

DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-2-34-40

О МЕХАНИЗМАХ ДЕЙСТВИЯ ЛАДАСТЕНА

Ю. В. Вахитова¹

Представлены данные комплексного молекулярно-биологического исследования оригинального препарата ладастен, обладающего широким спектром фармакологического действия, включающим психостимулирующие, анксиолитические и иммунотропные свойства. Применение биочипов, двумерного электрофореза, данных биоинформатики, биохимические исследования позволили выявить изменения клеточного метаболизма, вызываемые ладастеном, анализ которых в сопоставлении с известными фармакологическими эффектами дал возможность сформулировать положения о молекулярных механизмах действия препарата. Впервые были идентифицированы дифференциально экспрессирующиеся под влиянием ладастена гены и белки в головном мозге крыс, функциональное состояние которых позволяет обосновать психостимулирующую, анксиолитическую и иммунотропную активности препарата. В частности, ладастен ингибирует экспрессию гена — транспортера ГАМК (*Gat3*), что вероятно, может свидетельствовать о его влиянии на процессы обратного захвата ГАМК. Полученные данные согласуются с известными ранее фактами, поскольку увеличение уровня ГАМК в области ГАМК_A-бензодиазепинового рецепторного комплекса является фактором повышения связывающей способности в бензодиазепиновом сайте. Кроме того, впервые установлено, что ладастен увеличивает экспрессию гена тирозингидроксилазы и содержание соответствующего белка, коррелирующее с накоплением продуктов реакции — L-ДОФА и дофамина в гипоталамусе, гиппокампе и области вентральной покрышки экспериментальных животных. Впервые показано, что изменение транскрипционной активности гена тирозингидроксилазы в гипоталамусе крыс под действием ладастена может быть связано с изменением характера метилирования CpG-динуклеотидов в промоторной области этого гена. Таким образом, установленные геномные и внутриклеточные механизмы действия ладастена подтвердили данные о различных вариантах фармакологической активности препарата.

Ключевые слова: производные адамантана; ладастен; экспрессия генов; тирозингидроксилаза; анксиолитики; психостимуляторы.

Соединение *N*-(2-адамантил)-*N*-пара-бромфенил)-амин, имевшее лабораторное название бромантан, а по завершении фармакологической разработки получившее, по предложению С. Б. Середина, название ладастен, было создано в Институте фармакологии имени В. В. Закусова. Первичное фармакологическое изучение выявило у препарата психостимулирующие, иммуностимулирующие свойства, способность повышать физическую и психическую работоспособность [1, 10]. Однако по выраженности установленных эффектов ладастен уступал имеющимся лекарственным средствам (ЛС), в частности, сиднокарбу, что ограничило возможности его дальнейшей разработки и внедрения в практику в качестве психостимулятора.

Новый этап фармакологического изучения ладастена был связан с применением фармакогенетической методологии [11, 8, 12, 16]. Многолетними исследованиями отдела фармакогенетики доказана зависимость эффектов бензодиазепиновых транквилизаторов и ти-

пичных психостимуляторов от фенотипа ответа на эмоциональный стресс. Так, бензодиазепиновые транквилизаторы оказывают дозозависимый седативный эффект (регистрируемый по снижению двигательной активности в тесте “Открытое поле”) у животных с активным типом поведения, в то время как у животных с реакцией замирания в низких дозах — активацию поведения. Типичные транквилизаторы снижают спонтанную двигательную активность интактных животных обеих линий, а типичные психостимуляторы (сиднокарб) дозозависимо увеличивают этот показатель у мышей линии C57Bl/6, а у BALB/c — лишь в высоких дозах. Таким образом, если исследуемый препарат в эмоционально-нейтральных условиях увеличивает спонтанную двигательную активность, то его следует рассматривать как психостимулятор. Если же препарат увеличивает активность животных с реакцией замирания в моделируемых эмоционально-стрессовых условиях, при отсутствии подобного эффекта в актометре, то можно предполагать у него наличие анксиолитического компонента [15]. В частности, было показано, что в актометре “Optovarimex” ладастен выражено стимулировал спонтанную двигательную активность у мышей C57Bl/6 и крыс MNRA, не вызывая такого эф-

¹ ФГБНУ “Научно-исследовательский институт фармакологии имени В. В. Закусова”, Россия, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.
e-mail: juvv73@gmail.com

