосредуемой через протеинкиназы, а экспрессия APP стимулируется рядом эндогенных факторов, в т.ч. цитокинами, некоторыми нейротрофическими факторами (BFGF, EGF), эстрогенами, стрессовыми условиями (травма,

фокальная ишемия др.) [17 Sabbagh M. et al. 1998]. Известно, что процесс формирования АРβ включает две стадии: внутриклеточный протеолиз под действием β-секретаз, формирующий аминок-терминальный остаток АРβ, и экстраклеточное расщепление под действием γ-секретаз по С-терминальному остатку АРβ [19]. Ещё до недавнего времени достоверных сведений о природе и свойствах истинных β- и γ-протеаз, выщепляющих АРβ из белка предшественника не имелось. В конце 1999г. появилось первое сообщение об идентификации β-секретазы участвующей в процессинге АРβ [20], что дает основания для направленного поиска специфических блокаторов этого процесса. В отношении гамма-секретазы такой ясности пока нет. В качестве вероятных кандидатов на эту роль рассматривались различные известные протеазы, в том числе калпаин, катепсин D. Высказано предположение, что нейропротекторные свойства церобролизина (*Cerebrolysin*) в существенной мере определяются его свойствами ингибитора калпаина II. Твердо установлено, однако, что определяющую роль в обеспечении активности этого фермента играет белок пресинилин I, что может быть использовано для поиска нейропротекторных препаратов направленных на блокаду патологического процессинга АРР [21].

В литературе имеется много данных, полученных, как правило, на культуре клеток, о возможности регуляции образования АРβ химическими агентами (структурные формулы некоторых соединений подобного действия приведены на Рис. 5). Механизм действия этих соединений, однако существенно различается. Так, монензин (*Monensin*) и брефелдин А (*Brefeldin A*) по всей видимости снижают образование АРβ путем дестабилизации рН-градиента и/или везикулярного транспорта. Понятно, что подобная неселективность в механизме действия делает маловероятным создание на их основе реальных терапевтических средств. Значительно больший интерес привлекает бафиломицин (*Bafilomycin A*) и его аналоги, которые высокоэффективно ( $EC_{50}=50nM$ ) и селективно блокируют образование АРβ по механизму опосредованного ингибирования β-секретазной активности,

предотвращая лизосомальное подкисление путем ингибирования АТФ-азы V-типа. Другой механизм, приводящий к понижению образования АРβ, реализуют соединения пептидной природы *MDL-28170*, леупептин (*Leupeptine*) и *E-64*, которые стабилизируют С-терминальный фрагмент АРβ путем прямого или косвенного ингибирования γ-секретазной активности. Недавно появилась первая публикация о возможности эффективного ингибирования функциональной активности γ-секретазы и снижения уровня АРβ в мозге в экспериментах *in vivo* на трансгенных мышах [22]. В качестве ингибиторов наиболее эффективными оказались эфиры N-арил-аланина.

Интересной альтернативой указанным направлениям ингибирования патологического процессинга АРР является действие препаратов, стимулирующих нормальное расщепление АРР с образованием трофической формы  $\gamma$ -АРР $\alpha$ . Так, установлено, что стимуляция 1 $\alpha$  подтипа метаботропных глутаматных рецепторов увеличивает образование  $\gamma$ -АРР $\alpha$ , что может быть использовано в качестве рациональной стратегии предотвращения развития АРβ-индуцируемой патологии альцгеймеровского типа [23].

## **2.2. Вещества влияющие на процессы агрегации-деагрегации АРβ и связывающие АРβ.**

Переход АРβ из растворимой в агрегированную форму считается обязательным условием проявления им нейродегенеративных свойств. В этой связи, средства замедляющие или обращающие этот процесс могут рассматриваться в качестве потенциальных анти-альцгеймеровских препаратов с нейропротекторным типом действия. Предполагается, что в основе процесса фибрилизации АРβ лежит способность этой формы амилоида образовывать β-складчатые олигомерные структуры [24]. Поэтому естественным представляется направленный поиск веществ, способных препятствовать формированию β-складчатых агрегатов (т.н. «β-sheet breaker»). Показано, что подобные свойства проявляют ряд синтетических пептидов, представляющих сокращенные или модифицированные варианты самого АРβ. В частности, пентапептид KLVFF, являющийся фрагментом АРβ с последовательностью

аминокислот 16-20, а также ряд его модифицированных аналогов: LPFFD, LPYFD, RDLPFYPVPID [25]. Главным недостатком этих соединений в плане их практического использования является слабое проникновение в мозг через ГЭБ, что отмечают сами авторы, а также возможные побочные (в частности, аллергические) реакции.

Среди веществ не пептидной природы, способных уменьшать агрегацию и депонирование фибриллярных образований АРβ в мозге, необходимо отметить ряд синтетических глюкозаминогликанов и эндогенных протеогликанов. В частности, установлено, что гликопротеин ламинин (*Laminin*), экспрессируемый в мозге после травм, а также некоторые его производные в опытах на культуре клеток ингибируют образование β-фибрил и индуцируют их дезагрегацию. Аналогичные свойства проявляют ряд вновь синтезированных бензофуранов, антибиотик рифампицин (*rifampicin*), применяемый при лечении туберкулеза и проказы, некоторые производные тетрациклинового ряда, в частности, ролитетрациклин (*rolitetracycline*), дауномицин (*daunomycin*), которые связываются с АРβ и таким образом блокируют процесс образования амилоидных фибрил. С помощью докингомоделирования установлено, что эти вещества способны формировать сходный трехмерный фармакофор, который, по всей видимости, участвует во взаимодействии с АРβ [26].

В последние годы появились работы, указывающие на участие ферментов класса ХЭ в процессе агрегации. В частности, показано, что АХЭ ускоряет переход растворимого АРβ в фибриллярные комплексы, при этом существенную роль играет взаимодействие АРβ с периферическим центром связывания АХЭ. Интересно, что образующийся при этом комплекс АХЭ-АРβ сам обладает нейротоксическими свойствами, причем наиболее токсичен комплекс с формой АРβ40 [6]. В этой связи возникает новый аспект терапевтического действия ингибиторов АХЭ, поскольку блокируя взаимодействие этого фермента с АРβ они могут выступать в качестве нейропротекторов.

Значительный интерес привлекают исследования эндогенных механизмов регуляции процесса образования амилоидных фибрилл, в первую очередь, роли и функции аполипопротеина E (apoE) в этом процессе. Известно, что белок apoE существует в нескольких изоформах (E2, E3, E4) и играет ключевую роль в метаболизме липидов и липопротеинов. Установлено, что наличие аллели  $\epsilon 4$  *APOE* гена является одним из важнейших генетических факторов риска БА. В качестве одного из возможных механизмов реализации нейродегенеративно-инициирующих свойств apoE4 рассматривается его способность усиливать фибрилогенез A $\beta$  и снижать его выведение из межклеточного пространства [27, 28]. С другой стороны, недавно получены веские основания предполагать наличие протекторных функции у белка apoJ, который стимулирует накопление в ЦНС трофической формы амилоида  $\epsilon$ APP $\alpha$ . [29]. Возможность воздействовать на apoE/apoJ-регулируемый процесс формирования и депонирования в мозге амилоидных фибрилл представляется в настоящее время заманчивой, но пока не реализованной на практике стратегией предотвращения развития БА.

Другим направлением поиска способов коррекции патологии типа БА является использование антител к A $\beta$  (ATA $\beta$ ). Сами ATA $\beta$  уже давно рассматриваются в качестве вероятного маркера для диагностики БА, однако терапевтические возможности иммунных методов коррекции БА проявились лишь в самое последнее время. Сначала в опытах на трансгенных мышах (линии PDAPP, имеющей повышенный уровень продуцирования A $\beta$ 42 и повышенный уровень отложения амилоидных бляшек) было установлено, что иммунизация амилоидом A $\beta$ 42 приводит к предотвращению отложения амилоидных бляшек у молодых животных и к существенному снижению уровня бляшек у старых животных [30]. Предполагается, что иммунизация A $\beta$  вызывает усиленное образование ATA $\beta$ , которые связывают и «выводят» из амилоидных отложений основной их компонент - эндогенный A $\beta$ , что инициирует общую дестабилизацию и разрушение сенильных бляшек. Далее, возможность успешного применения антител для предотвращения

токсического действия АРβ была продемонстрирована в экспериментах с искусственными антителами IgM508 к фрагментам белка APP. При этом было показано, что подобные антитела способны блокировать образование нерастворимых агрегатов АРβ и растворять уже образовавшиеся амилоидные фибриллы [31]. Наконец, в самом конце 2000г. в журнале “Nature” одновременно были опубликованы статьи канадских [32] и американских ученых [33], показавших на различных трансгенных линиях мышей, что иммунизация животных пептидом АРβ препятствовала снижению памяти и отложению амилоидных бляшек у трансгенных (как по одному гену APP так и по двум генам: APP и пресенилина-1) животных. Вместе с тем отмечено, что общего снижения уровня АРβ в мозге при иммунизации не происходило.

По данным имеющимся в интернете синтетическая форма АРβ42 под названием препарат AN-1792 (Elan Corporation) проходит I фазу клинических испытаний.

Таким образом, пока на уровне лабораторных исследований на животных, показана возможность успешного предотвращения и даже обращения процесса формирования амилоидных образований – одной из наиболее характерных патологоморфологических характеристик БА.

### **2.3. Ингибиторы нейротоксического действия АРβ.**

Несмотря на то, что до настоящего времени нет полной ясности о молекулярных механизмах, определяющих нейродегенеративное действие АРβ в условиях *in vivo*, имеются основания считать, что токсические эффекты АРβ могут реализовываться по следующим основным направлениям:

- усиление токсичности возбуждающих аминокислот (ВАК);
- нарушение гомеостаза ионов кальция ( $[Ca^{2+}]_i$ );
- инициация перекисного окисления липидов мембран (ПОЛ) и генерация свободно-радикальных метаболитов (СРМ);
- индукция апоптоза;
- энергетическое истощение клеток.

Все эти процессы тесно взаимосвязаны, и поэтому большинство препаратов, которые будут обсуждаться в этом разделе оказывают влияние на весь спектр нейротоксических эффектов АРβ.

