

Отсроченный дебют симптоматической стадии FUS-протеинопатии у трансгенных мышей под действием димебона

А.В. МАЛЬЦЕВ¹, А.В. ДЕЙКИН^{2,5*}, Р.К. ОВЧИННИКОВ^{1,5}, М.М. ЧИЧЕВА¹, Е.А. КОВРАЖКИНА³,
О.Д. РАЗИНСКАЯ³, Е.В. БРОНОВИЦКИЙ¹, А.И. БУДЕВИЧ⁴, Ю.К. КИРИКОВИЧ⁴, С.О. БАЧУРИН¹,
А.А. УСТЮГОВ¹, В.И. СКВОРЦОВА³

¹ФГБНУ «Институт физиологически активных веществ Российской академии наук», Черноголовка, Московская область, Россия; ²ФГБНУ «Институт биологии гена Российской академии наук», Москва, Россия; ³кафедра фундаментальной и клинической неврологии и нейрохирургии Российского национального исследовательского медицинского университета им Н.И. Пирогова, Москва, Россия; ⁴Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству», Жодино, Минская область, Белоруссия; ⁵ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия

Цель исследования. Изучение модулирующего эффекта препарата димебон на FUS-протеинопатию и его влияние на дебют симптоматической стадии у трансгенных мышей линии FUS^{1–513} и динамику заболевания в терминальной стадии. **Материал и методы.** Работа проведена на самцах линии FUS^{1–513} на генетическом фоне CD1. Мыши экспериментальной группы (n=28) получали димебон с водой в концентрации 70 мкг/мл начиная с 35-го дня жизни. В контрольной группе (n=25) это воздействие не использовалось. Показателями были возраст, масса тела животных на момент начала симптоматической стадии заболевания и продолжительность последней. **Результаты.** Применение димебона привело к отсрочке дебюта манифестации клинических симптомов нейродегенеративного процесса: в экспериментальной группе — 127,6±4,6 дня, в контрольной — 110,6±4,2 дня. Масса тела животных между группами не различалась. **Заключение.** Димебон позволяет увеличить продолжительность пресимптоматической стадии и отсроченной манифестации клинических симптомов, но изменений в динамике патологического процесса на симптоматической стадии не происходит.

Ключевые слова: боковой амиотрофический склероз, FUS, димебон, трансгенные мыши.

Dimebon delays the onset of symptoms of FUS-proteinopathy in transgenic mice

A.V. MALTSEV, A.V. DEYKIN, R.K. OVCHINNIKOV, M.M. CHICHEVA, E.A. KOVRAZHINA, O.D. RAZINSKAYA,
E.V. BRONOVITSKY, A.I. BUDEVICH, YU.K. KIRIKOVICH, S.O. BACHURIN, A.A. USTYUGOV, V.I. SKVORTSOVA

Institute of Physiologically Active Substances, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow oblast, Russia; Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia; Scientific and Practical Centre of the National Academy of Sciences of Belarus on Animal Husbandry, Zhodino, Minsk oblast, Belarus; Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia

Objective. To evaluate an effect of dimebon on the onset of symptomatic stage in FUS^{1–513} transgenic mice — a new genetic model of neurodegeneration, and to study the dynamics of disease progression in the terminal stage. **Material and methods.** The study was carried out on males of line FUS^{1–513} with the contribution of genes from CD1 strains. Mice of the experimental group (n=28) received dimebon with water in the concentration of 70 mcg/ml starting from the 35th day of life. The control group (n=25) did not receive the drug. Age, body mass of animals at the start of symptomatic stage and duration of symptomatic stage were assessed. **Results.** Application of dimebon can delay the onset of the manifestation of clinical symptoms of the neurodegenerative process in the experimental group (127.6±4.6 days) compared to the control group (110.6±4.2 days). The body mass was similar in both groups. **Conclusion.** Dimebon leads to an increase in the duration of presymptomatic stage and delays the manifestation of clinical symptoms. The changes in the dynamics of the pathological process in the symptomatic stage are not detected.

Keywords: amyotrophic lateral sclerosis, FUS, dimebon, transgenic mice.

