

УДК 579.8:616.83

©Коллектив авторов

ФАКТОР НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ-АЛЬФА – ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ НЕЙРОПРОТЕКТОРА ДИМЕБОНА

А.В. Алесенко^{1}, С.О. Бачурин², С.В. Гурьянова³, Ю.О. Каратасов¹, Е.Ф. Шевцова², Л.Н. Шингарова³*

¹Институт биохимической физики имени Н.М. Эммануэля РАН,
119334 Москва, ул. Косыгина, 4; факс: (7)4991374101; эл. почта: ales@sky.chph.ras.ru

²Институт физиологически активных веществ РАН,
142432, Черноголовка, Ногинский р-н, Моск. обл.

³Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Димебон, начиная с 1983 г., используется в России в качестве антигистаминного средства. Повторное возникновение интереса к димебону обусловлено обнаружением его лечебного эффекта при болезни Альцгеймера. Исследования, проведенные на животных, показали, что активность димебона определяется множеством механизмов. На клеточной линии L929 фибробластов мыши и мышцах C57Bl нами показано, что димебон способен блокировать токсические сигналы, индуцированные провоспалительным цитокином – фактором некроза опухолей-альфа (ФНО-α). В дозе 10 мкг/мл димебон защищает клетки L929 от токсического действия ФНО-α. Предварительное введение димебона мышам предупреждало изменения молекулярных видов сфингомиелинов (СМ) и галактозилцерамидов, вызванные однократной инъекцией ФНО-α. При этом сам димебон не вызывал изменений в сфинголипидах исследованных структур мозга.

Ключевые слова: димебон, ФНО-α, липиды, головной мозг мышей, фибробласты L929 мыши

DOI 10.18097/PBMC20166204418

ВВЕДЕНИЕ

Препарат димебон (3,6-диметил-9-(2-метил-пиридил-5)-этил-1,2,3,4-тетрагидро-карболина дигидрохлорид, рис. 1) был разработан в начале 80-х годов и запатентован как антигистаминный препарат, предназначенный для лечения аллергических состояний [1]. Позже в Институте физиологически активных соединений РАН установили, что димебон обладает способностью стимулировать когнитивные функции как в нейротоксикологических моделях деменции, так и в пилотных клинических испытаниях на пациентах с болезнью Альцгеймера (БА) [2]. В ходе 2-й фазы клинических исследований, проведенных в 2005-2007 годах компанией “Medivation” (США) более чем на 180 больных БА, был выявлен значительное улучшение когнитивных функций спустя 6 мес после лечения димебоном [3]. Хотя результаты 3-й фазы испытаний, проведенных компанией “Pfizer”, не дали ответа на вопрос об эффективности действия препарата ввиду аномально высокого положительного эффекта плацебо [4], возможность использования димебона и его аналогов при нейродегенеративных заболеваниях продолжает активно обсуждаться. Основанием для этого стали полученные в последние годы данные о мультитаргетности димебона и о его возможном действии на такие важные в патогенезе нейродегенеративных заболеваний механизмы, как протеинопатия [5] и аутофагия [6, 7], а также способность стабилизировать функции митохондрий при нарушениях, вызванных бета-амилоидным пептидом [8, 9].

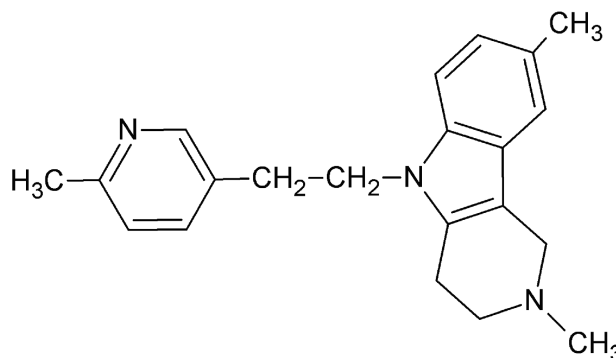


Рисунок 1. Структурная формула димебона.

В настоящее время в качестве новых нейропротекторов широко используются препараты, которые ранее применяли при различных патологиях. Этому способствовало обнаружение новых мишеней, ключевых в патогенезе нейродегенерации [10]. До сих пор не известно, служит ли ФНО-α мишенью для димебона, хотя уже найдено несколько новых объектов, на которые действует этот препарат, что позволяет отнести его к классу нейропротекторов [11].

ФНО-α и другие цитокины играют важную роль как в нормальном развитии головного мозга, так и при патологических процессах [12-18].

Показано, что ФНО-α запускает воспалительные реакции и иммунный ответ в ЦНС [15], участвует в развитии таких заболеваний как БА [19-21], рассеянный склероз, деменция при СПИДе

и других инфекционных заболеваниях, церебральная ишемия и инсульты различной этиологии, синдром Гуиллан-Барре и др., а также в их экспериментальных моделях [22].

Долгое время считалось, что гематоэнцефалический барьер непроницаем для крупных полипептидов, таких как цитокины. Однако оказалось, что при некоторых патологических состояниях через гематоэнцефалический барьер могут проникать не только полипептиды, но даже целые клетки – макрофаги и лимфоциты. При этом радиоактивно меченные ФНО-α и некоторые другие цитокины (интерлейкины (ИЛ)-1 и -2) были способны проникать через гематоэнцефалический барьер даже в нормальных условиях [23]. Более значительным источником цитокинов в ЦНС служат периферические клетки крови, которые проникают в мозг после какого-либо воздействия (начала воспалительного процесса, повреждения гематоэнцефалического барьера и др.) [24, 25]. Моноциты, активированные макрофаги и Т-клетки, инфильтрирующие ЦНС, служат источником ФНО-α и других цитокинов, они способны активно существовать в мозге достаточно долго. Так, макрофаги могут составлять около 10% от общей глиальной популяции; активированные Т-клетки, специфически реагируя с системными антигенами ЦНС, остаются в мозге в течение нескольких дней. Эти клетки продуцируют такие цитокины, как ФНО-α, ИЛ-1 и ИЛ-6 [13], способные стимулировать глиальные клетки к экспрессии их собственных цитокинов.

