

## ПОДАВЛЕНИЕ ГАММА-КАРБОЛИНОМ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНОГО ПРОЦЕССА В УСЛОВИЯХ ТРАНСГЕННОЙ МОДЕЛИ БОКОВОГО АМИОТРОФИЧЕСКОГО СКЛЕРОЗА

© 2015 г. Е. В. Бронуицкий, А. В. Дейкин, Т. Г. Ермолкевич, А. Б. Еляков, Е. Н. Фёдоров, Е. Р. Садчикова, И. Л. Гольдман, Р. К. Овчинников, А. Ю. Роман, И. В. Хританкова, М. С. Кухарский, В. Л. Бухман, член-корреспондент РАН С. О. Бачурин, А. А. Устюгов

Поступило 17.10.2014 г.

DOI: 10.7868/S0869565215170259

Боковой амиотрофический склероз (БАС) — тяжелое нейродегенеративное заболевание, обусловленное селективной гибелью двигательных нейронов. Важной составляющей в патогенезе БАС является агрегация белков, подверженных конформационным изменениям, и формирование характерных внутриклеточных патогистологических включений, на основании чего это заболевание отнесено к группе протеинопатий [1]. Недавние медико-генетические исследования выявили в дополнение к уже известному гену *SOD1* ряд других генов, мутации в которых приводят к образованию патогенных форм, кодируемых ими белков и к развитию нейродегенеративного процесса с поражением двигательных нейронов [2].

Было установлено, что и при спорадических формах БАС эти белки обнаруживаются в составе патогистологических включений в аутопсийном материале больных БАС. Более того, с помощью экспериментальных моделей БАС на трансгенных мышцах и в опытах на культуре клеток были получены доказательства того, что для воспроизведения патологической картины протеинопатии, характерной для БАС, достаточно нарушения метаболизма лишь одного из ключевых белков [3].

При исследовании механизмов протеинопатий, ассоциированных с БАС и фронтотемпоральной дегенерацией, был описан новый тип

молекулярно-клеточной патологии, обусловленный нарушением функции ДНК/РНК-связывающих белков TDP43 и FUS (fused in sarcoma), результатом которой является неспособность этих белков формировать физиологически активные, легко диссоциирующие комплексы с РНК (РНП). Вместо этого происходит образование устойчивых структур, не содержащих РНК, в которых стабильно депонированы агрегированные формы белков TDP43 и FUS. Этот процесс сопровождается изменением внутриклеточной компартментализации TDP43 и FUS и накоплением их в цитоплазме в составе патогенных включений [4–7].

Для моделирования протеинопатии с участием белка FUS были получены aberrantные формы белка FUS, которые способны эффективно формировать в клеточных культурах белковые включения, подобные обнаруживаемым в аутопсийном материале больных БАС [8]. Было установлено, что удаление сигнала ядерной локализации вместе с С-концевым участком, имеющим значение для конформационной стабильности белковой молекулы, приводило к развитию протеинопатии с участием FUS [5, 6]. Именно в последовательностях гена, кодирующих эти участки белка, обнаружено наибольшее число мутаций, ассоциированных с наследственными формами БАС и фронтотемпоральной дегенерацией. На основании такой aberrantной формы FUS была создана трансгенная модель протеинопатии — “фусопатия”. У мышцей этой трансгенной линии в тканях нервной системы формировались патогистологические включения, а также развивался нейродегенеративный процесс, сопровождавшийся прогрессивной потерей двигательных нейронов [9]. Эти мышцы трансгенной линии были использованы в настоящем исследовании для изучения нейротропного влияния соединения группы гамма-карболинов на прогрессию модельного нейродегенеративного процесса, сопровождаю-