Одной из форм молекулярной патологии, ассоциированной с развитием специфического поражения двигательных нейронов, характерного для бокового амиотрофического склероза (БАС), является нарушение метаболизма и функции ДНК/РНК-связывающего белка FUS. У больных с семейными формами БАС описан ряд мутаций в кодирующей части этого гена [1, 2]. У таких больных

наблюдается изменение компарментализации белка FUS с перераспределением его из ядра в цитоплазму и формирование характерных FUS-реактивных включений неамилоидного типа. Основные физико-химические характеристики включений в совокупности с координированным прогрессированием нейродегенеративного процесса, соответствующей интенсивности накопления включений

в поражаемых анатомических областях, позволяют классифицировать данный тип патологии как FUS-протеинопатию [3]. Среди генетических моделей FUS-протеинопатии [4] наиболее успешной является линия генетически модифицированных мышей FUS¹⁻⁵¹³ [5], у которых развивается прогрессирующая FUS-протеинопатия с характерными признаками клинической картины БАС [5, 6]. Использование подобного типа животных моделей позволяет существенно оптимизировать разработку терапии БАС. Единственным рекомендованным для пациентов с БАС препаратом является рилузол (МНН: Riluzol), который не влияет на выраженность симптоматики, но может увеличивать продолжительность жизни больных до 10% [7, 8]. В настоящее время 55 соединений и 1 вакцина находятся на разных стадиях клинических испытаний, и ожидается, что их число в ближайшее время возрастет [9, 10].

Ранее было показано, что отечественный препарат димебон¹ способен замедлять развитие различных протеинопатий [11–15].

Цель настоящего исследования — изучение модулирующего эффекта димебона на FUS-протеинопатию и его влияния на дебют симптоматической стадии у FUS¹⁻⁵¹³ мышей и ее переход в терминальную стадию.

Материал и методы

Работы с животными проводили на базе вивария Института биологии гена РАН под контролем Комиссии по биоэтике этого института.

Эксперименты проводили на самцах линии мышей FUS¹⁻⁵¹³ с эктопной нейроспецифической экспрессией укороченного гена FUS человека [5, 6] на генетическом фоне CD1. Линия стабильно поддерживалась в гемизиготном состоянии при скрещивании в каждом поколении с производителями линии генетического фона, что в общем случае не влияет на менделевское наследование трансгена [16].

Детекцию транскрипции проводили методом ПЦР с праймерами 5'-TCTTTGTGCAAGCCTGGGT-3' и 3'-AGAAGCAAGACCTCTGCAGAG-5' по программе: 2 мин при 94 °C и далее 35 циклов (94 °C — 15 с, 58 °C — 20 с, 72 °C — 30 с). Анализировали фрагмент размером 255 п.о. в 1% агарозном геле. После проведения генотипирования группы животных содержали с постоянным доступом к воде и корму, температуре 22 °C и световом цикле 12:12 ч.

Экспериментальная группа животных ($n=28$) получала водный раствор димебона (70 мкг/мл) с питьевой водой начиная с 35-го дня после рождения *ad libitum*. Средняя расчетная доза препарата составила 15 мг/кг, что в 20 раз больше рекомендованной дозы при терапии аллергических состояний у человека. Контрольную группу мышей ($n=25$) содержали в обычных условиях со свободным доступом к воде. Осмотр животных проводили ежедневно для регистрации массы тела и оценки симптомов нейродегенерации. На 12-й день симптоматической стадии выживших, но находящихся на терминальной стадии заболевания мышей подвергали медикаментозной эвтаназии из соображений биоэтики.

¹Регистрационное удостоверение лекарственного средства №ЛСР-004911/08 от 25.06.08.

Статистический анализ материала проводили с использованием программного обеспечения Statistica 12 («StatSoft», США). При сравнении экспериментальной и контрольной групп применяли критерий *t* Стьюдента. Статистически достоверными считали результаты при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

При прогрессировании симптоматической стадии FUS-протеинопатии в нервной системе мышей с возрастом накапливаются FUS-реактивные включения, и после 90-го дня жизни развивается нейродегенеративный процесс с преимущественным поражением двигательных нейронов и клинической картиной БАС. Стремительно прогрессирующая симптоматическая стадия модельного заболевания к 12-му дню в большинстве случаев переходит в терминальную стадию и всегда заканчивается гибелью животных [6]. Применение димебона позволило отсрочить дебют манифестации клинических симптомов нейродегенеративного процесса (рис. 1, а). Так, средний возраст появления первых признаков перехода пресимптоматической стадии в симптоматическую у животных, получавших препарат, составил $127,6 \pm 4,6$ дня, при этом в контрольной группе мышей того же генотипа дебют модельного заболевания наблюдался в возрасте $110,6 \pm 4,2$ дня (различия статистически достоверны). Полученные данные согласуются с результатами исследований [11], проведенных на той же линии мышей, но поддерживаемой на гибридах первого поколения C57BL/6J и CBA.