Известно, что при проведении провоспалительного сигнала ФНО-α вызывает заметные нарушения в метаболизме липидов [22, 26, 27]. Последнее особенно важно, потому что специфичность клеток ЦНС во многом обусловлена высоким содержанием липидов, особенно сфинголипидов [28]. Продукты гидролиза сфингомиелина (СМ) – церамид и сфингозин – являются вторичными посредниками передачи токсического сигнала ФНО-α [29, 30].

Роли СМ-цикла при воздействии ФНО-α на клетки нервной системы посвящены многочисленные публикации. В этих работах в основном изучена активации сфингомиелитазы и изменение содержания церамида в различных культурах нервных клеток и глии *in vitro* [29-32].

В настоящее время доказано, что участие ФНО-α в процессе апоптоза связано с продуктами СМ-цикла [29, 30]. На сегодняшний день наиболее изучена роль церамидов [30]. Особое значение в развитии БА играют галактозилцерамиды, продукты деградации сульфатидов, которые рассматривают в качестве маркеров ранней стадии БА [33].

В связи с важной ролью ФНО-α в развитии нейропатологий различного генеза представляет интерес влияние потенциальных нейропротекторов на предупреждение токсического сигнала, индуцируемого ФНО-α в клетках мозга. Проводятся работы, направленные на создание и поиск новых лекарственных средств, мишенью которых может быть ФНО-α [34, 35].

Цель нашей работы состояла в изучении способности нейропротектора димебона, используемого при БА, защищать клетки от токсического действия ФНО-α и препятствовать нарушениям в метаболизме сфинголипидов мозга, вызванным этим цитокином.

Изучено влияние димебона и ФНО-α а также их комбинации (совместного введения) на изменение молекулярных видов СМ и гликозилированных церамидов в различных отделах головного мозга мышей (мозжечок, гиппокамп и кора). Различия молекулярных видов этих липидов определяются набором жирных кислот, входящих в их состав.

МЕТОДИКА

Рекомбинантный ФНО-α, использованный в экспериментах, синтезирован в Институте биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (Москва).

Димебон синтезирован в Институте физиологически активных веществ в Черноголовке.

Исследование на клетках

Биологическую активность димебона (IPD) в концентрации 1, 10 и 100 мкг/мл оценивали по его способности модулировать цитотоксическое действие ФНО-α на линию L929 фибробластов мыши. Клетки L929 (2×10^4) помещали в лунки 96-луночных планшетов ("Nunc", Дания) в 100 мкл полной среды 199 ("Биолот", Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки ("Биолот") и инкубировали в течение 18 ч. Затем удаляли среду и к монослою клеток добавляли по 50 мкл полной среды 199, содержащей актиномицин Д (2 мкг/мл) ("Reanal", Венгрия), димебон, а затем двукратные разведения ФНО-α (от 100 нг/мл до 0,1 пг/мл) ("Reanal") и инкубировали при 37°C в CO₂-инкубаторе ("KEBO Biomed", Швеция). Через 18 ч в каждую лунку добавляли по 10 мкл раствора МТТ ("Sigma", США) в фосфатно-солевом буфере (PBS) (5 мг/мл) и инкубировали 2,5 ч. По истечении указанного времени супернатант удаляли, к оставшимся клеткам добавляли 100 мкл диметилсульфоксида (DMSO, "Биолот"), оптическую плотность измеряли при 540 нм на приборе Titertek Multiskan MCC ("Flow Laboratories", Финляндия). В аналогичном эксперименте первым добавляли рекомбинантный ФНО-α, клетки инкубировали в течение 15 мин, а затем добавляли препараты в указанных концентрациях. Жизнеспособность оценивали по формуле $C = [(A-B):A] \times 100\%$, где А – светопоглощение в контрольной лунке, В – светопоглощение в тестируемой лунке. Измерения проводили в четырёх повторах.

Исследование на животных

В экспериментах использовали 65 мышей-самцов линии С57В1 (20±2 г) Рекомбинантный ФНО-α и димебон вводили внутрибрюшинно отдельно и в комбинации. ФНО-α – в дозе 10 мкг на животное,

димебон – 2 мг/кг веса с интервалами: 4, 8, 12 и 24 ч. В качестве контроля использовали животных, которым в соответствующие промежутки времени вводили физраствор.

Липиды из отделов мозга экстрагировали по методу Bligh и Dyer [36].

Количество суммарных СМ и керамидов в различных отделах мозга здоровых животных определяли с помощью высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ). Фосфолипиды для определения содержания СМ разделяли методом одномерной тонкослойной хроматографии на стеклянных пластинках для ВЭТСХ размером 10×10 см с закреплённым слоем силикагеля (“Merck”, Германия). Хроматографию фосфолипидов проводили в системе хлороформ-метанол-муравьиная кислота (65 : 25 : 4, v/v/v). В качестве стандартов использовали фосфолипиды (СФМ, фосфатидилхолин, фосфатидилэтанолламин, фосфатидилинозит, фосфатидилсерин) фирмы “Sigma”.

Для разделения керамидов использовали две системы растворителей: сначала хроматографию проводили в этиловом эфире до высоты условно принятой за единицу, затем в системе хлороформ-метанол-вода (40 : 10 : 1, v/v/v) на 2/3 от первоначальной высоты.