### **2.3.1. Подходы к созданию препаратов, связанные с ингибированием эксайтотоксического действия ВАК.**

В основе представлений о роли глутаматэргической системы ЦНС в этиопатогенезе БА лежат следующие факты: существенное снижение уровня глутаматных рецепторов (GluR) в области гиппокампа, ключевое значение NMDA-подтипа глутаматных рецепторов в процессах обучения и памяти, способность эндогенного глутамата и других агонистов GluR оказывать нейротоксическое действие на нервные клетки - т.н. явление эксайтотоксичности [34].

Как известно, явление эксайтотоксичности эндогенных ВАК (глутамата и аспартата) и их экзогенных аналогов является результатом гипервозбуждения глутаматных рецепторов в ЦНС. Исследованию механизмов эксайтотоксичности и ее роли в этопатогенезе нейродегенеративных расстройств посвящено огромное количество литературы, в т.ч. ряд свежих обзорных статей [35]. Суммируя имеющиеся результаты и предположения можно отметить, что в процессе острой «классической» эксайтотоксичности выделяют три стадии:

– первичная деполяризация нейрональной мембраны, опосредуемая, вероятно AMPA-и/или канинатными подтипами глутаматных рецепторов, которая приводит к усиленному входу в клетки ионов натрия (через AMPA и потенциал-зависимые натриевые каналы), ионов хлора и молекул воды, в результате чего проявляется т.н. «осмотическое набухание» клеток и происходит снятие магниевого блока у NMDA- рецепторов. Эта стадия процесса эксайтотоксичности является кальций-независимым процессом.

– Гиперактивация NMDA-рецепторов, сопровождающаяся массивным входом в клетки ионов кальция и увеличением концентрации  $[Ca^{2+}]_i$  на несколько порядков, что приводит к активации ряда

внутриклеточных ферментных систем (протеаз, нуклеаз, липаз), инициирующих каскад цитодегенеративных процессов и лизис клетки. Этот процесс строго зависит от наличия ионов кальция.

– Экзоцитоз клеток, приводящий к массивному выбросу из клеток эндогенного глутамата. В результате этого происходит резкое увеличение концентрации экстраклеточного глутамата, дополнительная гиперактивация глутаматных рецепторов и последующая серия нейродегенеративных реакций клетки (по первому и второму механизму).

Помимо «классического» механизма эксайтотоксичности выделяют также «медленную» или «метаболическую» эксайтотоксичность. Эта форма нейродегенерации может иметь место при нормальных, не повышенных концентрациях глутамата, но при сниженном энергетическом статусе клетки. В этом случае роль триггера патологических процессов играет нарушение функции митохондрий по «производству» АТФ, что приводит к понижению уровня активности АТФ-зависимых ферментов, в частности Na/K-АТФаз, ответственных за поддержание мембранного потенциала клетки. Как результат этого, происходит медленная деполяризация мембраны клетки (даже при нормальных концентрациях ВАК), снятие магниевых блока NMDA-рецепторов и массивное поступление ионов кальция в нейрон, запускающий весь каскад внутриклеточных нейродегенеративных реакций. Было сделано предположение, что именно такой механизм гибели нервных клеток имеет место при длительно развивающихся нейродегенеративных расстройствах [36].

В начале 90-х годов в опытах на культуре клеток были получены результаты, указывающие на способность АРβ потенцировать нейротоксичность ВАК и дестабилизировать кальциевый гомеостаз в клетках [37]. Исходя из этих данных можно предполагать, что антагонисты АМРА/Каинатных рецепторов, а также блокаторы глутамат-индуцированного входа кальция в ряду антагонистов NMDA-рецепторов будут проявлять нейропротекторные свойства также и в отношении АРβ. С другой стороны, как уже отмечалось выше, при БА отмечено существенное снижение уровня

глутаматных рецепторов, коррелирующее с тяжестью развития этой патологии [38].

Таким образом, поиск эффективных анти-альцгеймеровских препаратов на основе лигандов GluR должен учитывать дуализмом функций нейромедиатора-глутамата в ЦНС: агонисты GluR могут улучшать сниженные при БА когнитивные функции за счет компенсации дефицита глутаматэргической иннервации в стриатуме и гиппокампе, но потенциально увеличивать вероятность развития эксайтотоксических процессов. Антагонисты GluR, в частности антагонисты NMDA- и AMPA-рецепторов, будут проявлять выраженные нейропротекторные свойства, но при этом существует вероятность снижения когнитивных функций ЦНС.

Несмотря на указанные проблемы, поиск высокоэффективных средств для лечения и предупреждения БА в ряду лигандов глутаматэргической системы, обладающих оптимальным соотношением нейропротекторных и когнитивно-стимулирующих свойств рассматривается в настоящее время в качестве одного из перспективных направлений фармакотерапии БА. Особое внимание и значение при этом уделяется веществам действующим на AMPA/Каинатные рецепторы [39].

В качестве возможных подходов к реализации глутамат-эргической стратегии терапии БА к настоящему времени сформировались следующие направления:

1. Препараты, сочетающие свойства антагонистов NMDA- и агонистов AMPA- рецепторов. К настоящему времени накоплен положительный опыт использования для лечения БА препарата аканитол мемантин (*Akanitol Memantine* фирмы фирмы Merz). Препарат относится к группе низко-аффинных неконкурентных антагонистов NDMA рецепторов, а также проявляет свойства агониста AMPA-рецепторов. По последним опубликованным данным о клинических исследованиях мемантина препарат проявляет положительный эффект у 73% пациентов легкой и умеренной формой деменции альцгеймеровского типа [40]. Мемантин не проявляет нейротоксических эффектов, свойственных неспецифическим антагонистам NMDA рецепторов, а

также побочных эффектов, характерных для холиномиметических средств и разрешен к применению в ряде европейских стран и России. Вместе с тем необходимо отметить, что ряд клиницистов осторожно относятся к перспективам применения мемантина, поскольку основной биомишенью его действия является фенциклидиновый сайт NMDA-канального комплекса, взаимодействие с которым определяет побочные психотомиметические эффекты таких препаратов как дизоцилпин (*Dizocilpine*, МК-801).

2. Вещества способные опосредованно стимулировать активацию не-NMDA рецепторов. Другими словами, соединения не способные проявлять собственную эксайтотоксичность, но усиливающие ответ AMPA/Каинатных рецепторов на действие эндогенного глутамата. К числу подобных препаратов можно привести группу т.н. «ампакинов», соединений действующих на отдельный сайт AMPA-рецептора и снижающих его десенситизацию за счет положительной модуляции ответов агонистов AMPA-рецептора. Показано, что препарат CX516, в испытаниях на пожилых людях существенно улучшает один из показателей когнитивных функций – т.н. «отложенную память» (*delayed recall*). Ряд его производных и аналогов (в частности, препарат амплекс, *Amplex* фирмы Cortex), в опытах на лабораторных животных показали даже более высокие когнитивно-стимулирующие свойства чем CX516 [41]. Вероятно подобный механизм действия имеют некоторые производные тиомочевин, проявившие высокие когнитивно-стимулирующие свойства на животных моделях БА [42].

3. Соединения действующие на глициновый участок NMDA-рецептора. В частности, препарат D-цикloserин (*D-Cycloserine*, фирма Searle), являющийся частичным агонистом глицинового Б-сайта находился на 2-й фазе клинических испытаний на больных БА.

Помимо указанных стратегических направлений поиска в последние годы получены положительные результаты предварительных клинических испытаний для отдельных препаратов, имеющих выраженную специфичность в отношении глутаматэргической системы ЦНС:

– Препарат сабелюзол (*Sabeluzole*, R58735 или *Reminyl*<sup>TM</sup> фирмы Janssen Pharmaceuticals). В опытах на животных и на добровольцах проявил способность улучшать память и обучаемость. Проходил III-фазу клинических испытаний. Проявляет свойства антагониста Glu-R. Нейропротекторное действие препарата связывают с его свойством блокатора глутамат-индуцированного входа кальция и недавно выявленной способностью к стабилизации цитоскелета нервных клеток. В настоящее время, однако, клинические испытания сабелюзола приостановлены.

– Отечественный лекарственный препарат димебон (*Dimebon*), применяемый в отечественной клинической практике как антигистаминное средство. Этот препарат показал выраженную анти-NMDA ( $ED_{50} = 42 \text{ mg/kg}$  в.б.), анти-кальциевую активность ( $IC_{50} = 57 \mu\text{M}$ ) и свойства ингибитора АХЭ и БуХЭ ( $IC_{50} = 42 \mu\text{M}$  и  $7.9 \mu\text{M}$  соответственно) в опытах *in vitro* [43], а также выраженные когнитивно-стимулирующие свойства в экспериментах *in vivo* на нейротоксикологической модели БА [44]. К предстоящему времени димебон успешно прошел пилотные клинические испытания на больных БА и заявлен в качестве нового средства для лечения БА [45].

– Природный гликозид гастродин (*Gastrodin*). Этот препарат, выделяемый из растения *Gastrodia elate* и применяемый в китайской медицине показал в опытах на культуре SY5Y способность блокировать глутамат-индуцированный захват кальция. Рекомендован для дальнейших испытаний в качестве нейропротектора на больных БА и сосудистой деменцией.

– Таурин (*Taurine*) проявляет свойства протектора глутаматной токсичности, по механизму блокады глутамат-индуцированного захвата кальция. Интересно, что его близкий аналог  $\beta$ -аланин наоборот увеличивает уязвимость нейронов к нейротоксическому действию ВАК и  $AP\beta$  и является т.о. антагонистом протекторного действия таурина.

Структуры вышеуказанных соединений приведены на рисунке 6.

Новым направлением поиска препаратов для терапии нейродегенеративных расстройств, в т.ч. БА, являются лиганды

метаботропных глутаматных рецепторов (mGluR), которые в отличие от NMDA и AMPA/Каинатных рецепторов не связаны непосредственно с ионными каналами, а участвуют в регуляции внутриклеточного кальция через G-белок и системы вторичных мессенджеров. Выделяют 3 группы mGluR: рецепторы I-группы (1 и 5 подтипы mGluR) стимулируют гидролиз фосфоинозотида и связанную с этим процессом иммобилизацию ионов  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных пулов, а рецепторы II (2 и 3 подтипы mGluR) и III групп (4, 6-8 подтипы mGluR) ингибируют аденилатциклазу, что приводит к снижению содержания циклической АМФ. Считается, что активация I-группы mGluR увеличивает нейрональное возбуждение, а активация II и III групп снижает возбудимость нейронов [46]. С учетом высокой гетерогенности популяции mGluR и их различной локализации на пре- и пост-синаптической мембране в различных участках мозга становится понятным почему лиганды mGluR способны проявлять как нейропротекторные, так и нейротоксические свойства. На основании имеющегося в настоящее время большого числа экспериментальных данных возможно, тем не менее, сделать некоторые предварительные выводы об основных тенденциях в свойствах лигандов mGluR:

Агонисты I типа mGluR – потенцируют эксайтотоксичность, но в то же время стимулируют процессинг APP с образованием секретурной формы  $sAPP\alpha$ . Антагонисты mGluR-I, как правило, нейропротекторы. Таким образом, роль лигандов этой группы mGluR представляется двойственной.

