УДК 577.2, 577.29

Перспективы использования гамма-карболинов для разработки патогенетической терапии протеинопатий

В. И. Скворцова[1], С. О. Бачурин[2], А. А. Устюгов[2*], М. С. Кухарский[1,2], А. В. Дейкин[3], В. Л. Бухман[2,4], Н. Н. Нинкина[2,4]

[1]Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1, стр. 9

[2]Институт физиологически активных веществ РАН, 142432, Черноголовка, Северный пр., 1

[3]Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

[4]Cardiff University, School of Biosciences, Sir Martin Evans Building, Museum Avenue, Cardiff, CF10 3AX

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

Поступила в редакцию 04.07.2018

Принята к печати 21.09.2018

РЕФЕРАТ **Неконтролируемая агрегация белков, сопровождающаяся формированием специфических включений, является важной составляющей патогенеза многих распространенных нейродегенеративных заболеваний, известных как протеинопатии. Промежуточные продукты этой агрегации токсичны для нейронов и вызывают их гибель. Стратегия разработки патогенетической терапии протеинопатий основывается на создании препаратов, способных как подавлять прогрессию протеинопатии, так и повышать выживаемость пораженных нейронов. Результаты десятилетних исследований, проведенных в отечественных и западных ведущих лабораториях, позволили заключить, что обладающий нейропротекторным эффектом отечественный препарат Димебон (Latrepirdine) способен, как и ряд других соединений из группы гамма-карболинов, модулировать течение нейродегенеративного процесса и в *in vitro*, и в *in vivo* модельных системах. Накопленные данные позволяют рассматривать гамма-карболины в качестве перспективной основы для разработки патогенетической терапии протеинопатий.**

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА **БАС, Димебон, гамма-карболины, протеинопатия, трансгенные животные.**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ **БАС – боковой амиотрофический склероз; НДЗ – нейродегенеративные заболевания; FUS – от англ. Fused in sarcoma; TDP-43 – от англ. Transactive response DNA binding protein 43 kDa.**

ВВЕДЕНИЕ

Неконтролируемая агрегация белков определенного типа с формированием патогистологических включений (протеинопатия) является важным компонентом патогенеза многих нейродегенеративных заболеваний (НДЗ), включающих боковой амиотрофический склероз (БАС). В этой связи создание препаратов, действие которых направлено на подавление прогрессии протеинопатии, рассматривается как важное направление стратегии разработки патогенетической терапии НДЗ. Данные последних исследований, полученные независимо в различных лабораториях в различных странах, убедительно доказали способность отечественного препарата Димебон (Latrepirdine), относящегося к группе гамма-карболинов, подавлять прогрессию модельных протеинопатий в трансгенных животных. Наши данные показали эффективность применения Димебона и его производных для ингибирования прогрессии протеинопатий в модельных трансгенных системах с фенотипом БАС.

Боковой амиотрофический склероз – тяжелое заболевание нервной системы со специфическим поражением двигательных нейронов – характеризуется протеинопатией, вызванной агрегацией ряда определенных белков. Ассоциация патогенной агрегации этих белков с развитием фенотипа БАС показана в многочисленных экспериментальных исследованиях по моделированию основных механизмов нейродегенеративного процесса, поражающего

двигательные нейроны [1–3]. При патогистологическом анализе идиопатических форм БАС в подавляющем большинстве случаев в аутопсийном материале больных обнаруживаются внутриклеточные белковые включения, среди которых особое значение придается депозитам, сформированным ДНК/РНК-связывающими белками TDP-43 и FUS [4–6]. Непосредственные механизмы, лежащие в основе патогенной агрегации этих белков и приводящие к дисфункции и гибели двигательных нейронов, могут быть в определенной степени специфичными для данного белка. Нет никаких сомнений в том, что процесс патогенной белковой агрегации играет важную роль в патогенезе всех форм БАС и является очевидной мишенью для терапевтических вмешательств.

НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ГАММА-КАРБОЛИНОВ

Данные независимых исследований ряда лабораторий позволили рассматривать соединения, относящиеся к классу гамма-карболинов, как потенциальные нейропротекторные средства, которые, в частности, способны снижать уровень патогенной агрегации и/или активировать внутриклеточные защитные механизмы, направленные на контролируемую деградацию агрегированных форм белков [7, 8]. Первые указания на такие свойства гамма-карболинов были получены в работах по изучению применения отечественного препарата Димебон для коррекции когнитивной функции у больных с болезнью Альцгеймера (БА) – наиболее распространенным нейродегенеративным заболеванием, относящимся к группе протеинопатий [9, 10]. Более того, в клинических испытаниях, проведенных в нескольких центрах, выявлено положительное влияние Димебона на когнитивную функцию пациентов с хореей Гентингтона [11]. Хотя в фазе III клинических испытаний Димебон, как и все разрабатываемые на сегодняшний день препараты для патогенетической терапии БА, не был признан эффективным [12] (скорее всего из-за исключительно высокой гетерогенности группы заболеваний, объединенных в нозологическую форму «болезнь Альцгеймера»), изучение механизмов действия этого препарата и его производных на прогрессию протеинопатии остается предметом интенсивных исследований целого ряда лабораторий [13]. Так, результаты недавно проведенного метаанализа позволили сделать заключение о положительном воздействии Димебона на показатели нейропсихотического статуса у пациентов с БА [14] и стали дополнительным стимулом для продолжения работ в данном направлении. Кроме того, показано, что в однородной модельной системе на основе трансгенных животных Димебон подавляет развитие таупротеинопатии – одного из ключевых звеньев патогенеза БА [15]. Другой тип ключевой протеинопатии в патогенезе БА – церебральный амилоидоз – также подавлялся Димебоном у мышей TgCRND8 [16–18] и 3xTg-AD [19], но не на модели 5xFAD, характеризующейся более агрессивным течением амилоидоза [20]. Эти данные послужили основанием для расширения спектра исследований действия гамма-карболинов на прогрессию других типов протеинопатий, которым отводится важная роль в патогенезе нейродегенеративных заболеваний.