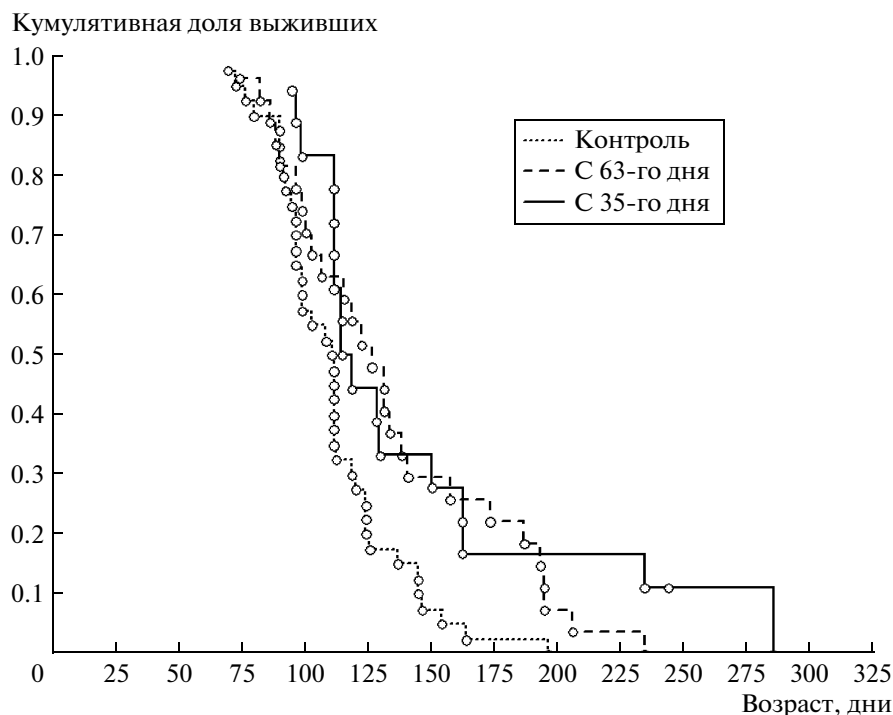
*Институт физиологически активных веществ  
Российской Академии наук,  
Черноголовка Московской обл.*

*E-mail: alexey@ipac.ac.ru*

*Институт биологии гена*

*Российской Академии наук, Москва*

*School of Biosciences, Cardiff University, Museum Avenue,  
Cardiff CF10 3AX, UK*



**Рис. 1.** Сравнение кривых выживаемости (по Каплану–Мейру) между группами модельных животных, получавших Димебон в дозе 11 мг/кг веса начиная с возраста 35 ( $n = 18$ ) и 63 дней ( $n = 27$ ), и контрольной группой ( $n = 40$ ).

щегося преимущественным поражением двигательных нейронов. Ранее была показана способность препарата Димебон замедлять прогрессию других модельных протеинопатий [10–13]. Также нами было обнаружено, что Димебон проявляет геропротекторный эффект в опытах на мышях линии C57BL/6 [14], поэтому Димебон был выбран нами в качестве базового соединения в ряду гамма-карболинов для тестирования на модели фусопатии.

Основными критериями, по которым оценивали подавление прогрессии нейродегенеративного модельного заболевания, являлись увеличение продолжительности жизни трансгенных мышей, время перехода модельного заболевания из пресимптоматической стадии в симптоматическую и длительность симптоматической стадии.

В работе использовали репрезентативные группы самцов мышей-гибридов (CBA × C57BL/6J) $F_1$ , в геноме которых трансгенная кассета, кодирующая патогенную форму белка FUS под нейрон-специфичным промотором, находится в гемизиготном состоянии [9].

