

## ВЛИЯНИЕ ДИМЕБОНА НА МИКРОВЯЗКОСТЬ МЕМБРАН ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА КЛЕТОК МОЗГА МЫШЕЙ *in vivo*

© 2016 г. Н.Ю. Герасимов, О.В. Неврова, В.В. Каспаров, А.Л. Коварский,  
А.Н. Голощапов, Е.Б. Бурлакова

*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4*

*E-mail: n.yu.gerasimov@gmail.com*

Поступила в редакцию 24.06.15 г.

После доработки 10.12.15 г.

Изучено влияние нейропротектора димебона на микровязкость мембран эндоплазматического ретикулума, выделенных из мозга мышей после хронического введения препарата. В ходе исследований было обнаружено, что нейропротектор димебон уменьшает микровязкость при-белковых областей мембран микросом. Исследуемый нейропротектор не влияет на термоиндуцированные структурные переходы и энергию активации соответствующих структурных состояний. По-видимому, это связано с недостаточной концентрацией нейропротектора внутри клетки.

*Ключевые слова: текучесть мембран, димебон, спиновый зонд, структура мембран, липид-белковые взаимодействия.*

Болезнь Альцгеймера представляет собой нейродегенеративное заболевание, которое является основной причиной деменции в пожилом возрасте. Хотя данная патология была описана более века назад, до сих пор не существует эффективного лечения, которое бы восстанавливало когнитивные функции пациентов. Последние несколько лет антигистаминовый препарат димебон (рис. 1) рассматривается как перспективный нейропротектор и предлагается для лечения многих нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, хорея Гентингтона [1,2], а также шизофрении [2]. Механизм действия данного препарата до конца неизвестен, но было показано, что димебон способен модулировать работу некоторых систем, таких как потенциально индуцируемые кальциевые каналы, NMDA- и AMPA-каинатные рецепторы [3–5]. Несмотря на то, что димебон не показал значительных результатов в некоторых клинических испытаниях [2], он имеет перспективный нейропротекторный статус и хорошо переносится как при индивидуальном приеме, так и в комплексе с другими препаратами [1,5].

Наши предыдущие исследования показали, что при развитии болезни Альцгеймера нару-

шается структурное состояние мембран по сравнению с контрольной группой [6], а именно наблюдалось увеличение текучести липидного бислоя у пациентов с болезнью Альцгеймера. Следовательно, при подходе к терапии деменции следует учитывать структурное состояние мембран. Поэтому исследования данной работы были направлены на изучение действия димебона на структуру мембран эндоплазматического ретикулума.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Димебон вводили экспериментальным животным (самки беспородных мышей массой по 20–23 г) ежедневно внутрибрюшинно в концентрации 1 мг/кг. Пробы были взяты через 3, 7 и 15 сут после введения.

Образец представлял собой объединенную фракцию эндоплазматического ретикулума, выделенную из мозга шести–восьми мышей, каждую точку измеряли четыре–пять раз. Мембраны эндоплазматического ретикулума выделяли методом дифференциального центрифугирования в сахарозе [7].

Текучесть липидного бислоя мембран определяли методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) спиновых зондов. В качестве зондов использовали стабильные нитроксильные радикалы 2,2,6,6-тетраметил-4-каприлои-

Сокращение: ЭПР – электронный парамагнитный резонанс.

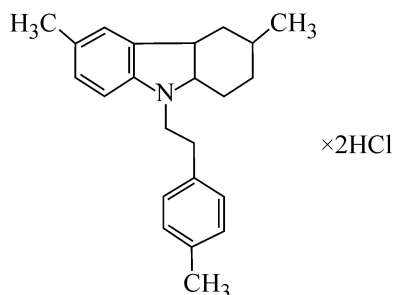


Рис. 1. Структурная схема димебона.

локсилпиперидин-1-оксил (зонд I) и 5,6-бензо-2,2,6,6-тетраметил-1,2,3,4-тетрагидро-*g*-карболин-3-оксил (зонд II), синтезированные в Институте химической физики им. Н.Н. Семенова РАН (рис. 2).