фекта у мышей BALB/c и крыс MR. В эмоционально-негативных условиях (тесты “Приподнятый крестообразный лабиринт”, “Открытое поле”) сохраняется психостимулирующий эффект ладастена, выражающийся в увеличении общей двигательной активности у мышей C57Bl/6 и крыс MNRA, однако, без увеличения центральной двигательной активности. Тогда как у мышей BALB/c и крыс MR после введения ладастена увеличивались все виды двигательной активности и снижалось количество дефекаций, что является отчетливым признаком анксиолитического действия, селективно проявляющегося у животных с “пассивным” фенотипом эмоционально-стрессовой реакции [13, 14]. Изучение механизмов действия ладастена в зависимости от фенотипа реакции на эмоциональный стресс показало, что у животных с активным фенотипом ответа на стресс стимуляция препаратом поведения при эмоционально-стрессовом воздействии происходит за счет усиления моноаминергических процессов, тогда как у животных с выраженной реакцией страха - посредством предотвращения нарушений ГАМК-ергической системы [20]. Таким образом, выявленные изменения в поведении мышей с генетически детерминированной реакцией страха позволили констатировать наличие анксиолитического компонента в действии ладастена. Сочетание психостимулирующих и анксиолитических свойств определило возможности его клинических исследований у больных психогенными астеническими расстройствами. Отметим, что ЛС с подобным фармакологическим спектром востребованы в клинике, поскольку сочетание психостимулирующего и анксиолитического эффектов является оптимальным для терапии психогенных астенических расстройств, которым подвержена значительная часть трудоспособного населения. Результаты стадии 2 клинических исследований подтвердили наличие у ладастена психостимулирующего и анксиолитического эффектов, что обеспечило высокую эффективность препарата при тревожно-астенических расстройствах [17].

В доступной литературе данные о ЛС с подобным спектром действия не обнаружены, что определило необходимость изучения механизмов действия ладастена. Поскольку ранее использованные нейрхимические методы не позволяли сформулировать заключения о том, как реализуются его эффекты, в последующем в качестве концептуального был избран комплексный подход на основе исследования систем сигнальной трансдукции, активности транскрипционных факторов, поиска и идентификации потенциальных генов и белков-мишеней препарата, а также механизмов, контролирующих функциональное состояние отдельных генов.

Анализ влияния ладастена на активность пострецепторных путей передачи сигнала и факторов транскрипции

Полученный экспериментальный материал свидетельствует об участии цАМФ-, Ca^{2+} - и MAPK-зависимых сигнальных путей в опосредовании эффектов ладастена в головном мозге (ГМ) крыс [2, 3]. Наиболее вероятно, что на ранних этапах доминирующими сигнальными системами, участвующими в передаче инициированных ладастеном сигналов, являются Ca^{2+} - и цАМФ-зависимые пути. Так, однократное воздействие ладастена (50 мг/кг, внутривенное введение) уже через 0,5 ч приводит к существенному увеличению активности протеинкиназы С (ПКС). Активация ПКС, как известно, происходит вследствие активации ключевого фермента фосфоинозитидного пути — фосфолипазы С и при достаточно высокой концентрации Ca^{2+} . Поэтому можно предположить, что первичным этапом действия ладастена на клетку является специфическая или неспецифическая стимуляция рецепторов, сопряженных с фосфолипазой С, а также активация мембранных потенциал- и/или лиганд-управляемых ионных каналов, обеспечивающих увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . Поскольку к настоящему времени рецепторные мишени ладастена не обнаружены, можно предполагать, что неспецифическая модуляция функциональной активности рецепторных образований и ионных каналов, вероятно, сопряжена с влиянием ладастена на липидные компоненты и/или физико-химические свойства мембран нейронов. Это может вызывать конформационные перестройки рецепторов, ионных каналов и связанных с ними эффекторов (G-белков), что отражается на параметрах ионной проводимости, изменениях концентрации вторичных посредников и индуцирует дальнейшую передачу сигналов. Имеются данные о том, что изменения композиции липидных компонентов мембран являются важным фактором, оказывающим влияние на функциональное состояние фосфолипазы С и других участников этого сигнального каскада, в частности ПКС. В пользу возможности опосредованных ладастеном мембрано-рецепторных взаимодействий свидетельствует ряд данных, среди которых следует отметить высокую растворимость и способность накапливаться в липидах, определенную по ряду фармакокинетических параметров, способность предотвращать мембранозависимые нарушения в ГАМК_A-бензодиапиновом комплексе у животных с реакцией заморания [16]. Кроме того, как следует из полученных нами данных, на фоне ладастена происходит более интенсивное включение радиоактивной метки в мембранную фракцию белков ГМ крыс. Таким образом, представляется наиболее вероятным, что активация фосфоинозитидного и цАМФ-зависимого сигнального пути происходит вследствие мембрано-опосредованных эффектов ладастена.