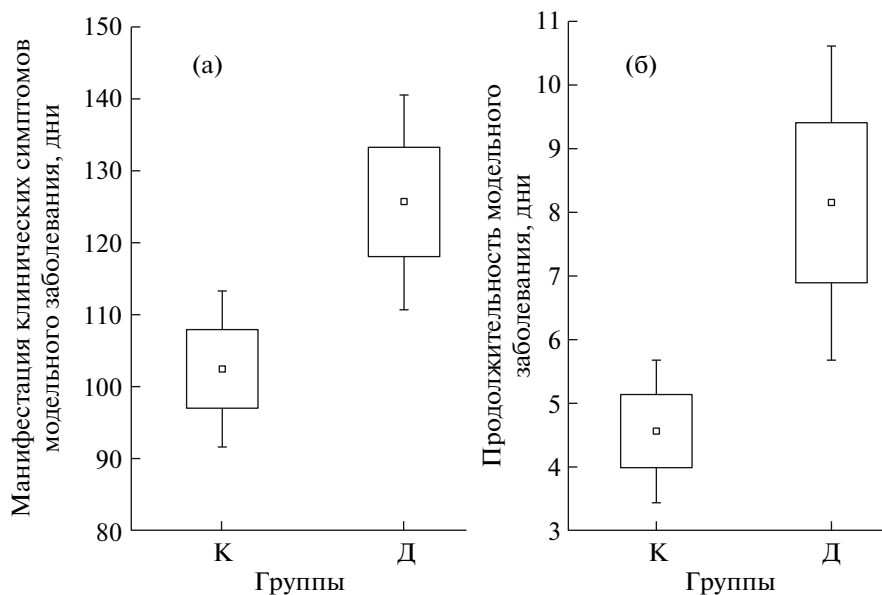
Генотипирование животных проводили методом конвенционной ПЦР с использованием праймеров: 5'-ТСТТТГТГСААГГССТГГГТ-3' и 3'-АГААГСААГАССТТСТГСАГАГ-5' при следующих условиях. Две минуты предварительной денатурации при 94°C и 30 циклов: 94°C – 15 с, 58°C

– 30 с, 72°C – 40 с, детектируя фрагмент размером 255 п.о.

Влияние Димебона исследовали на двух стадиях модельного заболевания: на ранней (пресимптоматической) фазе с началом приёма препарата на 35-й день после рождения и на близкой к симптоматической стадии, когда в нервной системе трансгенных мышей уже выявляются FUS-реактивные патогистологические включения (63-й день после рождения). Животные получали препарат с питьевой водой *ad libitum*, контрольная группа препарат не получала. Мышей контрольной и экспериментальных групп содержали в одинаковых условиях (12-часовой дневной/ночной цикл). Работы с животными проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» от 2003 г. При статистической обработке полученных результатов использовали критерий *t* Стьюдента, различия считали достоверными при  $p < 0.05$ .

Статистически достоверное увеличение средней продолжительности жизни (СПЖ) мышей, получавших препарат в дозе 11 мг/кг веса, было отмечено в обеих экспериментальных группах. Так, СПЖ мышей, начинающих получать препарат в возрасте 35 дней ( $n = 18$ ), составила  $143 \pm 13$  сут, что приблизительно на 29% выше, чем у животных контрольной группы ( $n = 40$ ).

Таким образом, хроническое применение Димебона, начатое на ранних пресимптоматических



**Рис. 2.** Манифестация клинических симптомов у трансгенных животных. Средний возраст начала (а) и продолжительности (б) симптоматического периода у мышей, получавших препарат с возраста 63 дня (Д,  $n = 27$ ), и контрольной группы (К,  $n = 40$ ). Данные представлены в виде  $M \pm m$ .

стадиях модельной фусопатии, обеспечивает увеличение СПЖ трансгенных животных (рис. 1,  $p = 0.012$ ). Более того, схожий эффект Димебона был выявлен и у группы мышей, получавших препарат в позднем периоде пресимптоматической фазы модельного заболевания, т.е. непосредственно перед началом манифестации первых клинических признаков нейродегенеративного процесса. В этой группе при использовании препарата в дозе 11 мг/кг веса ( $n = 27$ ) СПЖ увеличилась в среднем на 20% по сравнению с контролем ( $p = 0.047$ , рис. 1).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что Димебон способен замедлять прогрессию нейродегенеративного процесса при фусопатии, и эффективность его была наибольшей, когда препарат начинали применять уже на ранних этапах пресимптоматической стадии болезни. Эти данные согласуются с результатами, полученными при исследовании другого типа протеинопатии, где также отмечается селективная потеря двигательных нейронов, но с участием белка гамма-синуклеина. Димебон в этом случае также ингибировал прогрессию нейродегенерации как на ранней пресимптоматической, так и на поздней симптоматической стадиях модельного заболевания [10, 15].