Перед нанесением образцов пластинки чистили в соответствующей системе растворителей, затем сушили и активировали при 120°C в течение 1 ч. Образцы наносили в виде точек или полосок (1-3 мм) микрошприцем из расчёта 10 мкг соответствующего липида в пробе. После хроматографии пластинки сушили в вытяжном шкафу до исчезновения запаха растворителей.

Липидные пятна идентифицировали по расположению пятен стандартов. Для идентификации пятен липидов высушенные пластинки опрыскивали 10% раствором CuSO₄ в 8% фосфорной кислоте и нагревали при 160°C в течение 10 мин. Хроматограммы сканировали и денситометрировали с помощью сканера и компьютера, используя программу Sorbfill TLC. Количество сфинголипидов в пробе рассчитывали в мкг фосфолипида/мг белка.

Содержание суммарных фосфолипидов в экстрактах липидов определяли по количеству неорганического фосфора (P_i) с использованием молибдата аммония и аскорбиновой кислоты после сжигания липидов в хлорной кислоте. Интенсивность развивающегося голубого окрашивания регистрировали на спектрофотометре Beckman DU 530 при 830 нм. Количество фосфолипидов рассчитывали в мкг P_i/мг белка.

Выделенные липиды упаривали под током азота и растворяли в смеси хлороформ-метанол (2 : 1, v:v) в концентрации 6,8 мг/мл. Молекулярные виды СМ и керамидов исследовали при помощи хромато-масс-спектрометрии, анализировали методом ВЭЖХ/МС с использованием жидкостного хроматографа Surveyor

(“Thermo Electron”, Германия), соединённого с масс-спектрометром Esquire4000 (“Bruker”, Германия) с интерфейсом для ионизации электрораспылением.

ВЭЖХ проводили с использованием нормальнофазной колонки Luna Silica (2) (2×150 мм размер частиц 3 мкм (“Phenomenex”). В колонку вводили 2 мкл раствора липидов в хлороформе в исходной концентрации 6,8 мг/мл. Смесь липидов разделяли методом градиентного элюирования с использованием подвижных фаз А (97% ацетонитрил + 2% метанол + 1% уксусная кислота, раствор содержит 5 мМ ацетата аммония) и В (99% метанол + 1% уксусная кислота, раствор содержит 5 мМ ацетата аммония). Условия градиентного элюирования приведены в таблице 1. Скорость потока подвижных фаз составляла 100 мкл/мин.

Таблица 1. Градиентная программа для разделения липидов

Время, мин	Фаза А, %	Фаза В, %
0	70	30
3	70	30
13	0	100
18	0	100
19	70	30
22	70	30

Относительное содержание липидов в смеси оценивали при помощи внутреннего стандарта (ФЭА, 16:0/16:0). Для каждого липида (СМ и галактозилцерамида) вычисляли отношение площади под хроматографическим пиком этой молекулы к площади пика стандарта. Молекулярные виды липидов с различным содержанием жирных кислот идентифицировали при помощи базы данных (www.lipidmaps.org).

Содержание общих СМ, керамидов и фосфолипидов рассчитывали на единицу содержания белка, поскольку этот подход более правильно оценивает содержание липида в ткани, исключая значительные различия в содержании воды в различных структурах мозга.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерных программ Microsoft Excel и Origin Pro 6.1 методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при p≤0,05. На рисунках 2-7 приведены средние арифметические значения показателей, в качестве разброса экспериментальных данных указаны среднеквадратичные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние димебона на цитотоксическое действие ФНО-α на клетки L929 мыши

Клетки L929 высокочувствительны к действию ФНО-α. Показано, что димебон во всех использованных

концентрациях не оказывал защитного эффекта на клетки, подвергнутые предварительной обработке ФНО- α . В то же время предынкубация с димебоном защищала клетки от последующего добавления ФНО- α , причём эффект димебона зависел от его концентрации (рис. 2).

В концентрации 10 мкг/мл димебон оказывал выраженный защитный эффект (рис. 2Б), однако при концентрации 100 мкг/мл препарат был токсичен для клеток (рис. 2В).

Полученные данные дают возможность предположить, что димебон в концентрации 10 мкг/мл препятствует токсическому эффекту ФНО- α .