Другим сигнальным каскадом, вовлеченным в опосредование действия ладастена, является каскад митоген-активируемых протеинкиназ, о чем судили по динамике уровня Erk1/2 киназ в гипоталамусе (ГТ), полосатом теле (ПТ) и гиппокампе (ГК) крыс. Полученные нами данные показывают, что уже через 0,5 ч после введения ладастена увеличивается уровень Erk1/2 киназ во всех исследованных структурах, причем в ГК сохраняется на относительно постоянном уровне на протяжении 2,5 ч. Подобная динамика уровня pErk1/2 свидетельствует о раннем включении и стабильном поддержании активности MAPK-зависимого сигнального каскада в ГМ крыс при однократном воздействии ладастена. Поскольку известно, что Ras/Erk-киназный каскад, наряду с PI3K- и зависимым от фосфолипазы C γ , участвует в передаче сигналов от тирозинкиназных рецепторов, активированных факторами роста, нами было изучено влияние ладастена на экспрессию генов *Bdnf* и *Ngf* в ПТ, ГТ и ГК крыс. Установлено незначительное повышение уровня мРНК *Bdnf* в ГТ и мРНК *Ngf* — в ГК через 0,5 ч после введения ладастена и ингибирование экспрессии как *Bdnf*, так и *Ngf* в ПТ с повышением уровня мРНК *Bdnf* через 1,5 ч. Сопоставление данных об уровне мРНК *Bdnf* и pErk1/2 в ПТ через 1,5 ч после введения ладастена позволяет предположить зависимую от ростовых факторов активацию MAPK-зависимого каскада в этой структуре. С другой стороны, активность MAPK-зависимого сигнального пути модулируется PKA, PKC, CAMK, рецепторами гормонов, нейромедиаторов, сопряженных с G-белками, Ca²⁺, входящим через L-каналы или NMDA-рецепторы [29]. Поэтому, исходя из полученных нами данных, мы можем предполагать преимущественно Ca²⁺ – опосредованную активацию MAPK-зависимых киназ Erk1/2 в ГМ крыс при действии ладастена.

Как известно, активированные протеинкиназы различных сигнальных каскадов фосфорилируют разнообразные в функциональном отношении цитоплазматические и ядерные белки — рецепторы, ферменты, транспортеры, синаптические белки, ионные каналы, гистоны, транскрипционные факторы и др. Важными мишенями являются транскрипционные факторы (ТФ), которые в свою очередь регулируют транскрипцию многих генов, опосредуя, таким образом, передачу экстраклеточного сигнала к ядру. Изучение влияния ЛС на ДНК-связывающую активность ТФ является важным этапом изучения механизмов их действия, поскольку именно на уровне ТФ происходит интеграция различных сигнальных путей и селекция генов и/или групп генов, изменения активности транскрипции которых являются необходимым условием формирования адекватного клеточного ответа. С целью идентификации ТФ, регулирующих транскрипцию генов при действии ладастена (50 мг/кг, через 1 ч после перорального введения препарата крысам), нами была проведена гибридизация с помощью коммерческого набора “TranSignal Protein/DNA Arrays II”, позволяющего

оценить изменения ДНК-связывающей активности 96 ТФ одновременно. Нами были идентифицированы 6 ТФ, позитивно регулируемых ладастеном (ADR1 (регулятор синтеза алкогольдегидрогеназы II), NFH-8 (ядерный фактор 3 гепатоцитов), XBP1 (X-бокс-связывающий белок), Pax4 (ген парных боксов-4), Pax2 (ген парных боксов-2), SAA (регуляторный элемент сывроточного гена амилоида A) и 9 ТФ, ДНК-связывающая активность которых ингибирована (Frac-4 (Forkhead box D1), FKHR (forkhead транскрипционный фактор Foxo1), GATA-4 (активатор транскрипции 4, связывающийся с последовательностью GATA), MEF-3 (специфичный для миоцитов фактор-усилитель-3), MT-Vox (белок, связывающий последовательность MT-Vox), Nkx-2.5 (гомеобоксный белок Nkx-2.5), PPAR α (активированный пролифератором пероксисом альфа-рецептор), ZID (белок, связывающий домен “цинковые пальцы”), NPAS2 (нейрональный белок 2, содержащий PAS домен) [32]. Не останавливаясь подробно на индивидуальных характеристиках того или иного ТФ, отметим, что значительная часть выявленных нами ТФ, ДНК-связывающая активность которых изменяется при действии ладастена, регулирует транскрипцию генов, кодирующих ферменты гликолиза, белки синаптических функций, цитопroteкции и синаптической пластичности. Отметим, что данный подход способствует получению предварительной информации о направлениях изменений клеточного метаболизма в ответ на лекарство.

Влияние ладастена на экспрессию генов и белков в головном мозге крыс

На следующем этапе исследования была проведен анализ изменений экспрессии генов и белков, возникающих под влиянием ладастена. Поиск генов, дифференциально экспрессирующихся в ГМ крыс, проводили через 1,5 ч после однократного введения препарата (50 мг/кг, внутривенно). С этой целью использовались коммерческие макрочипы “Atlas Rat cDNA Expression Array”, “Atlas Rat 1.2 cDNA Expression Array”. В первом случае на каждой мембране было иммобилизовано 588 амплифицированных фрагментов кДНК известных генов крысы, во втором — 1176 фрагментов кДНК. Анализ белков был проведен с использованием 2D-электрофореза и MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Количественный анализ выявил 26 генов, статистически достоверно изменяющих уровень экспрессии в ГМ крыс в ответ на однократное воздействие ладастена, относящихся к следующим функциональным группам: генам белков ферментов метаболизма (нейрон-специфичная эналаза, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа); генам белков регуляторных пептидов (карбоксипептидаза H, предшественник орексина, рецептор галанина 3); генам белков синаптических функций и цитоскелета (белок-транспортер3 ГАМК, протеолипидный белок, синапсина IA&IB, ПА&PB, рабфилин-3A, связанный с Ras белок Rab-7,