Вторым важным показателем эффективности применения Димебона при фусопатии является выявленный нами более поздний дебют манифестации клинических симптомов нейродегенеративного процесса (рис. 2). В группе трансгенных животных, получавших препарат начиная с 63-го

дня, средний возраст дебюта модельного заболевания составлял  $126 \pm 7$  дней, что на 22% позже, чем в контрольной группе ( $p = 0.023$ ). При этом наблюдали незначительное, но статистически достоверное снижение скорости прогрессии нейродегенеративного процесса на терминальной стадии модельного заболевания, что выражалось в увеличении продолжительности симптоматической стадии (рис. 2б).

Таким образом, полученные нами данные указывают на то, что Димебон причастен к процессам замедления прогрессии нейродегенеративного процесса, сопровождающегося гибелью двигательных нейронов при модельной фусопатии. Результаты проведенного исследования дают основание рассматривать Димебон и другие соединения ряда карболинов в качестве основы для разработки патогенетической терапии БАС, создание которой является исключительно актуальной задачей в связи с ограниченным числом методов лечения. Единственным препаратом, применяемым для увеличения продолжительности жизни больных БАС, является Рилузол, продлевающий жизнь больных не более чем на 10%, не изменяя качество жизни больного. В настоящее время ведутся разработки по созданию новых подходов в терапии БАС, основанных на использовании современных биотехнологических методов и методов заместительной терапии утраченных двигательных нейронов у больных на развёрнутых стадиях заболевания. Создание же фармакологических препаратов, обладающих терапевтическим эффектом при БАС, рассматривается в качестве необходимой составляющей комплексной терапии. Соеди-

нения ряда гамма-карболинов — Димебон и его фторпроизводные, обладающие улучшенной фармакокинетикой, способны замедлять прогрессию протеинопатии путем активации собственных внутриклеточных систем контролируемой деградации патогенных белковых комплексов, уменьшая количество внутриклеточных депозитов и их промежуточных токсичных продуктов агрегации. Возможно, этим может быть обусловлен его эффект на продолжительность жизни модельных животных, который проявляется за счёт более позднего дебюта модельного заболевания.

Наши данные являются первым свидетельством того, что соединения ряда гамма-карболинов могут рассматриваться в качестве основы при разработке препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний, характеризующихся специфической потерей двигательных нейронов.