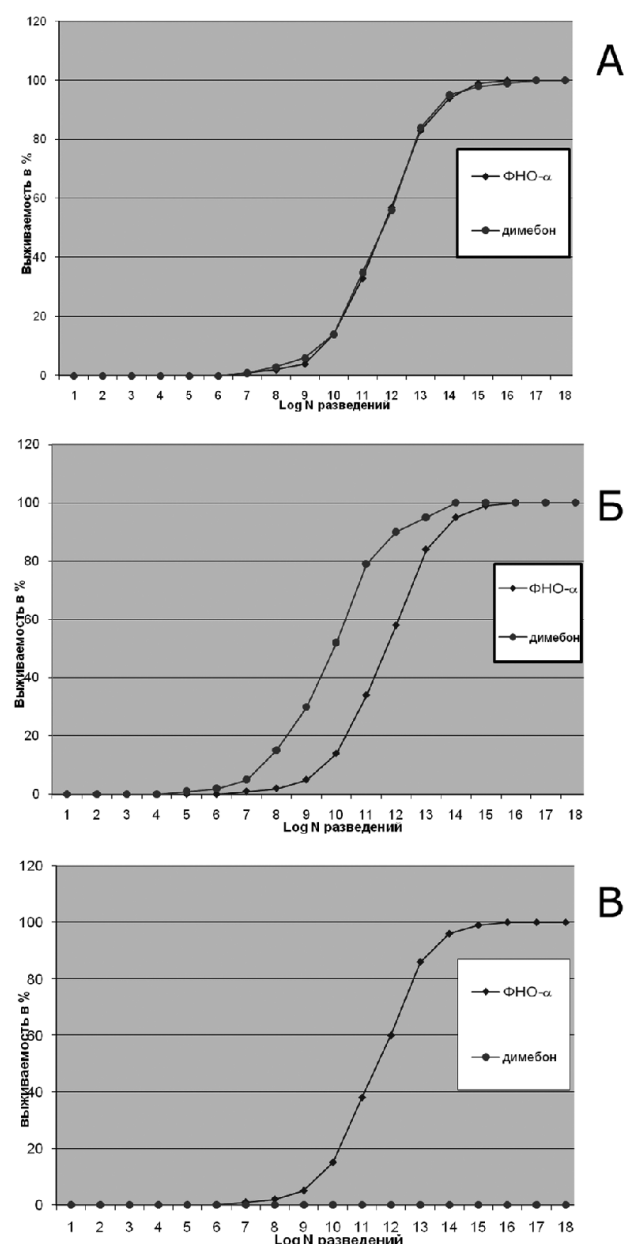


Рисунок 2. Влияние димебона в концентрации 1 мкг/мл (А), 10 мкг/мл (Б), 100 мкг/мл (В) на выживаемость линии L929 фибробластов мыши, инкубированных с ФНО- α , после предварительного 15 мин контакта клеток с димебоном.

Содержание сфинголипидов, церамидов и общих фосфолипидов в гиппокампе, коре и мозжечке мозга мышей линии C57Bl

Согласно полученным данным (табл. 2), больше всего СМ содержится в мозжечке (17,5 мкг/мг белка), меньше всего в коре – 8,1 мкг/мг белка. Количество СМ в гиппокампе занимает промежуточное положение – 12,4 мкг/мг белка. Содержание церамидов соответствует содержанию СМ в каждой структуре мозга (табл. 2). Однако соотношение церамидов и СМ в коре самое низкое, в то время как в гиппокампе и мозжечке оно практически одинаково (табл. 2). Гиппокамп наиболее обогащён фосфолипидами (19,3 мкг Р_i/мг белка) по сравнению с другими структурами (табл. 2). В коре фосфолипидов как и СМ меньше всего.

Таблица 2. Содержание церамидов (Цер), сфингомиелинов (СМ) и общих фосфолипидов (ФЛ) в мозжечке, коре и гиппокампе здоровых мышей C57bl

Отдел мозга	Липид	Содержание
Мозжечок	СМ	17,5±1,8
	Цер	4,9±0,4
	Цер/СМ	0,25
	ФЛ	11,9±1,2
Кора	СМ	8,1±0,7
	Цер	1,03±0,1
	Цер/СМ	0,1
	ФЛ	7,1±0,9
Гиппокамп	СМ	12,4±1,1
	Цер	3,2±0,4
	Цер/СМ	0,26
	ФЛ	19,3±1,2

Примечание. Содержание церамидов и сфингомиелинов выражено в мкг/мг белка, общих фосфолипидов – мкг Р_i/мг белка.

Влияние ФНО- α и димебона на содержание СМ и гликозилированных церамидов в гиппокампе мышей

В гиппокампе количество гликозилированных церамидов значительно увеличивается по сравнению с контрольным уровнем только через 24 ч после введения ФНО- α . Добавление димебона или димебона вместе с ФНО- α не приводило к статистически значимому изменению уровня церамидов на протяжении всего опыта, включая 24 ч после начала эксперимента (рис. 3А). Этот факт особенно важен, так как нарушение баланса гликозилированных церамидов связано с развитием ряда нейропатологий, в том числе БА [33].

Уровень СМ в гиппокампе на всем промежутке времени после введения ФНО- α значительно превосходил контрольные значения, а добавление димебона не влияло существенно на этот параметр (рис. 3Б). При совместном введении ФНО- α и димебона уровень СМ в гиппокампе возвращался к контрольным значениям (рис. 3В).

Таким образом, димебон предупреждает действие ФНО- α на сфинголипиды гиппокампа. Последнее особенно важно, так как именно СМ является

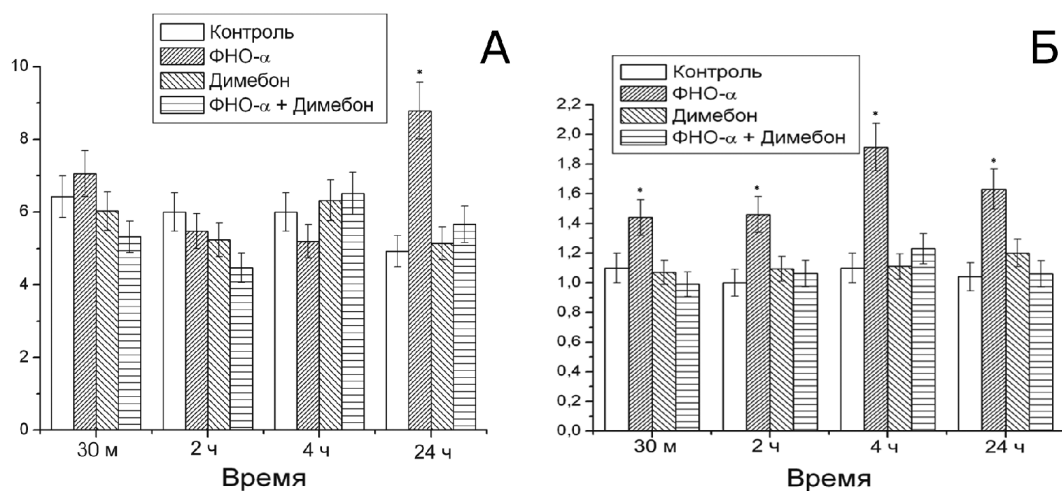


Рисунок 3. Изменение содержания гликозилированных церамидов (А), и сфингомиелинов (Б) в гиппокампе после введения ФНО-α, димебона и их комбинации. Здесь и на рисунках 4 и 5 результаты представлены в виде гистограмм, где по оси абсцисс отложено время, через которое животные были декапитированы, а по оси ординат – суммарные значения сигналов от всех молекул гликозилированных церамидов и сфингомиелинов.