компонент 7 экзоцитозного комплекса, тубулин $\alpha 1$, актин- β); генам компонентов сигнальных путей (Ca^{2+} /АТФаза плазматической мембраны, пептид-ингибитор протеинкиназы С); генам белков регуляции транскрипции (субъединица I РНК-полимеразы, белок суперсемейства димеризующихся факторов транскрипции, эмерин); генам белков межклеточных взаимодействий (нейрональный белок клеточной адгезии, кандидат гена пластичности 2, *Noggin*); генам белков регуляции клеточного цикла (белок прогрессии клеточного цикла D123); генам белков иммунных функций (тимус-ассоциированный антиген); генам онкосупрессоров (ген-супрессор аденоматозного полипоза толстой кишки, ген-супрессор ретинобластомы) [5]. Далее было выявлено 14 белков, различающихся по уровню их экспрессии, которые условно были подразделены на следующие функциональные группы: белки - ферменты гликолитического метаболизма (альдолаза А, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа); стрессовые белки и белки-шапероны (субъединица 4 протеасомного комплекса 26S, субъединица 1 α фактора, регулируемого гипоксией, белок теплового шока 70 кДа, валозин-содержащий белок, шаперонин, содержащий ТСП-1); синаптические белки (тубулин, альфа-интернексин, легкая цепь А клатрина, белок-медиатор 2 коллагенового ответа, нейрональный белок 22) [19].

Анализ профилей генов и белков, дифференциально экспрессирующихся в ГМ крыс при действии ладастена, подтвердил предварительные данные, полученные при изучении спектра ТФ. Так, однократное введение ладастена ингибирует экспрессию генов *Nse* (нейрон-специфичная энолаза) и *Gapdh* (глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа), кодирующих ферменты отдельных стадий аэробного гликолиза. Ранее была показана способность ладастена снижать уровень глюкозы и инсулина в крови при всех режимах введения [18]. Ингибирование ладастеном транскрипции генов, кодирующих ферменты метаболизма глюкозы, может свидетельствовать об адаптивном снижении интенсивности процессов гликолиза в ответ на уменьшение поступления субстрата в клетки ГМ. Следует особо отметить соответствие характера изменений экспрессии гена и белка GAPDH. Наличие корреляции между транскрипционной активностью мРНК *Gapdh* и уровнем соответствующего белка подтверждает вовлечение данной системы в механизмы реализации активности ладастена и позволяет охарактеризовать GAPDH в качестве фармакологически значимой мишени, связанной с гликолитическими и другими известными функциями данного фермента.

Обнаружено, что ладастен оказывает влияние на экспрессию ряда защитных белков и белков-шаперонов, в частности, увеличивает экспрессию белка теплового шока 70, валозин-содержащего белка, белка комплекса 26S протеасом и ингибирует экспрессию белка шаперонина, содержащего ТСП-1. Как известно, белок теплового шока 70 является основным компо-

нентом систем защиты клеток от широкого спектра стрессовых факторов. Протективная роль HSP70, как полагают, реализуется за счет шаперонной активности данного белка, которая заключается в обеспечении и поддержании правильной конформации клеточных полипептидов, предотвращении агрегации белков и удалении необратимо денатурированных белков [23]. Шаперонин, содержащий ТСП-1, — представитель семейства белков ко-шаперонов, опосредующих фолдинг и ассоциацию полипептидных цепей многих цитозольных белков [21]. Селективная деградация белков в цитозоле осуществляется мультикаталитическими комплексами 26S-протеасом. Мишенями 26S-протеасом являются белки, вовлеченные во многие внутриклеточные процессы (регуляция метаболизма, дифференцировка клеток, транскрипция, контроль клеточного цикла, ответ на стресс и др.) или дефектные белки, возникающие в результате мутаций или посттрансляционных повреждений [28]. Валозин-содержащий белок один из ассоциированных с 26S — протеасомой белков [33]. Принимая во внимание множественность клеточных функций белков-шаперонов и белков убиквитин-протеасомного комплекса трудно однозначно интерпретировать последствия индуцируемых ладастеном изменений экспрессии вышеупомянутых белков, но можно предположить их участие в механизмах цитопротекции и неспецифических защитных реакциях клеток в ответ на лекарственное воздействие.