В работе [8] было показано, что зонд I преимущественно локализуется в поверхностном слое липидных компонент мембраны, а зонд II – в липидах, прилегающих к белкам, что позволяет по поведению зондов I и II в липидном бислое судить о липид-белковых взаимодействиях в мембранах. Для удобства изложения мы в последующем будем называть зонд I «липидным», а зонд II – «белковым».

Из полученных спектров ЭПР (рис. 3) рассчитывали время корреляции вращательной подвижности ( $\tau_c$ ), характеризующее микровязкость компонент мембраны, по формуле  $\tau_c = 6,65 \cdot 10^{-10} \times \Delta H_+ \times ((I_+/I_-)^{0,5} - 1)$ , приведенной в работе [9]. Регистрацию спектров ЭПР проводили в диапазоне температур 283–317 К (10–44°C) на радиоспектрометре ER 200D-SRC (Bruker, США).

Известное соотношение Стокса–Энштейна (см., например, [10]) связывает параметр  $\tau_c$  и вязкость среды, окружающей зонд, соотношением  $\tau_c = \eta V/kT$ , где  $V$  – объем молекулы радикала (его можно считать пропорциональным молекулярному весу);  $\eta$  – динамическая вязкость среды;  $k$  – постоянная Больцмана и  $T$  – абсолютная температура. Динамическая вязкость  $\eta$  связана с температурой эмпирическим соотношением  $\eta = A'e^{b/T}$  [11], откуда следует, что  $\ln \tau_c = A'' + b/T + \ln(1/T)$ , где  $A'$ ,  $A''$ ,  $b$  – константы. Исследуемый нами температурный интервал (от 283 до 317 К) достаточно узок, на его протяжении  $\ln(1/T)$  меняется очень незначительно по сравнению со слагаемым  $b/T$ , поэтому можно считать, что  $\ln \tau_c = a + b/T$ . Таким образом, экспериментальные кривые должны спрямляться в координатах  $\ln \tau_c$  и  $1/T$ . Однако так ведут себя лишь простые, однокомпонентные системы. Мем-

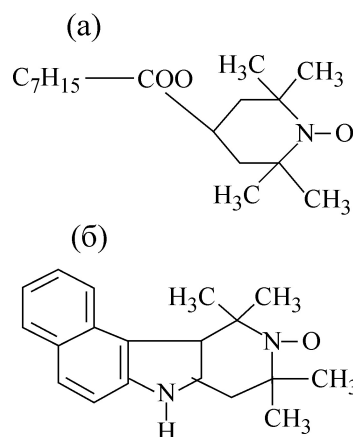


Рис. 2. Структурные схемы зонда I (а) и зонда II (б).

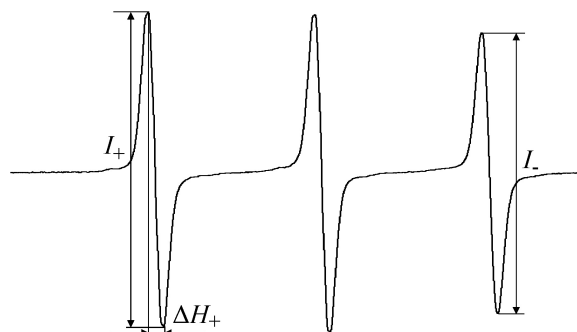


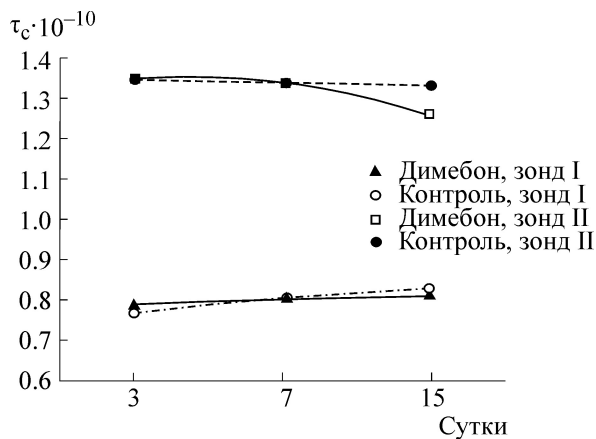
Рис. 3. Типичный ЭПР-спектр для зондов I и II.