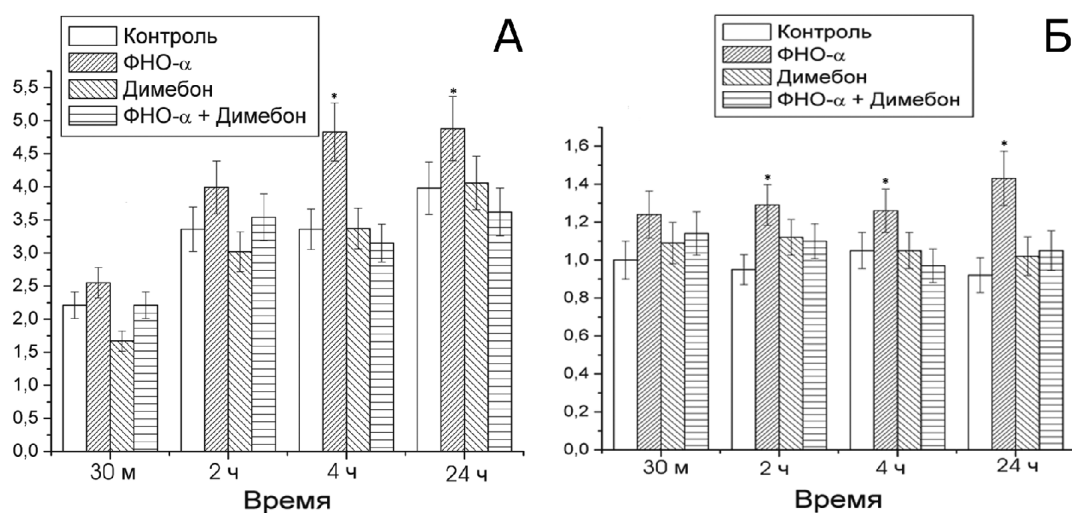


Рисунок 4. Изменение содержания гликозилированных церамидов (А) и сфингомиелинов (Б) в коре после введения ФНО-α, димебона и их комбинации.

источником вторичных посредников – церамидов и сфингозинов, которые участвуют в проведении токсического сигнала ФНО-α.

Влияние ФНО-α и димебона на содержание СМ и гликозилированных церамидов в коре мозга мышей

Наиболее значимые изменения в содержании гликозилированных церамидов в коре головного мозга были выявлены через 24 ч после введения ФНО-α, однако отличия были заметны уже через 4 ч (рис. 4А). Содержание СМ было повышено на всех сроках действия ФНО-α (рис. 4Б). Димебон, так же как и в гиппокампе, практически не влиял на содержание липидов в коре и восстанавливал их уровень при совместном введении с ФНО-α (рис. 4А,Б).

Влияние ФНО-α и димебона на содержание СМ и гликозилированных церамидов в мозжечке мышей

Характер изменений в содержании СМ и гликозилированных церамидов в мозжечке

при введении ФНО-, димебона и их комбинации был сходен с изменениями в гиппокампе и коре (рис. 5А,Б). Таким образом, введение ФНО-α приводит к повышению уровня СМ и гликозилированных церамидов во всех отделах мозга по сравнению с контролем, тогда как димебон нормализует изменения, вызванные ФНО-α, снижая уровень липидов до контрольного значения.

Влияние ФНО-α, димебона и их комбинации на спектр сфинголипидов и гликозилированных церамидов в структурах мозга мышей через 24 ч после введения препаратов

На рисунках 6 и 7 показаны изменения уровней молекулярных видов гликозилированных церамидов и СМ в гиппокампе, коре и мозжечке через 24 ч после введения ФНО-α и димебона по отдельности или совместно. Из представленных результатов видна избирательность действия ФНО-α и димебона на различные виды липидов. В гиппокампе церамиды наиболее лабильны, чем в других структурах мозга.

ФНО-АЛЬФА - МИШЕНЬ ДЛЯ ДИМЕБОНА

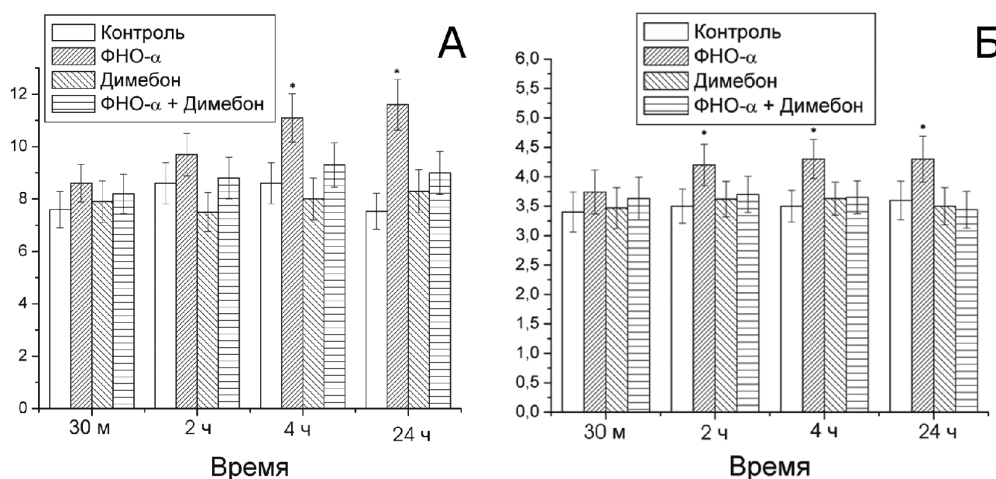


Рисунок 5. Изменение содержания гликозилированных церамидов (А) и сфингомиелинов (Б) в мозжечке при введении ФНО-α, димебона и их комбинации.