Нами впервые показано влияние ладастена на экспрессию генов регуляторного нейропептида орексина; фермента, участвующего в биосинтезе пептидов — карбоксипептидазу H (CARB H) и рецептора галанина 3, что свидетельствует о вовлечении пептидергических систем в реализацию нейротропной активности ладастена. Карбоксипептидаза H - один из основных ферментов посттрансляционного процессинга предшественников эндогенных опиоидов (β -эндорфинов, мет- и лей-энкефалинов) и регуляторных пептидов (АКТГ, вазопрессина, окситоцина, меланоцитстимулирующего гормона) [24]. Орексины - регуляторные нейропептиды, специфически экспрессирующиеся в периферической и латеральной областях ГТ — регионах, критичных для регуляции пищевого поведения. Установлена роль этих нейропептидов в регуляции циклов сна и бодрствования, в частности, в запуске фазы парадоксального сна, пищевого поведения, функций симпатической нервной системы, термогенеза, энергетического метаболизма, гомеостаза глюкозы, секреции гормонов, стрессовых реакций [30]. Галанин — ингибиторный нейропептид, экспрессируется совместно с тормозными нейромедиаторами — ГАМК, нейропептидом Y, веществом P, и регулирует высвобождение ацетилхолина, норадреналина, серотонина и дофамина. В настоящее время, галанин и его рецепторы рассматриваются в качестве перспективных мишеней при создании новых антидепрессантов, анксиолитиков и нейропротекторов [26]. Таким образом, можно

предположить, что реализация психостимулирующих, анксиолитических и других нейротропных свойств ладастена может быть опосредована также и пептидергическими системами, о чем свидетельствует влияние препарата на экспрессию генов карбоксипептидазы Н, предшественника орексина и рецептора галанина 3.

Важной фармакологически значимой мишенью ладастена, связанной с анксиолитическими свойствами препарата, является мембранный белок - транспортер ГАМК — GAT3. Данный белок осуществляет обратный захват и перенос высвободившегося в синаптическое пространство ГАМК, что, наряду с деградацией ферментами метаболизма и диффузией способствует поддержанию оптимального внеклеточного уровня медиатора [25]. Ладастен ингибирует экспрессию гена *Gat3*, что вероятно, может указывать на влияние препарата на процессы обратного захвата ГАМК. Полученные данные согласуются с известными ранее фактами, поскольку увеличение уровня ГАМК в области ГАМК_A-бензодиазепинового рецепторного комплекса является фактором повышения связывающей способности в бензодиазепиновом сайте [20]. Таким образом, GAT3 может рассматриваться в качестве новой, впервые идентифицированной молекулярной мишени, ассоциированной с анксиолитическими свойствами ладастена.

Наиболее представленной группой генов и белков, экспрессия которых модулируется ладастеном, является группа генов (синапсина I&II, II&III, рабфилин-3A, связанный с Ras белок Rab-7, компонент 7 экзоцитозного комплекса) и белков (тубулин, альфа-интернексин, легкая цепь А клатрина, белок-медиатор 2 коллапсинового ответа, нейрональный белок 22) синаптических функций. К этой же группе можно отнести и гены цитоскелета и межклеточных взаимодействий (протеолипидный белок, тубулин $\alpha 1$, актин- β , нейрональный белок клеточной адгезии, кандидат гена пластичности 2, *Noggin*), компонентов сигнальных путей (*Ptca* – Ca^{2+} /АТФаза плазматической мембраны; *Pkcip* – пептид-ингибитор ПКС). Ген *Ptca* кодирует белок, который играет ключевую роль в восстановлении базального уровня Ca^{2+} в цитоплазме нейронов после воздействия стимулов, вызывающих приток Ca^{2+} в клетку [22]. Продукт гена *Pkcip* охарактеризован в качестве специфического ингибитора ПКС, модулирующего активность последней [31]. Вызываемые ладастеном изменения транскрипционной активности генов *Ptca* и *Pkcip*, вовлеченных в регуляцию Ca^{2+} — сигналинга, подтверждают полученные нами данные об участии Ca^{2+} — фосфолипид – и Ca^{2+} — кальмодулин-зависимых систем передачи сигнала в опосредовании эффектов препарата [2]. Влияние ладастена на экспрессию генов, кодирующих белки синаптических функций, цитоскелета, межклеточных взаимодействий, вероятно, вносит вклад в механизмы поддержания изменений уровня синаптической активности и связанного с этим усиления синаптической

передачи, процессов внутриклеточного транспорта, образования новых межклеточных контактов, и отражает запуск процессов координированной компенсаторной перестройки структурно-метаболических потребностей клеток в ответ на лекарственное воздействие.