Агонисты II типа mGluR в большинстве описанных случаев проявляют нейропротекторные свойства, но это зависит во многом от синаптической локализации их рецепторной мишени.

Агонисты III типа – проявляют выраженные нейропротективные свойства и по своей функции аддитивны к действию антагонистов NMDA - рецепторов.

В заключении этого раздела отметим оригинальную гипотезу, высказанную недавно автором теории эксайтотоксичности J.W. Olney, рассматривающую БА как результат гипofункции NMDA-рецепторов и предполагающую принципиально новую терапевтическую стратегию поиска

анти-альцгеймеровских препаратов на основе соединений, способных блокировать развитие гипofункции этой группы рецепторов [47].

### **2.3.2. Подходы к созданию препаратов, блокирующих кальциевую токсичность АРβ.**

Кальциевая гипотеза старения и деменции и глутаматная теория БА имеют много общего. Ключевым элементом обеих теорий является твердо установленный феномен цитотоксического действия «гипернормальных» концентраций кальция в результате нарушения метаболизма ионов кальция в нервной клетке. В последние годы было показано, что мутация в гене белка пресенилина 1 (PS1) при БА является основным генетическим фактором, определяющим изменение регуляции гомеостаза кальция эндоплазматическим ретикулом в ответ на различные стимулы [48]. С возрастом роль кальций-индуцированной гибели клеток возрастает в связи со значительными потерями в содержании кальций-связывающих белков, в частности, белка кальбинина (calbindin-D<sub>28k</sub>) в базальных холинэргических нейронах.

Ранее уже говорилось о возможном механизме нейротоксичности АРβ, опосредуемой через кальциевые каналы, связанные с глутаматными рецепторами. Ниже будут рассмотрены основные данные, касающиеся механизмов и способов коррекции действия АРβ на потенциал-зависимые кальциевые каналы (ПЗСаК). Хотя исследование молекулярных механизмов кальций-опосредованной нейротоксичности АРβ ведется уже давно, до настоящего времени в этом вопросе остается много не выясненных аспектов. В токсическом действии АРβ на нервные клетки выделяют, как правило, две стадии: начальную – кальций-независимую фазу, которая может занимать несколько часов, и позднюю – кальций-зависимую стадию, которая развивается в течении нескольких дней [49]. При этом нейротоксичность фрагмента АРβ (25-35) эффективно предотвращается блокаторами L-типа, но не блокаторами N- или P/Q- типов кальциевых каналов. Отмечена связь этого процесса с уровнем свободно-радикальных метаболитов (СРМ) в клетках. Показано, что вещества-блокаторы СРМ предотвращали как накопление СРМ,

так и потенциал-зависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$ , а специфические блокаторы ПЗСаК оказывали действие только на вход  $\text{Ca}^{2+}$ , но не влияли на уровень СРМ [50]. Исходя из этого можно предположить, что ранняя (кальций-независимая) стадия токсического действия АРβ, регистрируемая по снижению ред-окс активности внутриклеточных систем, связана с инициацией СРМ и ПОЛ, что, в свою очередь, вызывает нарушение функционирования мембранных механизмов, в частности, деполяризацию ПЗСаК и вход в клетку ионов кальция. Последний процесс является кальций-зависимым и регистрируется как поздняя стадия токсичности АРβ. Параллельно этим процессам может идти изменение кальциевой проницаемости глутаматных рецептор-канальных комплексов.

Альтернативой (или дополнительным элементом к) действию АРβ на «эндогенные» кальциевые каналы является гипотеза о том, что АРβ способен сам образовывать новые («экзогенные») кальций-проницаемые каналы, и т.о. непосредственно вызывать кальций-индуцированную гибель клеток. Хотя до настоящего времени такой механизм действия АРβ показан лишь в экспериментах *in vitro* на модельных системах бислойных липидных мембран [51], теоретическое моделирование структуры подобных АРβ-индуцированных кальциевых каналов показывает возможность их формирования в условиях реальных мембран нейронов [52].

Таким образом, есть все основания считать, что практически любые методы, направленные на стабилизацию гомеостаза кальция в нейроне, будут оказывать положительное действие не только на общие процессы старения и гибели клеток, но и на специфическое нейродегенеративное действие АРβ. В этой связи анти-кальциевая стратегия противодействия нейротоксичности АРβ представляется вполне обоснованным и перспективным направлением в поиске нейропротекторов для БА.

Помимо уже отмеченных выше препаратов, анти-кальциевое действие которых реализуется путем регуляции глутаматных рецепторов, к числу

протекторов кальциевой токсичности АРβ можно отнести соединения действующие на следующие биомишени:

- Блокаторы L-типа кальциевых каналов. В частности, препарат нимодипин (*Nimodipin*), нейропротекторные и когнитивно-стимулирующие свойства которого показаны на экспериментальных моделях БА и в первичных клинических испытаниях.

- Антагонисты рианодиновых (ryanodine) рецепторов, которые играют критическую роль в регуляции интранейронального кальция, будучи ответственны за высвобождение ионов кальция из внутриклеточных пулов.

- Селективные агонисты серотониновых рецепторов (5-HT<sub>1A</sub>), в частности препарат 8-ОН-DРАТ, который вызывает гиперполяризацию постсинаптической мембраны и, таким способом блокирует вход кальция в клетку в результате деполяризации мембраны, индуцированной активацией NMDA-рецепторов либо действием АРβ на ПЗСаК.

### **2.3.3. Антиоксидантная стратегия поиска препаратов для лечения и предупреждения БА.**

Тесная взаимосвязь БА и феномена накопления свободно-радикальных метаболитов (СРМ) в клетках ЦНС отмечена уже давно и является основанием для теории окислительного стресса БА. В настоящей работе не предполагается подробно осуждать эту проблему вследствие огромного объема публикаций в этой области, анализ которых проведен в многочисленных обзорных статьях, в частности, в работе Бэла [53]. Представляется необходимым, однако, выделить те ключевые моменты участия СРМ в формировании альцгеймеровской патологии, которые могут иметь определяющее значение в плане выбора стратегии поиска и создания эффективных препаратов для лечения БА.

Во-первых, отмечено, что СРМ образуются как в результате прямого действия АРβ на клетки ЦНС, так и в результате активации клеток микроглии в областях формирования амилоидных бляшек и нейрофибрилярных клубков. При этом происходит образование целого ряда кислород-содержащих радикальных метаболитов (ОСРМ), таких как пероксидные и нитроксидные

радикалы, а также продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Значительную роль в этих процессах играет внутриклеточный кальций, который активирует метаболические реакции в митохондриях, приводящие к образованию радикалов  $O_2^{\cdot-}$ , а в форме комплекса с кальмодулином активирует NO-синтазу генерирующую радикалы NO $\cdot$ . Продукт взаимодействия этих радикалов – пероксинитрит ион ( $NO_3^{\cdot-}$ ) способен индуцировать ПОЛ, а также инициировать деградацию внутриклеточных белков и нуклеиновых кислот. Важная каталитическая функция в процессе образования гидроксильных радикалов из перекиси водорода отводится ионам железа.

Нервные клетки имеют эндогенную систему защиты от избыточного уровня ОСРМ, состояние которой в существенной мере определяет результат действия окислительного стресса на клетку и организм в целом. Ключевыми элементами этой защитной системы являются ферменты детоксикации ОСРМ, в частности глутатион-пероксидаза (ГТП) и каталаза. Индукция этих ферментов регулируется в значительной степени фактором ядерной транскрипции NF-кВ.

На рис. 7 схематически представлена взаимосвязь процессов формирования ОСРМ и изменения концентрации внутриклеточного кальция при действии амилоида АРβ.

Анализируя возможную стратегию действия протекторов окислительного стресса при БА можно выделить два альтернативных направления: применение «внешних» антиоксидантов (экзогенных или эндогенных), блокирующих действие ОСРМ, и/или стимуляция внутриклеточных антиоксидантных систем. В рамках данного обзора мы рассмотрим общие подходы и некоторые конкретные препараты, которые предлагаются в настоящее время для лечения и предотвращения БА, в частности, для нивелирования и защиты от окислительного стресса, стимулируемого действием патогенного пептида АРβ.

### ***Подходы, основанные на использовании «внешних» антиоксидантов.***

Общими структурными требованиями к соединениям, претендующим на

роль эффективных антиоксидантов (блокаторов СРМ), является наличие функциональных заместителей легко акцептирующих радикальные группы (или свободный электрон) и возможность делокализации заряда на молекуле антиоксиданта с образованием стабильного, малореакционноспособного продукта. С учетом специфики патологии БА, локализованной в ЦНС необходимо, чтобы антиоксиданты могли легко проникать в мозг через гемато-энцефалический барьер.

Анализ связи между структурой и антиоксидантной активностью соединений позволяет выделить несколько базовых структур, удовлетворяющих этим требованиям. Во первых, это ароматические спирты с липофильными заместителями [54]. К этой группе соединений можно отнести витамин Е, стероидные гормоны и их синтетические аналоги. Улавливание радикальных частиц происходит с участием гидроксильной группы этих соединений, а образующийся достаточно стабильный метаболит затем регенируется при взаимодействии с аскорбиновой кислотой (витамином С). Схема этих процессов представлена на рис. 8. Во-вторых – это гидрофобные производные индола, в частности мелатонин и его аналоги.

#### *Витамин Е. и его функциональные аналоги.*

Принято считать, что общее цитопротекторное действие витамина Е ( $\alpha$ -токоферол) осуществляется преимущественно по анти-оксидантному механизму, что в значительной степени определяет его применение как герантопротектора. Нейропротекторные свойства витамина Е были подробно исследованы на различных экспериментальных моделях БА. Есть основания считать, что помимо «чистого» анти-оксидантного действия витамин Е может проявлять анти-апоптотические свойства, что дополнительно усиливает его нейропротекторный потенциал. В настоящее время Витамин Е, в отличие от другого анти-оксиданта идебенона (*Idebenone*) успешно проходят расширенные клинические испытания на больных БА. Выявлено, что витамин Е может существенно замедлять развитие этой патологии у больных с умеренной формой БА.