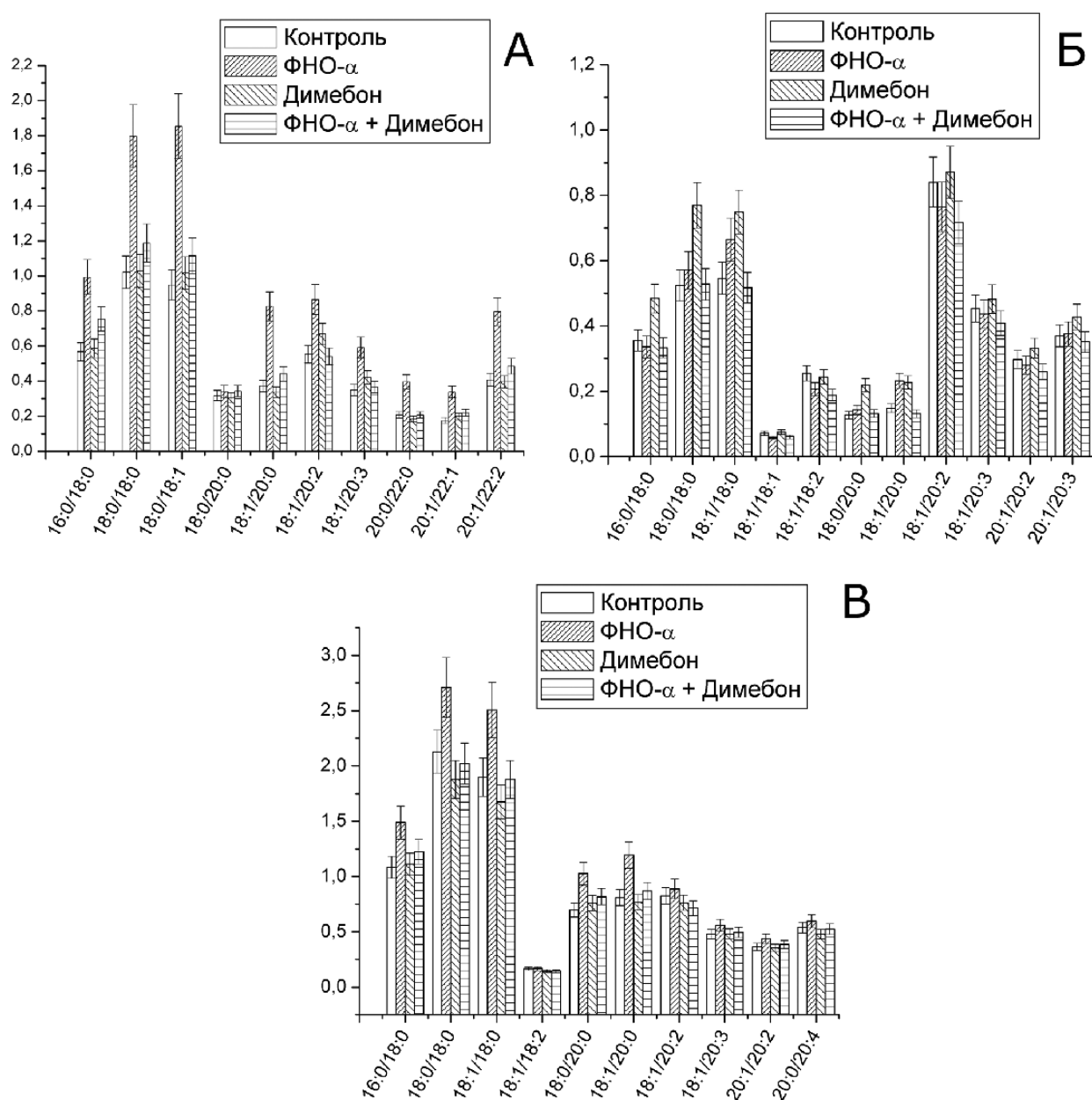


Рисунок 6. Изменения содержания гликозилированных церамидов в гиппокампе (А), коре (Б) и мозжечке (В) через 24 ч после введения ФНО-α, димебона и их комбинации.

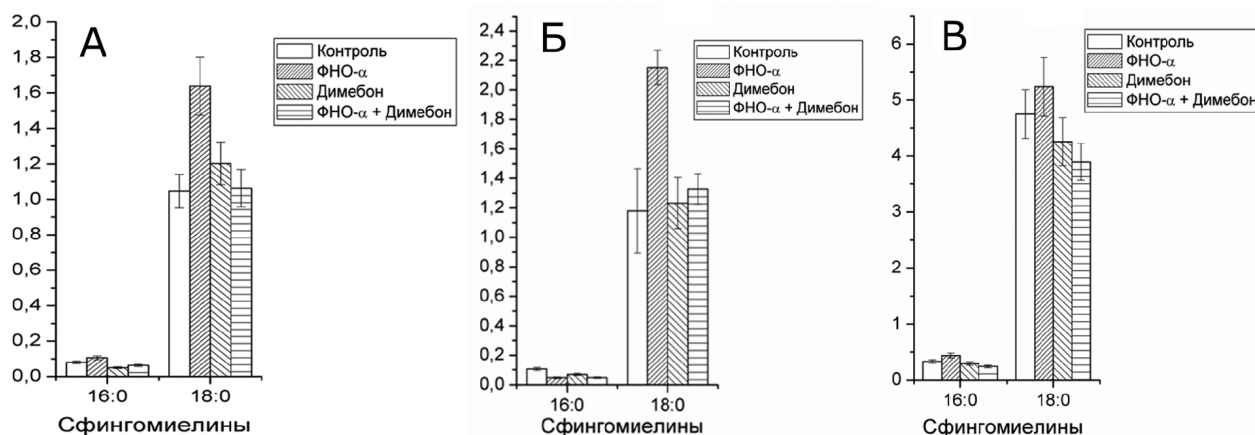


Рисунок 7. Изменение содержания сфингомиелинов в гиппокампе (А), коре (Б) и мозжечке (В) через 24 ч после введения ФНО-α, димебона и их комбинации.