Анализ механизмов дофаминпозитивного действия ладастена

Как было отмечено выше, ладастен, наряду с другими соединениями, обладающими психостимулирующей активностью, способны увеличивать содержание нейромедиаторов — дофамина и серотонина преимущественно в лимбических структурах ГМ (фронтальной коре, области вентральной покрышки, ГК и ГТ) и стимулировать высвобождение дофамина из пресинаптических терминалей ПТ [9, 7]. В то же время, неизвестно, за счет каких механизмов происходит увеличение содержания нейромедиатора на фоне действия ладастена, хотя была показана способность препарата ингибировать обратный захват дофамина, серотонина и норадреналина синаптосомами ПТ, а также тропность препарата к D_3 -подтипу рецепторов дофамина в ПТ, которым, как известно, приписывают функции пресинаптических ауторецепторов, модулирующих преимущественно высвобождение дофамина. Существует ряд косвенных данных, свидетельствующих о возможном влиянии препарата на процессы биосинтеза катехоламинов [27].

Нами был проанализирован ряд параметров, характеризующих динамику состояния системы биосинтеза катехоламинов при однократном введении ладастена, а именно — содержание L-ДОФА и дофамина, оценка изменений уровня гена и белка тирозингидроксилазы (ТГ) в области вентральной покрышки, прилежащем ядре, ГТ, ПТ и ГК крыс [4]. На наш взгляд, наиболее важными с точки зрения механизмов формирования психостимулирующей активности ладастена, являются впервые полученные данные о способности препарата оказывать стимулирующее влияние на экспрессию гена ТГ в области вентральной покрышки, коррелирующее с увеличением уровня L-ДОФА и дофамина в прилежащем ядре и максимумом проявлений поведенческих эффектов ладастена. Обращает на себя внимание “ранняя” (через 0,5 ч после введения препарата) индукция транскрипции ТГ в области вентральной покрышки. Это, вероятно, свидетельствует о необходимости компенсаторного синтеза катехоламинов, вследствие усиленного высвобождения дофамина из прилежащего ядра, о чем косвенно можно судить по снижению тканевого уровня L-ДОФА и дофамина в этой структуре. Тогда как возрастание уровня мРНК ТГ в области вентральной покрышки через 1,5 ч, скорее всего, свидетельствует об активации *de novo* синтеза тирозингидроксилазы и катехоламинов. Подтверждением этому служат данные о значительном увеличении и L-ДОФА и дофамина в прилежащем ядре через

2 ч после введения ладастена. О том, что ладастен на начальных этапах своего действия способствует высвобождению нейромедиатора, свидетельствует также длительное снижение тканевого уровня L-ДОФА и дофамина в ПТ, не компенсируемое активацией ТГ. Однако, к 2,5 ч в этой структуре наблюдается увеличение уровня L-ДОФА, что вероятно сопряжено с активацией биосинтеза ТГ в других структурах, например, в области вентральной покрышки и компактной части черной субстанции. Таким образом, способность ладастена индуцировать *de novo* биосинтез катехоламинов, определяемый по накоплению L-ДОФА, свидетельствует, во-первых, о длительности эффектов препарата, а, во-вторых, о “неистошающем” типе действия ладастена, выгодно отличающим его от “классических” психостимуляторов.

В ГТ индуцируемые ладастеном изменения уровня мРНК, белка и активности ТГ во времени имеют линейный характер, достигая максимума к 2 ч после однократного воздействия препарата, и коррелируют с содержанием продукта реакции — L-ДОФА. Активация ладастеном синтеза дофамина в ГТ, играющего роль нейромедиатора и нейромодулятора в этой структуре, может, по крайней мере, частично, определять опосредованную дофамин-позитивными нейронами регуляцию нейроэндокринных функций и реализацию стресспротекторных, метаболических, иммуномодулирующих эффектов препарата.

В ГК повышение уровня L-ДОФА и дофамина, вероятно, позволяет обосновать отдельные механизмы проявляемой ладастеном ноотропной активности, поскольку известно, что дофаминергические нейроны ГК играют ключевую роль в реализации когнитивных функций и вовлекаются в процессы консолидации памяти, что продемонстрировано многими исследователями *in vivo* и *in vitro* моделях долговременной потенциации (ДВП).

Таким образом, было установлено дифференциальное влияние ладастена на активность транскрипции гена ТГ, уровень и активность ТГ и содержание L-ДОФА и дофамина в разных структурах ГМ крыс. Несмотря на то, что к настоящему времени механизмы тканеспецифической регуляции экспрессии гена ТГ достаточно полно и подробно исследованы, немного известно о роли эпигенетических механизмов в регуляции экспрессии данного гена. В качестве одного из возможных механизмов, обуславливающих изменение транскрипционной активности гена ТГ под влиянием исследуемого нами препарата мы предположили возможность его действия на характер метилирования цитозина в CpG-динуклеотидах в промоторной области. Как следует из полученных нами данных, ладастен при однократном введении экспериментальным животным вызывает изменение характера метилирования CpG-динуклеотидов, локализованных в 5'-фланкирующей области гена ТГ в ГТ крыс [6]. Оно проявляется в увеличении частоты деметилирования остатков цито-