Среди других анти-оксидантов, имеющих реальные перспективы для клинического применения при некоторых формах деменции, можно отметить следующие препараты природного и синтетического происхождения:

– Экстракт Гинко Билоба (*Ginkgo Biloba*, *EGB 761*). Препарат проявляет нейропротекторное действие, связываемое с его анти-оксидантной активностью, умеренные когнитивно-стимулирующие свойства, и, что особенно важно, но пока трудно объяснимо, – это выраженные трофические и репаративные свойства на препаратах культуры клеток подвергнутых действию АРβ [55]. Интересно, что по заключению исследователей, в частности д-ра R.Quirion, проводивших сравнительный анализ активности различных коммерческих препаратов Гинко Билоба, наиболее выраженной активностью обладают препараты французского производства, а американские препараты имели, как правило, нулевую активность. Предполагается, что нейропротекторные свойства *EGB 761* связаны со способностью флаваноидного компонента экстракта блокировать радикалы NO<sup>•</sup>, а также ингибировать NO-стимулируемую активность протеиназы С.

– Нейрострол (*Neurostrol*), растительный тритерпен. Его анти-оксидантные свойства в 15 раз более сильно выражены чем у α-токоферола (витамина Е). Обладает также противовоспалительной активностью. Установлена значительная стимулирующая активность этого препарата на память, обучаемость и психомоторную активность на экспериментальных животных моделях деменции. Препарат рекомендован к дальнейшим клиническим испытаниям на больных БА.

– Запатентованы в качестве эффективных антиоксидантов и проходят преклинические испытания синтетические аналоги витамина Е препараты раксофеласт (*Raxofelast*) и MDL-74180DA.

Структуры большинства отмеченных антиоксидантов приведены на рис. 9.

*Стероидные гормоны (СГ) и их аналоги.*

Отмечено, что развитие гормональной дисфункции и БА во многом протекают параллельно на фоне общего процесса старения организма. В

частности, установлена взаимосвязь между снижением уровня эстрогенов и риском развития БА. Ключевым вопросом, тем не менее остается проблема установления конкретных механизмов влияния СГ на устойчивость нервных клеток к дегенерации, вызванной патогенетическими факторами БА, в частности, действием АРβ.

Известно, что СГ могут оказывать регулирующее действие на нервные клетки по нескольким принципиально отличающимся механизмам. Первый, классический, предполагает взаимодействие СГ со специфическими гормональными рецепторами, что приводит к активации последних и транслокации в ядро, где они действуют как факторы транскрипции, регулируя экспрессию генов. В последние годы обнаружено, что отдельные СГ могут синтезироваться *de novo* в нервных клетках и модулировать нейромедиаторную передачу путем прямого взаимодействия с рецепторами нейромедиаторов. Такие СГ, к числу которых относится и 17-β-эстрадиол, получили название нейроактивных стероидов. Как уже отмечено выше, еще один способ воздействия СГ на нервные клетки связан с их высокими анти-оксидантными свойствами. Таким образом, анализируя результаты по нейропротекторным свойствам СГ в условиях развития нейропатологии типа БА, необходимо иметь ввиду множественность возможных механизмов влияния СГ на гомеостаз нервных клеток.

Исторически первой и одной из наиболее активно разрабатываемых групп нейропротекторов в ряду СГ являются эстрадиол и его производные. В ряде работ показано, что 17-β эстрадиол (17βЕ), его изомер 17-α эстрадиол (17αЕ) и ряд их производных способны эффективно блокировать внутриклеточную аккумуляцию ОСРМ и таким путем защищать нейроны от токсического действия факторов, инициирующих окислительный стресс. В прямых экспериментах на культуре нервной ткани было установлено, что помимо антиоксидантного действия 17βЕ способен снижать образование АРβ40 и АРβ42 из АРР и блокировать нейротоксическое действие АРβ(25-35) [56].

Наиболее перспективными в ряду производных и аналогов эстрогенов представляются следующие препараты:

– трансдермальная форма  $17\beta\text{E}$  (*Estraderm*), разработанная фирмой Novartis, которая значительно улучшает когнитивные функции у женщин в период менопаузы.

– Синтетические аналоги  $17\alpha\text{E}$  – препараты *J811* и *J861*, разрабатываемые фирмой JenaPharm, которые проявили высокую антиоксидантную активность в экспериментах *in vitro* (и в этой связи получили название “scavestrogens”), а также способность стимулировать когнитивные функции на животной нейротоксикологической модели БА. Имеются основания считать, что нейропротекторные эффекты этих соединений, не связаны с их влиянием на процессы транскрипции [57].

– Ряд вновь синтезированных конъюгированных эстрогенов, обладающих более высокими анти-оксидантными свойствами чем  $17\beta\text{E}$  [58].

В последнее время значительно возрос интерес к возможности проявления анти-оксидантных и нейропротекторных свойств у представителей другой группы СГ - андрогенов. В частности, на нейрональных культурах показано, что действие тестостерона увеличивает образование секретируемой формы  $s\text{APP}\alpha$  и снижает образование патогенной форм  $\text{A}\beta$  [59]. Не исключено, что андрогены способны регулировать функционирование NMDA-рецептор канального комплекса в ЦНС и таким образом проявлять нейростероидную активность [60].

#### *Мелатонин и его аналоги.*

Как одно из наиболее перспективных направлений поиска средств предупреждения и коррекции нейродегенеративных расстройств типа БА рассматривается в последнее время создание препаратов на основе мелатонина, его производных и аналогов.

Мелатонин является эндогенным гормоном, вырабатываемым в мозге шишковидной железой из N-ацетил-серотонина (Рис. 10). Основной функцией мелатонина в организме считается регулирование циркадных ритмов

(день/ночь). В последние годы было установлено, что мелатонин способен оказывать выраженное протекторное действие против развития окислительного стресса ЦНС различной этиологии. Химическая структура мелатонина позволяет ему взаимодействовать с кислородным и с гидроксильным радикалами, давая в итоге нетоксичное, метаболизируемое в организме соединение – N<sup>1</sup>-ацетил-N<sup>5</sup>-формил-5-метоксикинурамин (рис.11), а также с пероксинитритными метаболитами ОСРМ, с образованием гидроксильных малотоксичных продуктов (преимущественно 6-гидроксимелатонина). Отмечено митохондрии-протекторное действие мелатонина. В прямых экспериментах на культуре клеток и в опытах на животных показано, что помимо прямого антиоксидантного действия по отношению к ОСРМ мелатонин регулирует процессинг APP, ингибирует образование амилоидных фибрил блокируя образование β-складчатых агрегатов, защищает нервные клетки от иксайтотоксичности ВАК и нейротоксического действия APβ, а также проявляет анти-апоптотические свойства [61]. Таким образом, мелатонин проявляет комплексное нейропротекторное действие на клетки, сочетающее специфический анти-амилоидный компонент и неспецифический (герантопротекторный) эффект, обусловленный высокими радикал-блокирующими свойствами этого соединения. Наличие подобного комплекса защитных функций, а также отмеченное снижение уровня мелатонина с возрастом и при развитии БА позволяют предполагать наличие важной «сдерживающей» функции этого эндогенного биорегулятора в патогенезе БА.

В плане развития фармакологического подхода к терапии и предупреждению БА важно, что мелатонин свободно проникает через гемато-энцефалический барьер в мозг и практически не имеет побочных эффектов как при разовом, так и при систематическом применении. В настоящее время мелатонин, который зарегистрирован в США и в большинстве европейских стран как пищевая добавка, предлагается к расширенным клиническим испытаниям на больных БА. В то же время, необходимо заметить, что мягкое действие мелатонина как нейропротектора, очень привлекательное в плане

превентивной терапии, очевидно не позволит эффективно применять его как лекарственный препарат на умеренных и глубоких стадиях БА. В этой связи, остается крайне актуальным поиск потенциальных аналогов мелатонина, более выраженно проявляющих нейропротекторные и когнитивно-стимулирующие свойства.

Значительный интерес в этом плане представляют полученные в последнее время результаты по эндогенному предшественнику мелатонина – N-ацетил-серотонину (НАС) и его аналогам. В частности, установлено, что НАС эффективно ингибирует ПОЛ, проявляет более выраженные ОСРМ-блокирующие свойства [62] и более сильную анти-амилоидную активность [63], чем мелатонин, сохраняя при этом положительные фармакокинетические и токсикологические характеристики последнего.

В литературе имеется много данных о синтетических структурных аналогах мелатонина и НАС. В частности, высокий потенциальный терапевтический потенциал отмечен у индол-3-пропионовой кислоты. В качестве структурно-закрепленного аналога мелатонина можно рассматривать препарат димебон, когнитивно-стимулирующие свойства которого были охарактеризованы выше.

### ***Подходы, основанные на активации эндогенных факторов защиты от окислительного стресса.***

Важным звеном регуляции эндогенных механизмов защиты клетки от окислительного стресса является фактор ядерной транскрипции NF-κB, который первоначально был охарактеризован как стимулятор экспрессии гена κ-звена иммуноглобулинов в B-лимфоцитах. В последние годы показано, что в ответ на окислительный стресс, вызываемый ОСРМ клетка отвечает усилением образования NF-κB. До настоящего времени, однако, предметом дискуссии остается вопрос какую функцию: нейропротекторную или нейротоксическую выполняет этот фактор, и какие молекулярные механизмы обеспечивают его действие на внутриклеточные антиоксидантные системы [64]. Сам факт стимулирования ОСРМ образования NF-κB и наличие корреляции между

уровнем этого фактора и содержанием ОСРМ рассматривается как показатель деструктивного потенциала NF-κB. В то же время, в экспериментах на клоне клеток PC12, устойчивых к нейротоксическим эффектам Aβ, установлено наличие у них более высокого уровня NF-κB, чем у клеток «нормальных» клеток PC12, уязвимых к деградирующему действию Aβ. При этом показано, что Aβ-устойчивость клеток резко снижается при добавлении препаратов подавляющих активность NF-κB, в частности глюкокортикоидов, либо при стимуляции экспрессии фактора IκBα, являющегося ингибитором NF-κB. Высказано предположение, что устойчивость нервных клеток к Aβ связана с высоким внутриклеточным уровнем NF-κB, который транслоцируясь в ядро клетки вызывает индукцию генов, отвечающих за синтез структур, обеспечивающих защиту клетки от нейротоксического действия Aβ [65]. В качестве вероятных кандидатов на эту роль рассматриваются ферменты каталаза и глутатионпероксидаза, для которых отмечено повышенное содержание в клетках устойчивых к Aβ.