Наработка тестируемого соединения в количествах, необходимых для проведения биологических испытаний, обеспечена финансовой поддержкой Российского научного фонда (грант № 14–23–00160). Патогистологический анализ формирования внутриклеточных включений аберрантной формой РНК-связывающего белка FUS человека был поддержан грантом Российского научного фонда (грант № 14–14–01138). Создание трансгенной модели БАС частично финансировано грантом Motor Neuron Disease Association (Buchman/Apr13/6096 to VLB).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шелковникова Т.А., Куликова А.А., Цветков Ф.О., Бухман В.Л., Петерс О., Нинкина Н.Н., Бачурин С.О. Протеинопатии — формы нейродегенеративных заболеваний, в основе которых лежит патологическая агрегация белков // Молекуляр. биология. 2012. Т. 46. № 3. С. 402–415.
2. Скворцова В.И., Разинская О.Д., Смирнов А.П., Ковражкина Е.А., Почигаева К.И., Нинкина Н.Н., Шелковникова Т.А., Устюгов А.А. Новые аспекты патогенеза бокового амиотрофического склероза // Журн. неврологии и психиатрии им. Корсакова. 2011. Т. 2. С. 4–9.
3. Бачурин С.О., Нинкина Н.Н., Тарасова Т.В., Шелковникова Т.А., Ковражкина Е.А., Смирнов А.П., Разинская О.Д., Скворцова В.И. Моделирование бокового амиотрофического склероза: трансгенный метод // Журн. неврологии и психиатрии им. Корсакова. 2013. Т. 113. № 10. С. 74–79.
4. Shelkovnikova T.A. Modelling FUSopathies: Focus on Protein Aggregation // Biochem. Soc. Trans. 2013. V. 41. № 6. P. 1613–1617.
5. Shelkovnikova T.A., Robinson H.K., Southcombe J.A., Ninkina N., Buchman V.L. Multistep Process of FUS Aggregation in the Cell Cytoplasm Involves RNA-Dependent and RNA-Independent Mechanisms // Hum. Mol. Genet. 2014. pii: ddu243.
6. Shelkovnikova T.A., Robinson H.K., Connor-Robson N., Buchman V.L. Recruitment into Stress Granules Prevents Irreversible Aggregation of FUS Protein Mislocalized to the Cytoplasm // Cell Cycle. 2013. V. 12. № 19. P. 3194–3202.
7. Shelkovnikova T.A., Robinson H.K., Troakes C., Ninkina N., Buchman V.L. Compromised Paraspeckle Formation as a Pathogenic Factor in FUSopathies // Hum. Mol. Genet. 2014. V. 23. № 9. P. 2298–2312.
8. Шелковникова Т.А., Устюгов А.А., Смирнов А.П., Скворцова В.И., Бухман В.Л., Бачурин С.О., Нинкина Н.Н. Мутации в гене FUS, ассоциированные с наследственными формами бокового амиотрофического склероза, влияют на клеточную локализацию кодируемого белка и его способность к агрегации // ДАН. 2011. Т. 438. № 3. С. 422–426.
9. Shelkovnikova T.A., Peters O.M., Deykin A.V., Connor-Robson N., Robinson H., Ustyugov A.A., Bachurin S.O., Ermolkevich T.G., Goldman I.L., Sadchikova E.R., Kovrazhkina E.A., Skvortsova V.I., Ling S.C., Da Cruz S., Parone P.A., Buchman V.L., Ninkina N.N. Fused in Sarcoma (FUS) Protein lacking nuclear Localization Signal (NLS) and Major RNA Binding Motifs Triggers Proteinopathy and Severe Motor Phenotype in Transgenic mice // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. № 35. P. 25266–25274.
10. Bachurin S.O., Shelkovnikova T.A., Ustyugov A.A., Peters O., Khritankova I., Afanasieva M.A., Tarasova T.V., Alentov I.I., Buchman V.L., Ninkina N.N. Dimebon Slows Progression of Proteinopathy in Gamma-Synuclein Transgenic Mice // Neurotox. Res. 2012. V. 22. № 1. P. 33–42.
11. Peters O.M., Connor-Robson N., Sokolov V.B., Aksinenko A.Y., Kukharsky M.S., Bachurin S.O., Ninkina N., Buchman V.L. Chronic Administration of Dimebon Ameliorates Pathology in TauP301S Transgenic Mice // J. Alzheimers Dis. 2013. V. 33. № 4. P. 1041–1049.
12. Yamashita M., Nonaka T., Arai T., Kametani F., Buchman V.L., Ninkina N., Bachurin S.O., Akiyama H., Goedert M., Hasegawa M. Methylene Blue and Dimebon Inhibit Aggregation of TDP-43 in Cellular Models // FEBS Lett. 2009. V. 583. № 14. P. 2419–2424.
13. Bharadwaj P.R., Bates K.A., Porter T., Teimouri E., Pery G., Steele J.W., Gandy S., Groth D., Martins R.N., Verdile G. Latrepirdine: Molecular Mechanisms Underlying Potential Therapeutic Roles in Alzheimer's and Other Neurodegenerative Diseases // Transl. Psychiatry. 2013. V. 3. P. e332.
14. Бачурин С.О., Михалева Л.М., Григорьев В.В., Королёва И.В., Кинзирский А.С. Геропротекторные свойства димебона. Морфологическая характеристика внутренних органов и тканей экспериментальных животных при длительном воздействии препарата // Эксперим. и клин. фармакология. 2011. Т. 74. № 3. С. 32–34.
15. Бачурин С.О., Устюгов А.А., Петерс О., Шелковникова Т.А., Бухман В.Л., Нинкина Н.Н. Блокада нейродегенеративных процессов, вызванных протеинопатией, как новый механизм действия нейропротекторных и когнитивно-стимулирующих препаратов // ДАН. 2009. Т. 428. № 2. P. 262–265.