Введение ФНО-α приводит к повышению содержания гликозилированных церамидов с C18:0/18:0, C18:0/18:1, C18:1/20:0 и C20:1/22:2 в гиппокампе. В коре ФНО-α не вызывает таких значительных колебаний уровней церамидов, тогда как димебон повышал содержание церамидов с C18:0/18:0 и C18:1/18:0 в этой структуре мозга (рис. 7). В мозжечке ФНО-α также повышал уровень практически тех же видов церамидов, что и в гиппокампе, но менее значительно (рис. 6). Содержание СМ с C18:0 значительно увеличивается в гиппокампе и коре под действием ФНО-α, а димебон практически не влияет на этот вид СМ. Существенных изменений молекулярных видов СМ в мозжечке не отмечено (рис. 7).

Таким образом, влияние димебона на спектр СМ и церамидов не так выражено, как ФНО-α, что соответствует данным для суммарной фракции каждого липида. Совместное введение ФНО-α и димебона приводит либо к снижению, либо к нормализации всех молекулярных видов СМ и церамидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами показано, что после введения ФНО-α как в гиппокампе, так и в коре и мозжечке мышей существенно изменяется уровень суммарных фракций СМ и гликозилированных церамидов (рис. 3-5). В гиппокампе наиболее выражены изменения СМ (рис. 3Б). По-видимому, увеличение концентрации СМ в этом отделе мозга можно рассматривать как компенсаторную реакцию на повышение активности сфингомиелиназы, зафиксированное ранее [37, 38] или же активация фермента может быть вызвана повышением концентрации субстрата. Димебон практически не вызывает изменений содержания суммарных СМ и церамидов, но при совместном введении с ФНО-α препятствует повышению их содержания, которое индуцируется этим цитокином. Нами обнаружена избирательность действия ФНО-α и димебона на определенные молекулярные виды сфинголипидов в различных отделах головного мозга мышей. Следует подчеркнуть, что димебон действует практически на все молекулярные виды СМ и гликозилированных

церамидов во всех изученных структурах мозга животных (рис. 6, 7), хотя суммарный баланс каждой фракции меняется незначительно (рис. 3-5). Наиболее явно способность димебона к ослаблению действия ФНО-α выражена во всех отделах мозга через 24 ч после введения индукторов. Именно в эти сроки ФНО-α вызывает наибольшие изменения в содержании как СМ, так и церамидов.

Наши результаты свидетельствуют о том, что нейротропный димебон обладает способностью к коррекции изменений в сфинголипидном составе различных отделов головного мозга, вызванных токсическим действием ФНО-α, при этом введение димебона не оказывает существенного влияния на содержание церамидов в использованном временном интервале (в течение 24 ч). Возможно, что важной мишенью для димебона являются как ФНО-α, так и его рецепторы. В пользу этого предположения свидетельствуют результаты наших экспериментов, в которых влияние димебона на цитотоксическое действие ФНО-α изучали на культуре клеток L929 фибробластов мыши. Предварительная обработка клеток димебоном препятствует токсическому действию цитокина. Можно предположить, что димебон подавляет взаимодействие ФНО-α с рецепторами, препятствуя реализации его действия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Матвеева И.А. (1983) Фармакол. токсикол., **46**, 27-29.
2. Bachurin S., Bukatina E., Lermontova N., Tkachenko S., Afanasiev A., Grigoriev V., Grigorieva I., Ivanov Y., Sablin S., Zefirov N. (2001) Ann. N.Y. Acad. Sci., **939**, 425-435.
3. Doody R.S., Gavrilova S.I., Sano M., Thomas R.G., Aisen P.S., Bachurin S.O., Seely L., Hung D. (2008) Lancet, **372**, 207-215.
4. Устюгов А.А., Шелковникова Т.А., Кохан В.С., Христанкова И.В., Петерс О., Бухман В.Л., Бачурин С.О., Нинкина Н.Н. (2011) Бюлл. экпер. биол. мед., **152**, 675-678.
5. Христанкова И.В., Кухарский М.С., Лыткина О.А., Бачурин С.О., Шорнинг Б.Ю. (2012) Докл. РАН, **446**, 471-473.
6. Steele J.W., Gandy S. (2013) Autophagy, **4**, 617-618.