Таким образом, можно предположить, что, по крайней мере в отношении амилоидного пептида Aβ, стимуляция активности фактора NF-κB приводит к увеличению выживаемости нервных клеток, и т.о. может быть использована в качестве стратегии анти-оксидантной защиты. Необходимо однако еще раз отметить, что на других моделях окислительного стресса, в качестве положительного эффекта рассматривается подавление активности NF-κB.

#### **2.3.4. Подходы, связанные с воздействием на процессы апоптоза и нормализацией функций митохондрий (митохондриальные протекторы).**

Апоптоз, как явление запрограммированной гибели клеток, является одним из фундаментальных механизмов саморегуляции роста и развития организмов. Этот феномен присущ клеткам различных органов и тканей, и представляет собой совокупность широкого спектра внутри- и межклеточных реакций. Процессы апоптоза играют определяющую роль в развитии целого ряда НЗ и возможность их регуляции в нервных клетках рассматривается как перспективное, но пока явно не реализованное на практике направление в

фармакологии нейропатологий [66]. Во многом это объясняется тем, что процессы апоптоза могут «запускаться» и регулироваться огромным числом различных эндогенных и экзогенных факторов, что крайне осложняет возможность направленного и специфического воздействия на эти процессы в определенных группах клеток. В частности, апоптоз может инициироваться рядом нейромедиаторов (ВАК, дофамин), модуляторами процессов фосфорилирования белков, нейротропными факторами, внешними стимулами (ионизирующее облучение), снижением экстраклеточной концентрации ионов калия или увеличением внутриклеточного кальция и пр. В ряду эндогенных регуляторов апоптоза в свою очередь выделяют триггеры (например, фактор Аraf-1), “усилители” (цитохром С), активаторы (белки групп Вах, Bad, Diva, DP5) и ингибиторы (белки семейств Bcl-2 и Bcl-x<sub>L</sub>) апоптоза. Принято считать, что одним из ключевых звеньев апоптоза является активация группы цистеиновых протеаз, т.н. каспаз, непосредственно инициирующих процессы фрагментации ДНК [67]. Условно, весь каскад апоптоза можно разделить на три фазы: пре-митохондриальная, на которой происходит формирование и активация про-апоптотических сигналов, митохондриальная – в ходе которой происходит высвобождение из митохондрий эффекторов апоптоза, и пост-митохондриальная, в рамках которой реализуется действие активированных каспаз и нуклеаз и формируется морфологическая картина апоптоза.

В рамках данного обзора не ставилась задача сколько-нибудь целостного описания имеющихся представлений о механизмах развития и способов воздействия на процессы апоптоза, ввиду исключительно большого объема материала на эту тему. Представляется необходимым, однако, хотя бы кратко проанализировать ряд современных подходов к блокированию процессов апоптоза при БА, связанных со спецификой этого нейродегенеративного заболевания.

Сам факт развития процессов апоптоза при БА считается достоверно установленным событием. Что же касается конкретных механизмов развития и того какую роль играет апоптоз в патогенезе БА, то имеющиеся в литературе данные позволяют построить несколько альтернативных гипотез.

В настоящее время принято считать, что развитие наследственных, проявляющихся в более раннем возрасте, форм болезни Альцгеймера связано с наличием ряда хромосомных мутаций. В частности, установлены мутации в 1-й и 14-й хромосомах, которые связывают с формированием мутантных форм белков пресенилинов PS2 и PS1, а также в 21-й хромосоме, кодирующей синтез APP. С другой стороны, в экспериментах на культурах клеток было установлено, что клетки, имеющие более высокий уровень мутантных форм PS2 и PS1, а также клетки, где выработка PS1 была существенно снижена в результате ингибирующего воздействия про-апоптотических факторов p53 и p21, значительно легче подвергаются апоптозу, чем клетки содержащие нормальные формы пресенилинов. При этом было показано, что мутантные формы PS1 и PS2 расщепляются ферментами семейства каспаз-3 по участкам отличным от мест расщепления «нормальных» пресенилинов [68]. Это дало основание высказать гипотезу, что в отличие от нормальных пресенилинов, выполняющих в нервных клетках трофические функции, мутантные формы PS1 и PS2 подвергаются альтернативному протеолизу под действием каспаз-3, что увеличивает уязвимость нервных клеток к развитию апоптотических процессов. Результатом реализации этой гипотезы может явиться стратегия нового терапевтического способа воздействия на процессы апоптоза при БА, заключающаяся в блокировании расщепления мутантных форм пресенилинов каспазами.

Альтернативой этому являются представления о том, что роль мутаций в пресенилинах сводится к увеличению образования патогенных форм амилоидного пептида A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 и A $\beta$ 43, которые вызывают накопление кальция внутри клеток и, как следствие, - кальций-индуцированный выход из митохондрий цитохрома C, стимулирующего трансформацию каспаз в активную форму. Таким образом, в рамках этих представлений специфика апоптоза при БА определяется лишь спецификой иницирующего фактора – бета-амилоидным пептидом, а затем процесс протекает по “классической” схеме. В этой связи, потенциальный терапевтический – антиальцгеймеровский эффект могут проявлять препараты, которые воздействуют на основные

функциональные звенья апоптоза. В качестве примера можно привести антиапоптотическое действие эстрогенов, которые существенно стимулируют экспрессию белка Bcl-x<sub>L</sub> и ингибируют внутриклеточный протеолиз каспазами, что хорошо коррелирует с их анти-амилоидным действием в экспериментах на культуре клеток гиппокампа.

Как было установлено в последние годы, важную роль в развитии и регуляции апоптоза играют митохондрии и связанные с ними регуляторные факторы пептидной природы. Хотя до настоящего времени большинство вопросов, касающихся конкретных молекулярных механизмов и роли отдельных митохондриальных систем в реализации апоптотического каскада остаются открытыми, можно выделить в этом процессе некоторые ключевые звенья, воздействие на которые представляется, на настоящий момент, наиболее перспективным с точки зрения конструирования новых фармакологических средств, которые можно было бы определить как митохондриальные протекторы.

Принципиально важным звеном на “митохондриальном” участке апоптотического каскада являются кальций-активируемые митохондриальные проницаемые временные поры (“mitochondrial permeability transition pores”, мегапоры, МП), которые способны обеспечить выход из митохондрий как ионов кальция, так и достаточно крупных структур с молекулярной массой до 1.5 kDa. Структурно МП представляют собой сложный полимолекулярный комплекс, включающий компоненты внешней и внутренней мембран митохондрии. Считается, что внешнюю часть МП образует потенциал-зависимый ионный канал (т.н. порин), с которым связываются антиапоптотические белки семейства Bcl-2, а также, вероятно, бензодиазепиновый рецептор. Внутреннюю часть МП образует переносчик адениновых нуклеотидов (ПАН), с которым могут взаимодействовать про-апоптотические белки семейства Bax. По всей видимости, в регуляции свойств МП принимают также участие ферменты креатинкиназа и гексокиназа. В “нормальном” (низкопроводимом) состоянии, которое реализуется в диапазоне физиологических концентрациях кальция в цитозоле ( $[Ca^{2+}]_c$ ), наблюдается обратимое,

регулируемое мембранным потенциалом открытие-закрытие МП, что обеспечивает гомеостаз кальция в клетке. При этом предполагается следующий механизм: вход  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондрии сопровождается выходом протонов, что увеличивает рН в матриксе и как следствие открытие МП. Это, в свою очередь, приводит к коллапсу митохондриального протонного градиента и мембранного потенциала, обратный вход  $\text{Ca}^{2+}$  через МП и ацидификацию матрикса. Ацидификация матрикса вызывает закрытие МП. Функционирование митохондриальной дыхательной цепи восстанавливает протонный градиент, что позволяет ионам кальция вновь поступать в митохондрию и т.д. В условиях такого состояния митохондрии выполняют роль обратимого буфера некоторых “избыточных” концентраций кальция.

Если же концентрация  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  начинает превышать некоторый пороговый уровень, то согласно гипотезе Николса, которая была сформулирована для описания иксайтотоксического действия глутамата [69], но, очевидно, может быть развита и на нейротоксическое действие АРβ, происходит следующее: значительный избыток  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  приводит к накоплению кальция в митохондриях и массиванному образованию СРМ, которые вызывают деградацию кальциевой АТФ-азы. Это, в свою очередь, снижает способность клеточной мембраны на выведение ионов кальция и приводит к дальнейшему увеличению  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  и росту его концентрации в митохондриях. Стремительное увеличение концентрации кальция приводит к деполяризации мембран митохондрий и необратимому открытию МП, что сопровождается выходом из митохондрий ионов кальция и ряда высокомолекулярных соединений, в частности, активаторов каспаз: цитохрома С и фактора Ареф-1. Именно этот процесс считается предопределяющим дальнейшую смерть клетки.

Анализ механизмов функционирования МП приводит к несколько парадоксальному выводу: можно ожидать, что в условиях наличия патологических факторов (АРβ, иксайтотоксическое действие ВАК, оксиданты и пр.) ингибирование захвата  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями и/или блокирование МП может защищать клетки от развития процессов апоптоза (и некроза). Экспериментальное подтверждение этому было получено недавно в работе

Stour A. с соавторами [70], показавшими что реализация иксайтотоксичности ВАК требует захвата  $Ca^{2+}$  митохондриями и может быть успешно блокирована такими протонифорами и разобщителями окислительного фосфорилирования как, например, производное фенилгидразона FCCP (рис. 12).

Эффективное воздействие на МП может быть оказано также путем регулирования свойств одного из компонентов этого комплекса – ПАН. Так, в работе [71] было показано, про-апоптотический белок Вах и ПАН кооперативно стимулируют увеличение проницаемости МП, что ведет к гибели клеток. При этом взаимодействие ПАН с фиксаторами закрытого состояния МП – бонгкрековой кислотой и циклоспорином-А предотвращало Вах-индуцированный апоптоз, в то время как действие атрактилозида, взаимодействующего с ПАН по участку, фиксирующему открытое состояние МП, потенцировало Вах-индуцированный апоптоз. Потенциальные возможности имеет также модулирование взаимодействия митохондрий с анти-апоптотическим белком Bcl-2, что было продемонстрировано недавно на примере протекторного действия препарата Дантролена (рис.12), применяющегося в медицинской практике в качестве мышечного релаксанта.