бранные структуры являются системами, характеризующимися наличием термоиндуцируемых структурных переходов. Исходя из этой точки зрения, график зависимости  $\ln \tau_c$  от  $1/T$  для таких структур должен представлять собой ломаную линию, точки излома которой являются точками структурных переходов [12]. Наклон отдельных участков этой линии позволяет определить энергию активации переходов  $\Delta E_a = bR$  [13], где  $b$  – коэффициент угла наклона соответствующего прямого участка, а  $R$  – универсальная газовая постоянная. Энергия активации соответствует энергии перестройки одного моля липидов мембран [13].

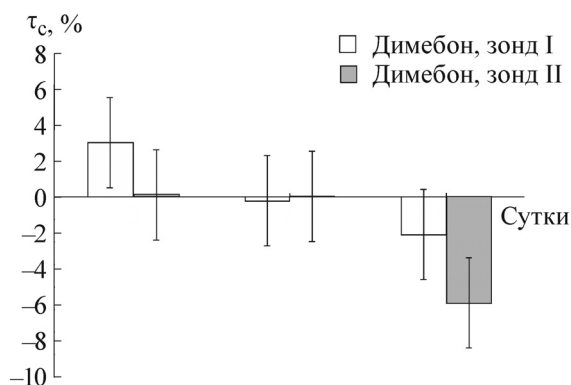
Статистическую обработку данных осуществляли методами параметрической статистики с использованием пакетов компьютерных программ Microsoft® Office Excel и Origin® 6.1 при статистической надежности 95%.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе изучено влияние нейротропного димебона на микровязкость мембран эндоплазматического ретикула, выде-

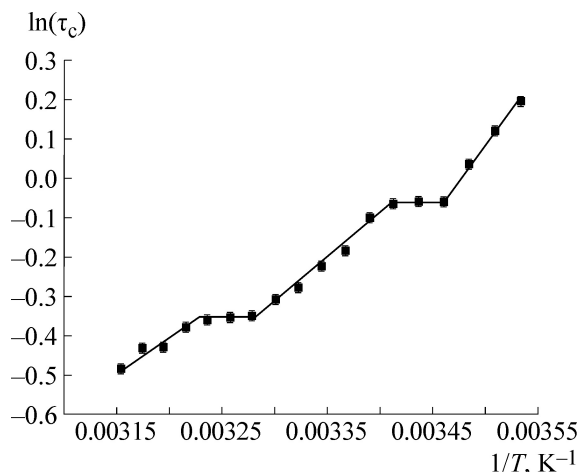


**Рис. 4.** Зависимость  $\tau_c$  от времени введения димебона для мембран эндоплазматического ретикулума при температуре 297 К.



**Рис. 5.** Зависимость относительных изменений  $\tau_c$  с течением времени при введении димебона для мембран эндоплазматического ретикулума при температуре 297 К.

ленных из мозга мышей на 3, 7 и 15 сут после хронического введения препарата. На рис. 4 представлены изменения времен корреляции вращательной диффузии при белковых (зонд II) и липидных (зонд I) областей мембран эндоплазматического ретикулума при 24°C (297 К). Выбор данной температуры обусловлен отсутствием термоиндуцированных структурных переходов в мембранах для всех исследованных образцов. Как видно из рис. 4, при воздействии димебона динамика микровязкости разных областей мембран носит антибатный характер, а именно, микровязкость при белковых областей падает с течением времени, а липидных – имеет тенденцию к росту. Такие изменения текучести разных областей мембран характерны для нормы [14]. Значения  $\tau_c$  для мембран, выделенных из мозга мышей контрольной группы, оставались практически неизменными, при этом микровязкость липидных областей мембран, как и



**Рис. 6.** Зависимость  $\ln(\tau_c)$  от  $1/T$  для зонда I в мембранах эндоплазматического ретикулума.

для опытной группы, имеет очевидную тенденцию к росту.