7. Шевцова Е.Ф., Киреева Е.Г., Бачурин С.О. (2001) Бюлл. exper. биол. мед., **132**, 652-656.
8. Шевцова Е.Ф., Киреева Е.Г., Бачурин С.О. (2005) Вестник РАМН, №9, 13-17.
9. Burns A., Jacoby R. (2008) Lancet, **372**, 179-180.
10. Sachdeva D., Burns A. (2011) CNS Neurosci. Ther., **3**, 199-205.
11. Fiers W. (1991) FEBS Lett., **285**, 199-212.
12. Vassali P. (1992) Ann. Rev. Immunol., **10**, 411-452.
13. Smith J.A., Das A., Ray S.K., Banik N.L. (2012) Brain Res. Bull., **87**, 10-20.
14. Cacquevel M.L., Lebourrier N., Chéenne S., Vivien D. (2004) Curr. Drug Targets, **5**, 529-534.
15. Montgomery S.L., Bowers W.J. (2012) J. Neuroimmune Pharmacol., **7**, 42-59.
16. Arvin B., Neville L.F., Barone F.C., Feuerstein G.Z. (1996) Neurosci. Biobehav. Rev., **20**, 445-452.
17. Clark I.A., Alleva L.M., Vissel B. (2010) Pharmacol. Ther. **128**, 519-448.
18. Hoffmann O., Zipp F., Weber J.R. (2009) J. Mol. Med. (Berl), **87**, 753-763.
19. Rubio-Perez J.M., Morillas-Ruiz J.M. (2012) Scientific World J., **2012**, 1-15.
20. Perry R.T., Collins J.S., Wiener H., Acton R., Go R.C. (2001) Neurobiol. Aging, **22**, 873-883.
21. McAlpine F.E., Tansey M.G. (2008) J. Inflamm. Res., **1**, 29-39.
22. Рожнова У.А., Степаничев М.Ю., Коробко В.Г., Гуляева Н.В., Алесенко А.В. (1999) Нейрохимия, **16**, 302-309.
23. Osburg B., Domling D., Schomburg L., Ko Y.T., Voigt K., Bickel U. (2002) Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., **283**, 899-908.
24. Engelhardt B. (2006) J. Neural Transm., **113**, 477-485.
25. Giri R., Shen Y., Stins M., Schmidt A.M., Stern D., Kim K.S., Kalra V.K. (2000) Am. J. Physiol. Cell Physiol., **279**, 1772-1781.
26. Adibhatla R.M., Hatcher J.F. (2008) Subcell. Biochem., **49**, 241-268.
27. Tweedie D., Sambamurti K., Greig N.H. (2007) Curr. Alzheimer Res., **4**, 378-385.
28. Tettamanti G., Prinetti A., Bassi R., Viani P., Giussani P., Riboni L. (1996) J. Lipid. Mediat. Cell. Signal. **14**, 263-275.
29. Martinez T., Chen X., Bandyopadhyay S., Merrill A., Tansey M. (2012) Mol. Neurodegener., **13**, 7-45.
30. Jana A., Hogan T.L., Pahan K. (2009) J. Neurol. Sci., **278**, 5-15.
31. Barth B.M., Gustafson S.J., Kuhn T.B. (2012) J. Neurosci. Res., **90**, 229-242.
32. Wheeler D., Knapp E., Bandaru V.V.R., Wang Y., Knorr D., Poirier C., Mattson M.P., Geiger J.D., Haughey N.J. (2009) J. Neurochem., **109**, 1237-1249.
33. Алесенко А.В. (2013) Биомед. химия, **59**, 25-50.
34. Tobinick E. (2009) CNS Drugs, **23**, 713-725.
35. Frankola K.A., Greig N.H., Luo W., Tweedie D. (2011) CNS Neurol. Disord. Drug Targets, **10**, 391-403.
36. Bligh T.G., Dyer W.J. (1959) Can. J. Biochem. Physiol., **37**, 911-917.
37. Alessenko A.V., Bugrova A.E., Dudnik L.B. (2004) Biochem. Soc. Trans., **32**, 144-146.
38. Alessenko A.V. (2006) in: New Research on Alzheimer's Disease (Welsh E.M., ed), Nova Science Publishers, Inc. (2004) 168-189.

Поступила: 30. 04. 2014.
Принята к печати: 20. 10. 2014.

TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA - POTENTIAL TARGET FOR NEUROPROTECTOR DIMEBON

A.V. Alessenko¹, S.O. Bachurin², S.V. Gurianova³, Y.O. Karatasso¹, E.F. Shevtsova², L.N. Shingarova³

¹Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences,
ul. Kosygina, 4, Moscow, 199334 Russia, fax: (7)4991374101; e-mail: ales@sky.chph.ras.ru

²Institute of Physiologically Active Substances of the Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Russia

³Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Dimebon (Dimebolin) is an antihistamine drug which has been used in Russia since 1983. Recently Dimebolin has attracted renewed interest after being shown to have positive effects on persons suffering from Alzheimer's disease. Animal studies have shown that dimebon acts through multiple mechanisms, both blocking the action of neurotoxic beta-amyloid peptides and inhibiting L-type calcium channels, modulating the action of AMPA and NMDA glutamate receptors. Our experiments with cell culture L929 and mice have shown that dimebon may exert its neuroprotective effect by blocking cytotoxic signals induced by proinflammatory cytokines such as TNF- α which are believed to play a central role in Alzheimer's disease. Dimebon (10 μ g/ml) protected mouse fibroblasts L929 against the toxic action of TNF- α . Our study included 65 male mice. TNF- α (10 μ g per mouse), dimebon (0,2 mg/kg) and their combination were injected intraperitoneally. Changes in the level of molecular species of sphingomyelin and galactosyl ceramide in hippocampus, cerebellum and cerebral cortex within 30 min, 2 h, 4 h, and 24 h after injection were detected by chromato-mass-spectrometry. Maximal changes in sphingomyelin and galactosyl ceramides contents of different molecular species after single TNF- α administration were found in the hippocampus, and were less expressed in the cerebral cortex and cerebellum after 24 h. Dimebon itself did not induce changes in the sphingolipid spectrum in brain sections, but protected them against disorders induced by TNF- α in the brain. Modern strategies in the search of new therapeutic approaches are based on the multitarget properties of new drugs. According to our results TNF- α may serve as a new target for dimebon.

Key words: dimebon, TNF- α , lipids, mice brain, mice fibroblasts L929