В заключение этого раздела необходимо отметить, что, с возрастом происходит снижение порога для кальций-индуцированного открытия МП в митохондриях клеток мозга [72]. Это делает особенно важным и перспективным поиск эффективных блокаторов МП – как нового типа нейропротекторов для лечения и предупреждения широкого круга возрастных НЗ, связанных с митохондрией-опосредованной гибелью нервных клеток.

### **3. Препараты, компенсирующие дефицит холинэргической системы, путем активации других нейромедиаторных систем и стимулирующие нейротрофические функции нервных клетки.**

Как отмечалось ранее, снижение активности холинэргической и глутаматэргической систем является основным проявлением нейромедиаторной патологии при БА. Выше были приведены примеры препаратов действующих по механизму «прямой компенсации» гиподисфункций

холин- и глутаматэргических систем. Вместе с тем, к настоящему моменту описан целый ряд веществ, которые способны существенным образом компенсировать дефицит указанных нейромедиаторных связей и проявлять выраженные когнитивно-стимулирующие и нейропротекторные свойства за счет активации других нейромедиаторных систем а также наличия собственных нейротрофических функций.

К числу соединений с таким «альтернативным» механизмом анти-альцгеймеровского действия можно отнести следующие препараты:

*Лиганды ГАМК-эргической системы:*

- Препарат *CGP-36742* (Ciba-Geiger) – является антагонистом ГАМК-Б рецепторов, проявляет выраженные когнитивно-стимулирующие свойства на моделях БА.
- Суритозол (*Suritozole, MD 26 479*, компания Hoechst-Marion Roussel). Является агонистом бензодиазепинового сайта ГАМК-А рецепторов. Проходил клинические испытания на больных БА. В настоящее время по данным полученным из интернета клинические испытания препарата временно приостановлены.

*Эффекторы моноаминэргических систем, в частности ингибиторы MAO.*

- Препарат Депренил (*L-deprenyl, Selegiline, Eldepryl*), - производное пропаргиламина, селективный необратимый ингибитор моноаминоксидазы формы Б (MAO-Б). Применяется в клинической практике в качестве антипаркинсонического препарата. В последние десятилетие получен ряд противоречивых данных, касающихся влияния депренила на течение БА. В частности отмечено, что депренил может улучшать память и улучшать когнитивные функции в опытах на животных. Что касается механизма действия депренила, то установлено, что помимо ингибирования MAO-Б депренил в опытах на культуре защищал клетки от токсического действия APβ и блокировал образование NO (возможно, ингибируя NO-синтазу). При проведении 2-х летних клинических испытаний с двойным слепым контролем было установлено, что применение депренила, и его комбинации

с витамином Е существенно замедляет прогресс в развитии БА [73].

- В качестве потенциального средства для предупреждения развития нейродегенеративных процессов при деменциях типа БА рассматривается препарат Лазабемид, сочетающий свойства антиоксиданта и ингибитора MAO-B.

*Лиганды серотониновых (5HT) рецепторов.*

- *8-OH-DPAT*, селективный агонист подтипа 5-HT<sub>1A</sub> серотониновых рецепторов, защищает клетки от иксайтотоксического действия NMDA. Механизм действия связывают с активацией постсинаптических 5-HT<sub>1A</sub> рецепторов, в результате чего происходит гиперполяризация постсинаптической мембраны, нивелирующая деполяризующий эффект ВАК.
- Ондансетрон (*Ondansetron*), селективный антагонист подтипа 5-HT<sub>3</sub> серотониновых рецепторов. В опытах на животной модели скополамин-индуцированной амнезии проявил способность увеличивать способность к запоминанию и обучению. Предполагается, что когнитивно-стимулирующие свойства ондансетрона обусловлены его способностью потенцировать релиз АХ в гиппокампе и коре. К настоящему времени, однако, получены результаты клинических испытаний этого препарата с двойным слепым контролем, свидетельствующие об относительно слабом терапевтическом эффекте ондансетрона. На стадии лабораторных исследований находился еще один антагонист 5-HT<sub>3</sub>-рецепторов – препарат Мирисетрон (*Miricetron*).

*Ноотропные препараты* также обладают способностью стимулировать когнитивные функции, что позволяет предлагать их в качестве потенциальных средств для лечения БА. В частности, ведутся исследования когнитивно-стимулирующих свойств пирацетама (ноотропила) и его структурных аналогов в ряду 2-пирролидона. Начаты преклинические исследования вещества CGP-500068. Механизм нейро-стимулирующих эффектов этих соединений связан, вероятно, с их действием на ГАМК-эргическую систему.

Структуры некоторых из перечисленных препаратов приведены на рис.

13.

Среди препаратов с комплексным механизмом нейропротекторного и когнитивно-стимулирующего действия можно отметить следующие вещества (рис. 14):

- Пропентофиллин (*Propentofylline*, HWA 285 фирмы Hoechst Marion Roussel). Препарат обладает широким спектром нейропротекторного и когнитивно-стимулирующего действия. Дошел до III стадии клинических испытаний. Основным направлениями действия пропентофила является ингибирование системы обратного захвата аденозина, что приводит к его накоплению в ЦНС и стимулирует активацию A1 и A2 типов аденозиновых рецепторов, блокирующих релиз ВАК. Установлено также, что пропентофиллин стабилизирует внутриклеточный уровень цАМФ- и цГМФ за счет ингибирования соответствующих фосфодиэстераз, стимулирует образование в ЦНС фактора роста нервов, а также подавляет активацию микроглии при дегенеративных процессах, что приводит к снижению уровня СРМ и эндогенных цитотоксических факторов, в частности, цитокинов [74].
- Препарат цитиколин (*Citicoline*), известный как вазо- и нейроиммунотрофический модулятор, способен улучшать память за счет нейротрофического действия и регуляции кровообращения в сосудах головного мозга. Результаты клинических испытаний показали положительное влияние цитиколина на когнитивные функции у пожилых людей.
- Растительный препарат анапсос (*Anapsos*), который представляет собой экстракт из папоротниковых *Polypodium leucomotos*, улучшает когнитивные функции, мозговое кровообращение и биоэлектрическую активность мозга у пациентов с сенильной деменцией. Важно, что положительные эффекты хорошо проявляются у больных с умеренной степенью расстройств и у пациентов с БА.
- Неотрофин (*Neotrofin*, AIT-082, компании NeoTherapeutics Inc.) находится на стадиях IIb/III испытаний на больных БА. Препарат хорошо проникает ГЭБ и улучшает функциональное состояние нервных клеток за счет увеличения уровня нейротрофических факторов по механизму активации гуанилат-

циклазы.

- Церебролизин (*Cerebrolyzin*). Препарат представляет собой комплекс эндогенных аминокислот (до 85%) и пептидов, выделяемый из мозга животных. Применяется в клинической практике для улучшения мозгового кровообращения и стимуляции деятельности мозга. Препарат характеризуется комплексным действием на ЦНС, в частности, у церебролизина установлены ноотропные, нейромодулирующие и нейротрофические свойства, а также способность регулировать метаболические процессы в нервных клетках. Проводимые в последние годы клинические исследования препарата на больных с БА и сосудистой деменцией показали зависимость терапевтического эффекта от длительности применения и стадии заболевания. Отмечено, что лучший терапевтический эффект при хроническом применении церебролизина. В экспериментах *in vitro* установлено, что церебролизин ингибирует кальций-зависимую протеазу калпаин-II, которая участвует в протеолизе ассоциированного с микротрубочками белка МАБ2, имеющем место при БА, а также проявляет анти-иксайтотоксические и анти-оксидантные свойства. Эти результаты позволяют предполагать наличие у церебролизина не только когнитивно-стимулирующего, но и нейропротекторного действия.

#### **4. Ингибиторы нейрофибрилярных образований.**

Наряду с образованием амилоидных бляшек важнейшей патоморфологической чертой БА является наличие в мозге характерных нейрофибрилярных образований (нейрофибрилярных клубков, НФ). Известно, что НФ состоят из парных филаментов, представляющих собой специфические тау-белки ассоциированные с микротрубочками (микротрубочки-ассоциированные тау-белки, МАБ). Установлено, что тау-белки при БА подвергаются целому ряду пост-трансляционных модификаций, в частности, гиперфосфорилированию, гликозилированию и пр. Предполагается, что нарушение процессов фосфорилирования-дефосфорилирования тау-белков, которые обеспечиваются ферментативными системами фосфорил-аз и

фосфатаз, приводит к гиперфосфорилированию МАБ. Эти патологически модифицированные белки вызывают деструкцию «нормальных» микротрубочек, осуществляющих внутриклеточный транспорт и, как следствие, ретроградную дегенерацию нейронов. Точный механизм образования и участия НФ при БА неизвестен, однако имеются многочисленные данные, позволяющие считать гиперфосфорилирование МАБ является ключевой стадией в этом патологическом процессе. Это дает право рассматривать поиск препаратов, действие которых направлено на уменьшение и стабилизацию нормального уровня фосфорилированных тау-белков, как обоснованную стратегию поиска анти-альцгеймеровских препаратов.

В литературе *a priori* рассматривается два альтернативных подхода, которые могут замедлить образование НФ при БА: (I) ингибирование тау-фосфоорилазной активности и (II) увеличение тау-фосфатазной активности. Последний подход получил своеобразное отрицательное подтверждение, когда было установлено, что ингибиторы фосфатазы-1, -2А и -2В вызывают гиперфосфорилиацию тау-белка в мозге крыс [75].

Несмотря на очевидные перспективы создания препаратов, мишенью действия которых являются НФ, до настоящего времени в литературе имеется очень мало достоверных данных о веществах, способных эффективно и избирательно действовать на процесс патологического формирования НФ. В частности, как уже отмечалось выше, препарат церебролизин способен ингибировать кальций-зависимую протеазу калпаин-II, которая катализирует патологический протеолиз МАБ-2 при БА. Еще одним потенциальным примером осуществления направленной регуляции процесса НФ может являться действие ионов лития, которые ингибируют фермент гликоген-синтаза-киназа-3 (Glycogen Synthase Kinase-3), катализирующий фосфорилирование тау-белка. Возможность использования препаратов на основе солей лития для замедления нейродегенеративных процессов при БА обсуждается в литературе.