На рис. 5 показаны относительные изменения микровязкости липидного бислоя при введении димебона. Микровязкость липидных областей мембран остается практически на уровне контроля в течение всего эксперимента. Наблюдаемые незначительные отклонения текучести в данных областях липидного бислоя обусловлены в большей степени изменениями времени корреляции вращательной диффузии для контрольной группы (рис. 4). Основные изменения вязкостных свойств липидного бислоя происходят в при белковых областях мембран эндоплазматического ретикулума, где микровязкость остается на уровне контроля вплоть до 7-х суток, а на 15-е сутки хронического введения димебона существенно уменьшается. Кроме того, при исследовании температурной зависимости времени корреляции вращательной диффузии было выявлено, что подобное увеличение текучести наблюдалось на всем исследуемом диапазоне температур. Так как при развитии деменции альцгеймеровского типа существенно увеличивается текучесть мембран [6], то дальнейшее ее увеличение при воздействии димебона может привести к разрушению мембран и, тем самым, появлению нежелательных побочных эффектов. С целью повышения эффективности димебона при терапии болезни Альцгеймера, по нашему мнению, следует учитывать изменения структуры мембран и применять данный нейропротектор в комплексе с препаратами, увеличивающими микровязкость липидного бислоя.

На рис. 6 показан пример зависимости времени корреляции вращательной диффузии от

		Микросомы												Синапсосомы											
		3-и сутки				7-е сутки				15-е сутки				3-и сутки				7-е сутки				15-е сутки			
		Контроль		Димебон		Контроль		Димебон		Контроль		Димебон		Контроль		Димебон		Контроль		Димебон		Контроль		Димебон	
T, K	T, °C	Зонд I	Зонд II	Зонд I	Зонд II	Зонд I	Зонд II	Зонд I	Зонд II	Зонд I	Зонд II	Зонд I	Зонд II	Зонд I	Зонд II	Зонд I	Зонд II	Зонд I	Зонд II	Зонд I	Зонд II	Зонд I	Зонд II	Зонд I	Зонд II
283	10	25	33	23	33	25	32	23	35	28	30	28	28	31	19	21	24	21		24	62*	18	23	22	18
285	12																	28							
287	14																								
289	16																								
291	18																								
293	20			16	24			15	24			17	23				23				23				35
295	22	15	23			15	21			18	27			19	20			13	22		56	14	20		
297	24															16									
299	26																								
301	28																								
303	30																								31
305	32																				27				
307	34																								
309	36																								
311	38																								
313	40																								
315	42																								
317	44																								

Рис. 7. Структурные переходы в мембранах эндоплазматического ретикула под воздействием повседневного введения димебона с соответствующими энергиями активации; \* – достоверность < 70%.

температуры в аррениусовских координатах,  $\ln(\tau_c)$  от  $1/T$ , для мембран эндоплазматического ретикула. В обеих областях мембран наблюдаются два термоиндуцированных структурных перехода при температурах 16–20°C (289–293 K) и 32–38°C (305–311 K) для контрольной группы, и 16–18°C (289–291 K) и 32–38°C (305–311 K) для опытной группы. Термоиндуцированные переходы в мембранах эндоплазматического ретикула при введении димебона наблюдаются при тех же температурах, что и для контроля, и не сдвигаются по шкале температур с течением всего времени эксперимента (рис. 7). Как мы видим, димебон не оказал такого существенного влияния на структуру мембран эндоплазматического ретикула, как в случае мембран синапсосом, где через семь суток после введения появляется дополнительный структурный переход при температурах 24–28°C (рис. 7).

Полученные результаты можно объяснить несколькими факторами: либо димебон не связывается с белками эндоплазматического ретикула и, таким образом, не влияет на структуру липидного бислоя, либо недостаточной концентрацией препарата внутри клетки. Как показано нами ранее [15], на первые сутки после введения препарата уменьшалась микровязкость мембран синапсосом. С течением времени микровязкость возвращалась к норме. При хроническом введении димебона в приобластных

областях мембран синапсосом появляется дополнительный структурный переход при температурах 24–30°C (рис. 7). По-видимому, димебон жестко связывается с каналами и рецепторами синапса, а возможно, и всей плазматической мембраны, не попадая, таким образом, внутрь клетки в достаточной концентрации. Поэтому существенные изменения структурных характеристик мембран эндоплазматического ретикула не наблюдались на протяжении всего эксперимента. Кроме того, димебон, связываясь с кальциевыми каналами, затрудняет транспорт ионов  $Ca^{2+}$  через плазматическую мембрану [3,4,16], меняя, таким образом, концентрацию ионов кальция внутри клетки. Это может быть причиной изменения текучести мембран эндоплазматического ретикула, наблюдаемые нами на 15-е сутки хронического введения нейропротектора.