зина в последовательностях, расположенных непосредственно в сайтах связывания транскрипционных факторов AP-2 (активирующий белок-2), Egr-1/Sp-1 (фактор роста раннего ответа/фактор специфичности 1), CRE-1, CRE-2 (элементы отклика на цАМФ 1 и 2) или в непосредственной близости от них — AP-2, Egr-1/Sp-1, AP-1/CRE-1 enhancer element (AP-1/CRE-1 enhancer element). Как показывают результаты наших исследований, в опытном варианте частота метилирования цитозина в позиции -43 CRE-1-элемента снижена почти в 2 раза, по сравнению с контролем, тогда как остаток цитозина в позиции -95, расположенный в сайте CRE-2, деметилирован в меньшей степени. Можно предположить, что наблюдаемое нами усиление транскрипционной активности гена ТГ в клетках ГТ, по крайней мере, частично ассоциировано с процессами метилирования/деметилирования цитозинового CRE-последовательности промоторной области данного гена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенные исследования позволили установить в качестве новой мишени ладастена транспортер ГАМК (GAT3) и предположить влияние препарата на процессы обратного захвата этого нейромедиатора, что согласуется с показанным ранее нормализующим эффектом ладастена на ГАМК-ергические процессы за счет восстановления функциональной активности бензодиазепинового участка ГАМК_A-рецептора и обосновывает механизмы анксиолитического действия ладастена. Кроме того, впервые установлено, что мишенью ладастена является фермент биосинтеза катехоламинов тирозингидроксилаза. Показано, что при действии препарата увеличивается экспрессия гена тирозингидроксилазы и содержание соответствующего белка, коррелирующее с накоплением продуктов реакции — L-ДОФА и дофамина в гипоталамусе, гиппокампе и области вентральной покрышки экспериментальных животных. Синтез *de novo* дофамина под действием ладастена и способность восполнять тем самым депо дофамина рассматривается в качестве основного механизма, определяющего “неистошающий” тип психостимулирующего действия препарата. Впервые также показано, что изменение транскрипционной активности гена тирозингидроксилазы в ГТ крыс под действием ладастена может быть связано с изменением характера метилирования CpG-динуклеотидов в промоторной области этого гена: выявлено увеличение частоты деметилирования CpG-динуклеотидов в последовательностях, ассоциированных с сайтами связывания отдельных транскрипционных факторов.

Представленные результаты комплексного исследования молекулярных механизмов действия ладастена позволило существенно дополнить представления о механизмах фармакологической активности препарата, что открыло новые перспективы его клинического