## **5. Противовоспалительная терапия при БА.**

Известно, что нейродегенеративные изменения в мозге при БА сопровождаются воспалительной реакцией ЦНС. Так, считается, что воспалительный процесс в мозге при БА включает острую фазу, обеспечиваемую действием цитокинов IL-1 и IL-6, активацию каскада комплимента, завершающуюся выделением анафилотоксинов, образование мембранно-активного комплекса, а также активацию микроглии. В литературе имеется ряд обзоров, посвященных подробному анализу этих процессов, например, доклад специальной рабочей группы (США) по изучению нейровоспалительных процессов при БА и способов их коррекции [76]. Хотя до настоящего времени достоверно не установлено являются ли воспалительные процессы в мозге одной из причин патологии БА, либо представляют неспецифический ответ организма на развитие патологических процессов ( $\beta$ -амилоидоза, образования НФ), можно представить, по крайней мере, несколько возможных сценариев развития воспалительного каскада при БА. В частности, медиаторы нейровоспалительных процессов цитокины IL-1 и IL-6 могут проявлять нейротоксичность и потенцировать нейродегенеративное действие  $\beta$ -амилоида; активированная микроглия может секретировать эндогенные нейротоксические факторы, мембранно-активный комплекс, формируемый в нейритах при БА может разрушать целостность мембран нервных клеток; воспалительный каскад комплимента может инициировать образование КСР и окислительный стресс в ЦНС.

Ниже будут кратко охарактеризованы описанные в литературе препараты, чей терапевтический потенциал при БА связывают с их противовоспалительными свойствами (структуры некоторых противовоспалительных препаратов, предлагаемых для лечения БА приведены на рис. 14).

- Ибупрофен (*Ibuprofen*) является первым из серии нестероидных противовоспалительных препаратов (НСП), предложенных для лечения БА. В настоящее время он проходит III стадию клинических испытаний. Еще одним НСП, предложенным для замедления развития БА является препарат

напроксен (*Naproxen*), разрешенный к неконтролируемой продаже в США еще в 1994г. Широкое применение этих препаратов может быть ограничено общими для НСП побочными эффектами, в частности, ульцерагенной активностью, риск которых возрастает при длительном хроническом применении препаратов.

- Селективные ингибиторы циклоксигеназы (СОХ-2). Подход основан на гипотезе об участии индуцибельной изоформы этого фермента СОХ-2 в патогенезе БА, поскольку показано, что СОХ-2, локализованная в областях неокортекса и гиппокампа, принимает участие в регуляции синаптических функций, а при БА отмечено достоверное снижение уровня СОХ-2 (но не формы СОХ-1). К настоящему времени в интернете имеются данные о том, что II-ю стадию клинических испытаний проходит селективный ингибитор СОХ-2 препарат рофекоксиб (*Rofecoxib*, Merck&Co.).

- Преднизон (*Prednisone*) – синтетический глюкокортикостероид, являющийся дегидрированным производным эндогенного гормона коры надпочечников – кортизона. Этот препарат длительное время активно применялся в качестве против-воспалительного средства и иммуносупрессора, однако в настоящее время практически полностью вытеснен более активным аналогом - преднизолоном, в структуре которого гидроксильная группа при атоме углерода C<sub>11</sub> заменила кетогруппу. На уровне пилотных клинических испытаний показана возможность применения преднизона для стабилизации когнитивных функций. В настоящее время под эгидой Национального Института Старения (США) проводятся расширенные клинические испытания этого препарата в качестве средства для лечения БА [77]. Общей проблемой при широком применении препаратов этого класса может явиться побочное нейротоксическое действие глюкокортикоидов в отношении клеток гиппокампа, отмеченное в опытах на животных.

- Колхицин (*Colchicine*) и его аналоги. Несмотря на то, что колхицин сам проявляет нейродегенеративные свойства, нарушая процесс сборки-разборки микротрубочек, он был предложен для исследований в качестве препарата для лечения БА, поскольку обладает выраженной анти-амилоидогенной

активностью и способностью блокировать микроглиальный компонент воспаления в мозге при патологиях типа БА. Данные первичных пилотных испытаний колхицина на больных БА показали его небольшую эффективность, что ставит вопрос о реальности применения этого вещества в клинике.

- Гидроксихлорохин (*Hydroxychloroquine*), – известный противо-малярийное препарат, проявил способность снижать уровень АРβ в плазме, что позволяет предположить возможность реализации его лизосомальной активности для обеспечения нормального процессинга APP. Недавно в Голландии начаты испытания этого соединения на ограниченном круге больных БА с контролем плацебо.

- Дапсон (*Dapsone*, Immune Network Inc.) – антилепрозное средство, способно замедлять развитие БА (как было показано на больных проказой) вследствие выраженного противовоспалительного действия. Находится на II стадии испытаний.

В последнее время в литературе обсуждается возможность использования для блокирования развития БА иммунофилин-связывающие агенты, подобно циклоспорину А (*cyclosporin A*) и препарату *FK506* [77]. Возможный терапевтический эффект связывают с нейропротекторными свойствами внутриклеточного комплекса, образующегося *in vivo* между иммуносупрессантами и иммунофилинами.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.**

Как видно из проведенного, даже очень краткого, анализа имеющихся в литературе данных о возможных механизмах развития патологии типа БА, существует очень широкий спектр подходов к фармакологической коррекции подобных НЗ, что объясняется комплексным характером самой патологии. Действительно, подобные НЗ развиваются с участием широкого круга различных внутри- и экстра-клеточных биологических систем, которые могут являться объектом фармакологического воздействия потенциальных лекарственных препаратов. Помимо подобного «прямого» вмешательства в

патогенез НЗ существует возможность коррекции развившейся патологии за счет активации компенсаторных механизмов ЦНС, что значительно увеличивает общий набор потенциальных способов терапии НЗ. С учетом уже обсуждавшихся выше данных о механизмах патогенеза БА, указанные способы коррекции могут быть проиллюстрированы схемой, представленной на рис. 15. В рамках подобных формализованных представлений потенциальные лекарственные препараты по направлению фармакологического действия можно было бы разделить на следующие основные группы: протекторы, блокирующие на различных стадиях развитие нейропатологии; препараты, компенсирующие (прямым и опосредованным образом) возникший дефицит функций дегенерированных нейрональных систем; наконец иммунные вакцины и возможно трофические факторы, которые стимулировали бы функциональное восстановление (реабилитацию) пораженных нервных клеток. Другой вопрос, конечно, что реальные препараты действуют, как правило, не на одну биологическую мишень, а сам биологический объект участвует в регуляции целого комплекса взаимно-связанных процессов (как, например, мХР, участвующие в передаче нервного импульса и процессинге APP), что во многих случаях приводит к формированию целого комплекса нейрофармакологических свойств у каждого конкретного вещества.

Широкие перспективы создания препаратов для лечения и предупреждения НЗ, в первую очередь, БА, однако, совершенно не соответствуют реальному уровню практических достижений в этой области. Важными объективными причинами этого являются, как нам представляется, следующие моменты:

- пока еще недостаточный уровень знаний о молекулярных и генетических механизмах развития этой патологии, что значительно снижает «полезный выход» огромного числа синтетических и скрининговых работ, ведущихся в этом направлении.
- отсутствие удобных и достаточно адекватных моделей на которых можно было бы с высокой степенью предсказательности отобрать наиболее перспективные соединения.

В этой связи, особое значение и практическую ценность может представлять активное развитие и применение современных методов медицинской химии, основными целями которой является анализ связи между структурой и активностью химических веществ, на основе массива данных по биогической активности соединений и развитие методов направленного синтеза структур с заданной биологической активностью.

Данная работа выполнена при частичной поддержке грантов РФФИ № 98-04-48616 и №00-04-48398. Автор выражает благодарность Т.В. Мухиной и В.Л. Петрову за помощь в подготовке рисунков.

## Литература.

1. *Гаврилова С.И.* (1997). Русский медицинский журнал, **V**, №5, с:1339-1355.
2. *Cocabelos R., Nordberg A., Caamano J., Franco-Maside A., Fernandez-Novoa L., Gomez M.J., Alvarez X.A., Takeda M., Prous J. Jr., Nishimura T., Winblad B.* (1994). *Drugs of Today*, **30**, p:259-337.
3. *Гаврилова С.И.* (1999). Материалы 2-й Российской конференции «Болезнь Альцгеймера и старение: от нейробиологии к терапии». Москва, с:25-44.
4. *Forette F., Boller F.* (1999). In: Alzheimer's disease and related disorders. Eds. K. Iqbal, D.F. Swaab, B. Winblad and H.M. Wisniweski. J.Wiley & Sons Ltd., New York, p:623-631.
5. *Bartus R.T., Dean R.L., Beer B., Lippa A.S.* (1982). *Science*. **217**, p:408-417.
6. *Munoz F.J., Inestrosa N.C.* (1999). *FEBS Lett.*, **450**, № 3, p:205-209.
7. *Gomez-Ramos P., Moran M.A.* (1997). *Mol. Chem. Neuropathol.*, **30**, № 3, p:161-173.
8. *Roberson M.R., Harrel L.E.* (1997). *Brain Research Reviews*, **25**, p.50-69.
9. *Growdon J.H.* (1997). *Life Sci.*, **60**, № 13-14, p:993-998.
10. *Von der Kammer H., Mayhaus M., Albrecht C., Enderich J., Wegner M., Nitsch R.M.* (1998). *J. Biol. Chem.*, **273**, p:14538-14544.
11. *Schruder H., Wevers A.* (1998). *Alzheimer's Disease Reviews*, **3**, p:20-27.
12. *Newhouse P.A., Kelton M.* (2000). *Pharm. Acta Helv.* **74**, p:91-101
13. *Kihara T., Shimohama S., Akaike A.* (1999). In: Alzheimer's disease and related disorders. Eds. K. Iqbal, D.F. Swaab, B. Winblad and H.M. Wisniweski. J.Wiley & Sons Ltd., New York, p:715-722.
14. *Schnee M.E., Brown B.S.* (1998). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **286**, №2, p:709-717.