Поскольку потеря массы у FUS¹⁻⁵¹³ мышей прямо коррелирует с выраженностью нейродегенеративного процесса [5], в данном исследовании регистрировали также массу тела животных. На момент перехода модельного заболевания из пресимптоматической стадии в симптоматическую у животных не наблюдалось потери веса, в контрольной и экспериментальной группах масса тела оставалась одинаковой (рис. 1, б).

Выявленное пролонгирование пресимптоматической стадии и отсроченная манифестация клинических симптомов является следствием замедления нейродегенеративного процесса, вызванного FUS-протеинопатией, как это было показано для других типов протеинопатий [5, 12]. Динамика прогрессирования нейродегенеративного процесса на симптоматической стадии не отличалась у животных, получавших димебон (рис. 2, а). За короткий период симптоматической стадии модельного заболевания к моменту перехода его в терминальную животные теряли до 30% массы тела в обеих группах. Динамика потери веса в них была сходной. Полученные данные говорят о том, что димебон не обладает свойством модулировать патологический процесс на симптоматической стадии.

Анализ числа животных, павших после появления выраженных клинических признаков заболевания (параличи конечностей), показал, что димебон не изменяет продолжительность периода между дебютом и терминальной стадией FUS-протеинопатии (рис. 2, б).

Таким образом, в проведенном исследовании было установлено, что применение димебона пролонгирует пресимптоматическую стадию FUS-протеинопатии, позволяя отсрочить дебют клинической симптоматики модельного заболевания у FUS¹⁻⁵¹³ мышей. При этом диме-

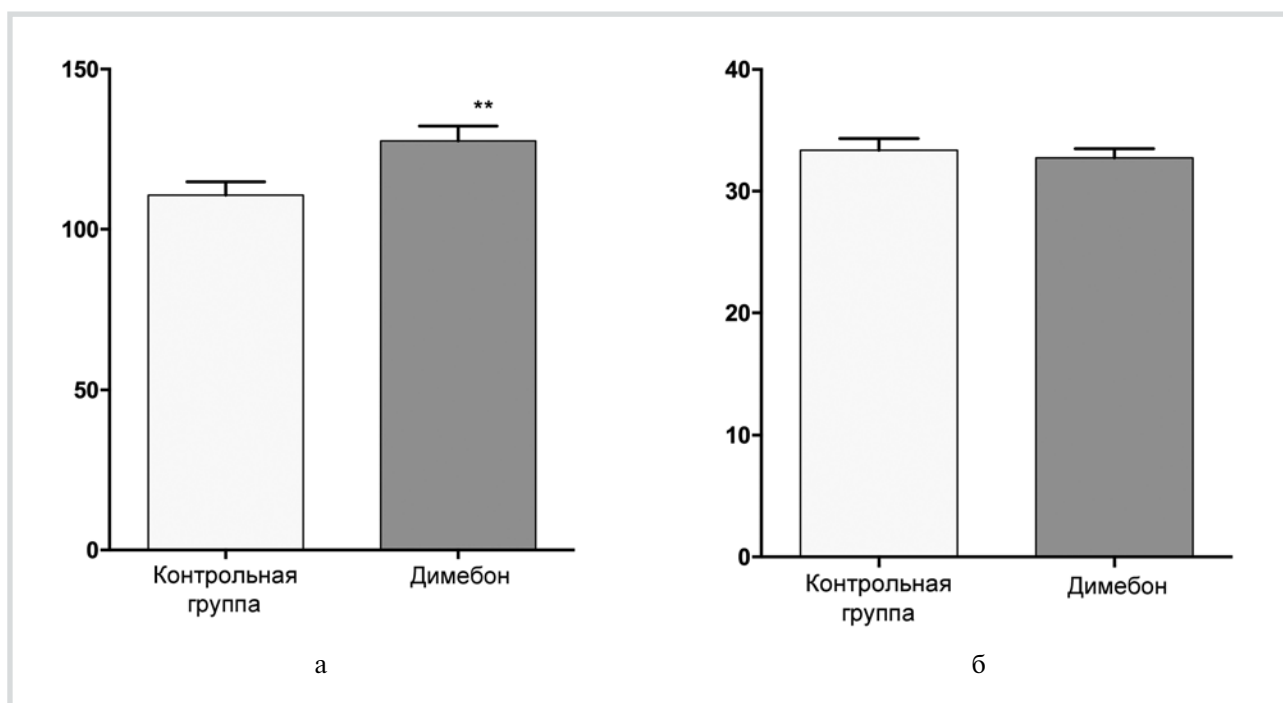


Рис. 1. Дебют симптоматической стадии FUS-протеинопатии у трансгенных FUS¹⁻⁵¹³ мышей экспериментальной и контрольной групп. По оси ординат: а — возраст животных на момент регистрации первых клинических признаков нейродегенерации в днях; б — масса тела мышей при дебюте симптоматической стадии в граммах. ** — $p < 0,01$ t -критерию Стьюдента.