применения и, с другой стороны, демонстрировало возможности использования новых методов и подходов для анализа механизмов действия лекарственных средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. В. Вальдман, Н. М. Зайцева, Н. В. Климова и др. 860446 СССР, *Бюл. изобрет.*, № 43 – 44 (1993).
2. Ю. В. Вахитова, М. Х. Салимгареева, С. Б. Середенин, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **2**, 12 – 15 (2004).
3. Ю. В. Вахитова, М. Х. Салимгареева, С. Б. Середенин, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **3**, 7 – 9 (2004).
4. Ю. В. Вахитова, Р. С. Ямиданов, С. Б. Середенин *Эксперим. и клин. фармакол.*, **67**(4), 7 – 11 (2004).
5. Ю. В. Вахитова, Р. С. Ямиданов, В. А. Вахитов, С. Б. Середенин, *Молекуляр. биол.*, **39**(2), 276 – 285 (2005); doi: 10.1007 / s11008-005-0035-7.
6. Ю. В. Вахитова, С. В. Садовников, Р. С. Ямиданов и др., *Генетика*, **42**(7), 968 – 975 (2006); doi: 10.1134 / S1022795406070155.
7. Т. В. Грехова, Р. Р. Гайнетдинов, Т. Д. Сотникова и др., *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, № 3, 302 – 304 (1995); doi: 10.1007 / BF02445840.
8. М. Д. Машковский, С. Б. Середенин, Р. Я. Альтшулер и др., *Хим.-фарм. журн.*, № 5, 14 – 18 (1980).
9. И. И. Мирошниченко, В. С. Кудрин, С. А. Сергеева и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **58**(4), 8 – 11 (1995).
10. И. С. Морозов, Н. Г. Арцимович, Т. А. Фадеева и др. 1826906 СССР, *Бюл. изобрет.*, № 25 (1993).
11. С. Б. Середенин, А. А. Ведерников, *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, № 7, 38 – 40 (1979); doi: 10.1007 / BF00804773.
12. С. Б. Середенин, Т. А. Воронина, Г. Г. Незнамов и др., *Вест. РАМН*, **11**, 3 – 9 (1998).
13. С. Б. Середенин, А. Г. Мирамедова, *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **11**, 529 – 531 (1999).
14. С. Б. Середенин, А. Г. Мирамедова, М. М. Козловская, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **62**(3), 3 – 6 (1999).
15. С. Б. Середенин, М. А. Яркова, Б. А. Бадьштов и др. 2175229 РФ, *Бюл. изобр.*, № 30 (2001).
16. С. Б. Середенин, М. А. Яркова, М. В. Воронин, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **64**(1), 63 – 65 (2001).
17. С. А. Сюняков, С. А. Гришин, Е. С. Телешова и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **4**, 5 – 10 (2006).
18. А. Р. Халимов, *Автореф. дис. канд. биол. наук*, Уфа (1997).
19. Р. С. Ямиданов, М. Х. Салимгареева, С. В. Садовников др., *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **149**(6), 717 – 721 (2010); doi: 10.1007 / s10517-010-1050-9.
20. М. А. Яркова, М. В. Воронин, С. Б. Середенин, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **68**(3), 3 – 6 (2005); doi: 10.30906 / 0869-2092-2005-68-3-3-6.
21. K. I. Brackley, J. Grantham, *Cell Stress Chaperon.*, **14**(1), 23 – 31 (2009); doi: 10.1007 / s12192-008-0057-x.
22. E. Carafoli, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**(3), 1115 – 1122 (2002); doi: 10.1073 / pnas.032427999.
23. S. Chen, I. R., *Cell Stress Chaperon.*, **12**(1), 51 – 58 (2007); doi: 10.1379 / csc-236r.1.
24. L. Ji, H. T. Wu, X. Y. Qin, R. Lan, *Endocr. Connect.*, **6**(4), R18 – R38 (2017); doi: 10.1530 / EC-17-0020.
25. X. T. Jin, A. Galvan, T. Wichmann, et al., *Front Syst Neurosci.*, **5**, 63, (2011); doi: 10.3389 / fnsys.2011.00063.
26. G. Juhasz, G. Hullam, N. Eszlari, et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA*, **111**(16), E1666 – E1673 (2014); doi: 10.1073 / pnas.1403649111.
27. G. B. Lapa, G. I. Kovalev, *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **15**(S2), 271 – 272 (2005); doi: 10.1016 / S0924-977X(05)80525-5.
28. I. Livneh, V. Cohen-Kaplan, C. Cohen-Rosenzweig, et al., *Cell Res.*, **26**(8), 869 – 885 (2016); doi: 10.1038 / cr.2016.86.
29. G. Pearson, F. Robinson, T. B. Gibson, et al., *Endocr. Rev.*, **22**(2), 153 – 183 (2001); doi: 10.1210 / edrv.22.2.0428.
30. T. Sakurai, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **6**(4), 353 – 360 (2003); doi: 10.1097 / 01.mco.0000078995.96795.91.
31. A. Toker, L. A. Sellers, B. Amess, et al., *Eur. J. Biochem.*, **206**(2), 453 – 461 (1992); doi: 10.1111 / j.1432-1033.1992.tb16946.x.
32. J. V. Vakhitova, M. Kh. Salimgareeva, R. S. Yamidanov, S. B. Seredenin, *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **15**(S2), S172 (2005).
33. B. K. Yeo, S-W Yu, *Anim. Cells Syst.*, **20**(6), 303 – 309 (2016); doi: 10.1080 / 19768354.2016.1259181.

Поступила 21.12.20

ON THE MECHANISM OF LADASTEN ACTION

Yu. V. Vakhitova*

V. V. Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315 Russia

* e-mail: juvv73@gmail.com

Results of a complex molecular biological study of the original drug ladasten, which has a broad pharmacological activity spectrum including psychostimulating, anxiolytic, and immunotropic properties, are presented. The use of biochips, two-dimensional electrophoresis, bioinformatics evaluations, biochemical studies allowed to identify changes in cellular metabolism caused by ladasten, the analysis of which, in comparison with its known pharmacological effects, provide basis to formulate scientific provisions on the molecular mechanisms of the compound action. For the first time, genes and proteins differentially expressed under the action of ladasten were identified in the rat brain, the functional state of which makes it possible to substantiate the psychostimulating, anxiolytic and immunotropic activity of the drug. In particular, ladasten inhibits expression of the Gat3 gene (GABA transporter), which probably may indicate the drug effect on the processes of GABA reuptake. The obtained data are consistent with previously known facts, since an increase in the level of GABA in the region of the GABAA-benzodiazepine receptor complex is a factor in increasing the binding capacity at the benzodiazepine site. In addition, it was found for the first time that ladasten increases expression of the tyrosine hydroxylase gene and the content of the corresponding protein, which correlates with the accumulation of reaction products, L-DOPA and dopamine, in the hypothalamus, hippocampus, and ventral tegmental area of experimental animals. It was shown for the first time that changes in the transcriptional activity of the tyrosine hydroxylase gene in rat hypothalamus upon ladasten administration may be associated with a change in the methylation pattern of CpG dinucleotides in the promoter region of this gene. Thus, the established genomic and intracellular mechanisms of ladasten action confirmed data on the pharmacological activity spectrum of this drug.

Keywords: adamantane derivatives; ladasten; gene expression; tyrosine hydroxylase; anxiolytics; psychostimulants.