15. *Hardy J.A. Higgins G.A.* (1992). *Science*, **256**, p.184-185
16. *Sabbagh M.N., Galashko D., Thal L.J.* (1998). *Alzheimer's Disease Review*, **3**, p.1-19.
17. *Emilien G., Beyreuther K., Masters C.L., Maloteaux J.M.* (2000). *Arch. Neurol.*, **57**, №4, p.454-459.
18. *Small D.H., McLean C.A.* (1999). *J.Neurochem.*, **73**, №2, p:443-449.
19. *Selkoe D.J.* (1996). *J. Biol. Chem.*, **271**, p:18295-18298.
20. *Vassar R., Bennett B.D., Babu-Khan S., Kahn S., Mendiaz E.A., Denis P., Teplow D.B., Ross S., Amarante P., Loeloff R., Luo Y., Fisher S., Fuller J., Edenson S., Lile J., Jarosinski M.A., Biere A.L., Curran E., Burgess T., Louis J.C., Collins F., Treanor J., Rogers G., Citron M.* (1999). *Science*, **286**, №5440, p:735-41.
21. *Selkoe D.J., Wolfe M.S.* (2000). *Proc.Natl. Acad.Sci. USA*, **97**, № 11, p.5690-5692.
22. *Dovey H.F., John V., Anderson J.P., et al.* (2001). *J. Neurochem.*, **76**, p:173-181.
23. *Nitsch R.M., Deng A., Wurtman R.J., Growdon J.H.* (1997). *J. Neurochem.*, **69**, p:704-712.
24. *Yanker B.A.* (1996). *Neuron*, **16**, p:921-932.
25. *Soto C., Sigurdsson E.M., Morelli L., Kumar R.A., Castano E.M., Frangione B.* (1998). *Nature Med.*, **4**, p:822-826.
26. *Howlett D.R., George A.R., Owen D.E., Ward R.V., Markwell R.E.* (1999). *Biochem J.*, **343**, Pt.2, p:419-423.
27. *Soto C., Golabek A., Wisniewski T., Castano E.M.* (1996). *NeuroReport*, **7**, №3 p:721-725.
28. *Yang D.S., Small D.H., Seydel U., Smith J.D., Hallmayer J., Gandy S.E., Martins R.N.* (1999). *Neuroscience*, **90**, № 4, p:1217-1226.

29. Calero M., Rostagno A., Matsubara E., Zlokovic B., Frangione B., Ghiso J. (2000). *Microsc. Res. Tech.* **50**, p:305-15
30. Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandever C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P. (1999). *Nature*. **400**, p:173-177.
31. Frenkel D, Solomon B, Benhar I. (2000). *J. Neuroimmunol.*, **106**, №1-2, p:23-31.
32. Janus C., Pearson J., McLaurin J., Mathews P.M., Jiang Y., Schmidt S.D., Chishti M.A., Horne P., Heslin D., French J., Mount H.T.J., Nixon R.A., Mercken M., Bergeron C., Fraser P.E., St George-Hyslop P., Westaway D. (2000). *Nature*, **408**, p:979-982.
33. Morgan D., Diamond D.M., Gottschall P.E., Ugen K.E., Dickey C., Hardy J., Duff K., Jantzen P., DiCarlo G., Wilcock D., Connor K., Hatcher J., Hope C., Gordon M., Arendash G.W. (2000), *Nature*, **408**, p:982-985.
34. Greenamyre J.T., Maragos W.F., Albin R.L., Penney J.B., Young A.B. (1988). *Prog. Neuro-Psych. Biol. Psych.*, **12**, №4, p:421-430.
35. Doble A. (1999). *Pharmacology and Therapeutics*. **81**, №3, p:163-221.
36. Zeevalk G.D., Nicklas W.J. (1991). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **253**, p:1285-1292.
37. Mattson M.P., Cheng B., Davis D., Bryant K., Lieberburg I., Rydel R.E. (1992). *J.Neurosci.*, **12**, p:376-389.
38. Greenamyre J.T., Penney J.B., D'Amato C.J. Young A.B. (1987). *J. Neurochem.*, **48**, №2, p.543-551.
39. Bleakman D., Lodge D. (1998). *Neuropharmacology*, **37**, p:1187-1204.
40. Winblad B., Poritis N. (1999). *Int. J. Geriatr. Psychiatry*, **2**, p:135-46.
41. Lynch G., Granger R., Ambros-Ingerson J., Davis C.M., Kessler M., Schehr R. (1997). *Experimental Neurology*, **145**, p:89-92.

42. *Bachurin S.O., Grigoriev V.V., Drany O.A., Proshin A.N., Tkachenko S.E.* (1999). *J. Neurochem.*, **73 Suppl.**, S143D.
43. *Bachurin S.O., Bukatina E.E., Grigoriev V.V., Grigorieva I.V., Ivanov Ju.Y., Lukoyanov N.V., Tkachenko S.E., Zefirov N.S.* (1998). *Neurobiol. Aging*, **Suppl.4S**, p:S180.
44. *Лермонтова Н.Н., Лукоянов Н.В., Серкова Т.П., Лукоянова Е.А., Бачурин С.О.* (2000). *Бюлл. эксп. биол. мед.*, **129**, с:640-642.
45. *Зефиоров Н.С., Афанасьев А.З., Афанасьева С.В., Бачурин С.О., Букатина Е.Е., Григорьева И.В., Ткаченко С.Е., Григорьев В.В., Юровская М.А., Четвериков В.П.* Средство для лечения болезни Альцгеймера. Патент РФ № 2106864 (зарегистрирован в Гос.реестре изобретений 20.03.1998)
46. *Holscher C., Gigg J., O'Mara S.M.* (1999). *Neurosci. and Biobehav. Rev.*, **23**, p:399-410.
47. *Olney J.W., Wozniak D.F., Farber N.B.* (1997). *Arch. Neurol.*, **54**, p:1234-1240.
48. *Russo C. Schettini G., Saido T.C., Hulette C., Lippa C., Lannfelt L., Ghetti B., Gambetti P., Tabaton M., Teller J.K.* (2000). *Nature*, **405**, p:531-532.
49. *Abe K., Kimura H.* (1996). *J. Neurochem.*, **67**, p:2074-2078.
50. *Ueda K., Shinihara S., Yagami T., Asakura K., Kawasaki K.* (1997). *J. Neurochem.*, **68**, p:265-271.
51. *Lin H., Zhu Y.J., Lal R.* (1999). *Biochemistry*, **24**, p:11189-11196.
52. *Durell S., Guy R., Arispe N., Rojas E., Pollard H.* (1994) *Biophys. J.*, **67**, p:2137-2145.
53. *Behl C.* (1998). *Progr. Neurobiol.*, **57**, p:301-323.
54. *Moosman B., Uhr M., Behl C.* (1997). *FEBS Lett.*, **413**, p:467-472.
55. *Dore S., Bastianetto S., Kar S., Quirion R.* (1999). *Ann New York Acad. Sci.* **890**, p:356-64.

56. *Dubal D.B., Wilson M.E., Wise P.M.* (1999). *Alzheimer's Disease Reviews*, **4**, p:1-9.
57. *Лермонтова Н.Н., Пъчев В.К., Безноско Б.К., Ванькин Г.И., Иванова Т.А., Королева И.В., Лукоянова Е.А., Мухина Т.В., Серкова Т.П., Бачурин С.О.* (2000). *Бюлл. эксп. биол. мед.*, **129**, с:525-527.
58. *Brinton RD, Chen S, Montoya M, Hsieh D, Minaya J* (2000). *Maturitas*, **34 Suppl 2**, p:S35-S52
59. *Gouras G.K., Xu H, Gross R.S., Greenfield J.P., Hai B., Wang R., Greengard P.* (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**, p:1202-1205.
60. *White S.A., Livingston F.S., Mooney R.* (1999). *J. Neurophysiol.*, **82**, p:2221-2234.
61. *Pappolla M.A., Chyan Y.J., Poeggeler B., Frangione B., Wilson G., Ghiso J., Reiter R.J.* (2000). *J. Neural. Transm.*, **107**, p:203-231.
62. *Wolfler A., Abuja P.M., Schauenstein K., Liebmann P.M.* (1999). *FEBS Lett.*, **449**, p: 206-210.
63. *Bachurin S., Oxenkrug G., Lermontova N., Afanasiev A., Beznosko B., Vankin G., Shevtzova E., Mukhina T., Serkova T.* (1999). *Ann. New York Acad. Sci.*, **890**, p.155-166
64. *Lipton S.A.* (1997). *Nature Med.*, **3**, p:20-22.
65. *Lezoualc'h F., Behl C.* (1999). In: *Alzheimer's disease and related disorders*. Eds. K. Iqbal, D.F. Swaab, B. Winblad and H.M. Wisniweski. J.Wiley & Sons Ltd., New York, p:698-706.
66. *Deigner H.P., Kinscherf R.* (1999). *Current Medicinal Chemistry*. **6**, p:399-414.
67. *Sastry P. Rao K.S.* (2000). *J.Neurochem.*, **74**, p:1-20.
68. *Kim T.W., Pettingell W.H., Jung Y.K., Kovacs D.M., Tanzi R.E.* (1997). *Science*, **277**, p: 373-376.

69. *Nicholls D.G., Ward M.W.* (2000). *Trends in Neurosci.* **23**, p:166-174.
70. *Stour A.K., Raphael H.M., Kanterewicz B.I., Klann E., Reynolds I.J.* (1998). *Nature Neurosci.*, **1**, p:366-373.
71. *Marzo I., Brenner C., Zamzami N., Jurgensmeier J.M., Susin S.A., Vieira H.L., Prevost M.-C., Xie Z., Matsuyama S., Reed J., Kroemer G.* (1998). *Science.* **281**, p:2027-2031.
72. *Mather M., Rottenberg H.* (2000). *Biochem. Biophys. Acta*, **273**, p:603-608.
73. *Riekkinen P.* (1998). *Neurobiol. Aging Suppl.* **4S**, abstr. №1263
74. *Noble S., Wagstaff A.* (1997). *CNS Drugs*, **8**, p:257-266.
75. *Bennecib M., Gong C., Grundke-Iqbal I., Iqbal K.* (2000). *FEBS Lett.* **485**, p:87-93.
76. *Neuroinflammation Working Group.* (2000). *Neurobiol. Aging*, **21**, p:383-421.
77. *Aisen P.S. Davis K.L.* (1997). *Int. J. of Geriatric Psychopharm.* **1**, p:2-5.