С другой стороны, при однократном введении димебона зафиксировано резкое увеличение текучести приобластных областей мембран синапсосом [15]. За этим следовало существенное изменение структуры мембран с одновременным возвращением микровязкости к норме. В случае с мембранами эндоплазматического ретикула резкое уменьшение микровязкости приобластных областей происходит только на 15-е сутки после введения препарата. Возможно, увеличение концентрации димебона внутри

клетки при дальнейшем его введении приведет к подобным значительным изменениям структуры мембран и появлению дополнительного структурного перехода.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследований было обнаружено, что нейропротектор димебон уменьшает микровязкость прикелковых областей мембран микросом, что может привести к разрушению мембран пациентов с болезнью Альцгеймера и, тем самым, появлению нежелательных побочных эффектов. Препарат при этом не влияет на термоиндуцированные структурные переходы и энергию активации соответствующих структурных состояний. Вероятно, это связано с недостаточной концентрацией нейропротектора внутри клетки.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. R. Bharadwaj, K. A. Bates, T. Porter, et al., *Transl. Psychiatry* **3** (12), 332 (2013).
2. N. Cano-Cuenca, J. E. Solis-Garcia Del Pozo, and J. Jordan, *J. Alzheimers Dis.* **38** (1), 155 (2014).
3. S. Bachurin, S. Tkachenko, I. Baskin, et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **939**, 219 (2001).
4. V. V. Grigorev, O. A. Dranyi, and S. O. Bachurin, *Bull. Exp. Biol. Med.* **136** (5), 474 (2003).
5. R. S. Doody, S. I. Gavrilova, M. Sano, et al., *Lancet* **372**, 207 (2008).
6. Н. Ю. Герасимов, А. Н. Голощапов и Е. Б. Бурлакова, *Хим. физика* **28** (7), 82 (2009).
7. М. И. Прохорова, *Методы биохимических исследований* (Изд-во Ленинград. ун-та, 1982).
8. В. И. Бинюков, С. Ф. Борунова, М. Г. Гольдфельд и др., *Биохимия* **36** (6), 1149 (1971).
9. А. М. Вассерман, А. Л. Бучаченко, А. Л. Коварский и И. Б. Нейма, *Высокомолекуляр. соединения* **10A**, 1930 (1968).
10. А. Н. Кузнецов, *Метод спинового зонда* (Наука, Москва, 1976).
11. Х. Кухлинг, *Справочник по физике* (Мир, Москва, 1983).
12. D. Chapman, *Quart. Rev. Biophys.* **8**, 185 (1975).
13. M. Shinitzky and M. Inbar, *Biochim. Biophys. Acta* **433**, 133 (1976).
14. А. Н. Голощапов и Е. Б. Бурлакова, *Биофизика* **25** (1), 97 (1980).
15. Н. Ю. Герасимов, В. В. Каспаров, О. В. Неврова и др., *Биофизика* **58** (2), 252 (2013).
16. V. V. Grigoriev, A. N. Proshin, A. S. Kinzirkii, and S. O. Bachurin, *Bull. Exp. Biol. Med.* **153** (3), 298 (2012).

## Influence of Dimebon on Microviscosity of the Endoplasmic Reticulum Membranes of Mice Brain Cells *in vivo*

N.Yu. Gerasimov, O.V. Nevrova, V.V. Kasparov, A.L. Kovarskii,  
A.N. Goloshchapov, and E.B. Burlakova

*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia*

The neuroprotective effect of dimebon on microviscosity of the endoplasmic reticulum membranes, isolated from mice brain, after chronic injection of the drug was studied. As part of the study it was found that the dimebon-neuroprotector decreases the microviscosity of the near-protein regions of the microsomal membranes. The neuroprotector under study has no effect on thermally induced structural transitions and on the activation energy of the corresponding structural states. It is apparently related to insufficient concentration of the neuroprotector inside the brain cells.

*Key words: membrane fluidity, dimebon, spin probe, membrane structure, lipid-protein interactions*