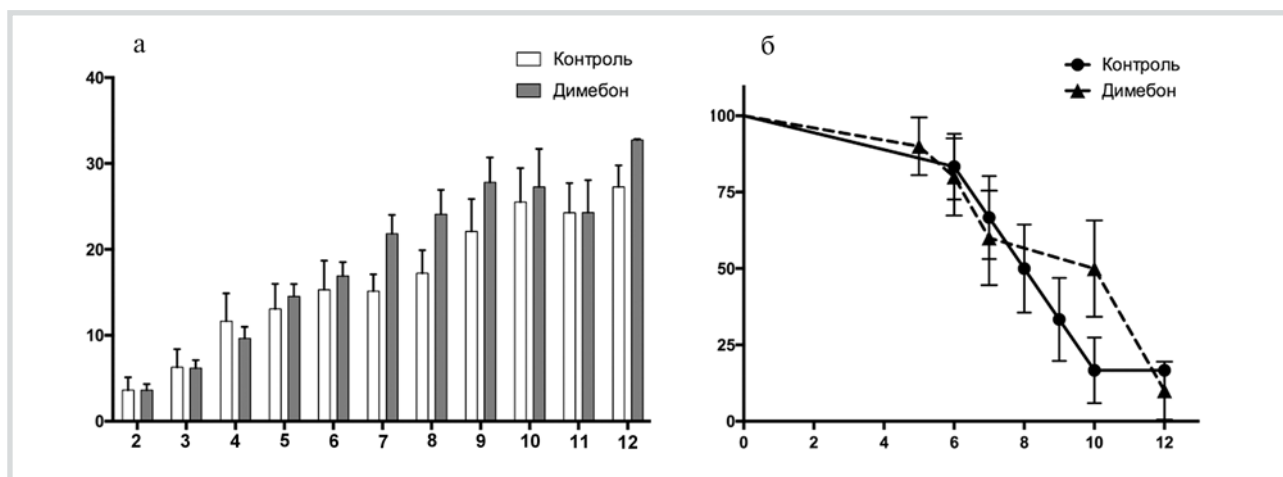


Рис. 2. Динамика прогрессирования симптоматической стадии FUS-протеинопатии у трансгенных FUS¹⁻⁵¹³ мышей экспериментальной и контрольной групп.

По оси ординат: а — ежедневная потеря массы тела, выраженная в процентах по отношению к массе животного на пресимптоматической стадии; по оси абсцисс — продолжительность симптоматического периода в днях от дебюта; б — процент выживших животных в течение симптоматической стадии в изученных группах; по оси абсцисс — продолжительность симптоматического периода от дебюта (дни).

бон не влияет на симптоматические этапы FUS-протеинопатии: он не изменяет динамику заболевания и его переход в терминальную стадию. Полученные результаты дают основание рассматривать отечественный препарат димебон в качестве возможного компонента для разработки комплексной патогенетической терапии БАС, особенно при семейной форме заболевания.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение №14.604.21.0144, идентификатор RFMEFI60414X0144).

ЛИТЕРАТУРА

1. Al-Chalabi A, Visscher PM. Motor neuron disease: Common genetic variants and the heritability of ALS. *Nat Rev Neurol*. 2014;10:10:549-550. <http://doi.org/10.1038/nrneuro.2014.166>
2. Lysogorskaia EV, Abramycheva NY, Zakharova MN, Stepanova MS, Moroz AA, Rossokhin AV, Illarionov SN. Genetic studies of Russian patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener*. 2016;17:1-2:135-141. <http://doi.org/10.3109/21678421.2015.1107100>
3. Shelkvnikova TA, Kulikova AA, Tsvetkov PO, Peters O, Bachurin SO, Buchman VL, Ninkina NN. Proteinopathies, neurodegenerative disorders with protein aggregation-based pathology. *Mol Biol*. 2012;46:3:362-374. <http://doi.org/10.1134/S0026893312020161>
4. Bachurin SO, Ninkina NN, Tarasova TV, Shelkvnikova TV, Kovrazhkina EA, Smirnov AP, Razinskaya O, Skvortsova VI. Modeling of lateral amyotrophic sclerosis: a non-genetic method. *Zhurnal Nevrol Psikiatrii im. S.S. Korsakova*. 2013;113:9:86-89. PMID: 24218707.
5. Shelkvnikova TA, Peters OM, Deykin AV, Connor-Robson N, Robinson H, Ustyugov AA, Bachurin SO, Ermolkevich TG, Goldman IL, Sadchikova ER, Kovrazhkina EA, Skvortsova VI, Ling S-C, Da Cruz S, Parone PA, Buchman VL, Ninkina NN. 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;288:35:25266-25274. <http://doi.org/10.1074/jbc.M113.492017>
6. Deikin AV, Kovrazhkina EA, Ovchinnikov RK, Bronovitskii EV, Razinskaya OD, Smirnov AP, Ermolkevich TG, Eliakov AB, Popov AN, Fedorov EN, Lytkina OA, Kukharskii MS, Tarasova TV, Shelkvnikova TA, Ustyugov AA, Ninkina NN, Gol'dman IL, Sadchikova ER, Bachurin SO, Skvortsova VI. A mice model of amyotrophic lateral sclerosis expressing mutant human FUS protein. *Zhurnal Nevrol, Psikiatrii im. S.S. Korsakova*. 2014;114:8:62-69. PMID: 25345633
7. Blackhall LJ. Amyotrophic lateral sclerosis and palliative care: Where we are, and the road ahead. *Muscle Nerve*. 2012;45:3:311-318. <http://doi.org/10.1002/mus.22305>
8. Katz JS, Barohn RJ, Dimachkie MM, Mitsumoto H. The Dilemma of the Clinical Trialist in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurol Clin*. 2015;33:4:937-947. <http://doi.org/10.1016/j.ncl.2015.07.014>
9. Ittner LM, Halliday GM, Kril JJ, Götz J, Hodges JR, Kiernan MC. FTD and ALS-translating mouse studies into clinical trials. *Nat Rev Neurol*. 2015;11:6:360-366. <http://doi.org/10.1038/nrneuro.2015.65>
10. Moujalled D, White AR. Advances in the Development of Disease-Modifying Treatments for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *CNS Drugs*. 2016;30:3:227-243. <http://doi.org/10.1007/s40263-016-0317-8>
11. Bronovitsky EV, Deikin AV, Ermolkevich TG, Elyakov AB, Fedorov EN, Sadchikova ER, Goldman IL, Ovchinnikov RK, Roman AY, Khritankova IV, Kukharsky MS, Buchman VL, Bachurin SO, Ustyugov AA. Gamma-carboline inhibits neurodegenerative processes in a transgenic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Dokl Biochem Biophys*. 2015;462:1:189-192. <http://doi.org/10.1134/S1607672915030138>
12. Bachurin SO, Shelkvnikova TA, Ustyugov AA, Peters O, Khritankova I, Afanasieva MA, Tarasova TV, Alentov II, Buchman VL, Ninkina N, Dimebon N. Slows Progression of Proteinopathy in γ -Synuclein Transgenic Mice. *Neurotox Res*. 2012;22:1:33-42. <http://doi.org/10.1007/s12640-011-9299-y>
13. Ustyugov A, Shevtsova E, Bachurin S. Novel Sites of Neuroprotective Action of Dimebon (Latrepirdine). *Mol Neurobiol*. 2015;52:2:970-978. <http://doi.org/10.1007/s12035-015-9249-4>
14. Ustyugov AA, Shelkvnikova TA, Kokhan VS, Khritankova IV, Peters O, Buchman VL, Bachurin SO, Ninkina NN. Dimebon reduces the levels of aggregated amyloidogenic protein forms in detergent-insoluble fractions *in vivo*. *Bull Exp Biol Med*. 2012;152:6:731-733. PMID: 22803176
15. Yamashita M, Nonaka T, Arai T, Kametani F, Buchman VL, Ninkina N, Bachurin SO, Akiyama H, Goedert M, Hasegawa M. Methylene blue and dimebon inhibit aggregation of TDP-43 in cellular models. *FEBS Lett*. 2009;583:14:2419-2424. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.06.042>
16. Deykin AV, Ermolkevich TG, Gursky YG, Krasnov AN, Georgieva SG, Kuznetsov SL, Derevyanko VG, Novikova NI, Murashev AN, Gol'dman IL, Sadchikova ER. The state of health and the reproductive potential of transgenic mice secreting recombinant human lactoferrin in milk. *Dokl Biochem Biophys*. 2009;427:1:195-198. <http://doi.org/10.1134/S1607672909040073>