ВЛИЯНИЕ ГАММА-КАРБОЛИНОВ НА ПРОГРЕССИЮ ПРОТЕИНОПАТИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ СО СПЕЦИФИЧЕСКИМ ПОРАЖЕНИЕМ ДВИГАТЕЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ

В трансгенной мышиной модели с нейроспецифической экспрессией гамма-синуклеина, воспроизводящей основные характеристики патогенеза БАС [21, 22], хроническое введение Димебона замедляло прогрессию протеинопатии [23, 24]. При этом выявлено существенное снижение содержания агрегированных нерастворимых в детергенте форм гамма-синуклеина в тканях пораженных участков нервной системы трансгенных мышей [25] и уменьшение гамма-синуклеин-реактивных включений в пораженных отделах спинного мозга экспериментальных животных [21, 22]. Этот эффект оказался более выраженным, если введение начинали задолго до первых проявлений патологического процесса как по показателям клинической симптоматики, так и по данным гистологического анализа. Такая же особенность Димебона показана и на трансгенных мышах $SOD1^{G93A}$: если Димебон начинали вводить задолго до ожидаемого возраста проявления симптомов БАС-фенотипа, то дебют симптоматической стадии модельного заболевания регистрировали позже, а продолжительность жизни животных увеличивалась [26]. Если же введение Димебона начинали в возрасте, близком к ожидаемому дебюту симптоматической стадии модельного заболевания, то эффект от применения препарата был гораздо менее выраженным [27]. Ингибирующий прогрессию протеинопатии эффект Димебона и его производных был подтвержден нами на недавно созданной и считающейся наиболее адекватной модели специфического поражения двигательных нейронов с фенотипом БАС – линии трансгенных мышей FUS^{1-359} [28, 29]. В нервной системе этих мышей, как и у больных с FUS-ассоциированными формами БАС, патогистологический анализ выявляет накопление аберрантных форм FUS в составе характерных цитоплазматических белковых агрегатов. И Димебон, и его

производные способны были модифицировать, хотя и с различной эффективностью, прогрессию FUS-протеинопатии в нервной системе мышей FUS^{1-359} [30]. Так, продолжительность жизни модельных животных, получавших Димебон, статистически значимо увеличивалась. Более того, перевод линии мышей FUS^{1-359} с генетического фона C57Bl/6J, на котором было выполнено большинство исследований в различных лабораториях, на генетический фон CD-1 не повлиял на выраженность ингибирующего протеинопатию эффекта гамма-карболинов и не может быть объяснен повышенной чувствительностью линии C57Bl/6J к гамма-карболинам [30]. Помимо увеличения продолжительности жизни у мышей FUS^{1-359}, получавших Димебон или его производное, был отсрочен дебют симптоматической стадии модельного заболевания с развитием выраженного фенотипа БАС, если введение соединений было начато на ранних скрытых стадиях FUS-протеинопатии [31]. Вместе с тем, механизм такого действия Димебона до сих пор остается неясным. Имеющиеся на сегодняшний день данные биохимических исследований, экспериментов на клеточных культурах и на животных говорят о том, что Димебон является мультитаргетным препаратом, способным влиять на целый ряд внутриклеточных процессов и на различные патогенетические пути в пораженных нейродегенеративными изменениями нейронах и в других клетках [7].

В частности, Димебон способен модулировать функционирование рецепторов, каналов и менять кинетику сигнальных ферментов [9, 32–35], а также стабилизировать работу митохондрий [36, 37]. Но, пожалуй, наиболее значимым свойством Димебона, которое позволяет рассматривать его в качестве базового соединения при разработке подходов к лечению протеинопатий, является способность ингибировать накопление патогенных белковых агрегатов в клетке.

ПОДАВЛЕНИЕ ГАММА-КАРБОЛИНАМИ ПРОЦЕССОВ НАКОПЛЕНИЯ ПАТОГИСТОЛОГИЧЕСКИХ БЕЛКОВЫХ ВКЛЮЧЕНИЙ В ЦИТОПЛАЗМЕ НЕЙРОНОВ

Способность Димебона препятствовать накоплению в телах нейронов патогенных белковых включений впервые была продемонстрирована в наших совместных исследованиях с лабораториями М. Хасегавы и М. Гедерта на клеточных культурах, продуцирующих аберрантную, обладающую высоким агрегационным потенциалом, форму РНК-связывающего белка TDP-43 [38, 39]. Обнаруженный эффект был подтвержден в другой клеточной модели с агрегацией РНК-связывающего белка FUS. Нами показано, что при FUS-протеинопатии добавление Димебона и его производных к культивируемым клеткам нейробластомы человека снижало как содержание нерастворимых форм белка в цитоплазматической фракции, так и количество формируемых в цитоплазме белковых включений (неопубликованные данные). Последующие исследования, выполненные на различных модельных системах протеинопатий, подтвердили обнаруженный нами эффект, который, как мы полагали, связан с активацией аутофагосомной системы в клетках, обработанных Димебоном [16, 40–42].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты десятилетних исследований, проведенных в отечественных и западных ведущих лабораториях, позволяют с уверенностью заключить, что соединения из ряда гамма-карболинов действительно способны подавлять прогрессию определенных типов протеинопатий и, как в случае с моделями БАС, замедлять развитие фенотипа нейродегенеративных процессов в *in vivo* моделях. Именно модуляция процессов агрегации белков, вовлеченных в механизмы протеинопатии, рассматривается в качестве важного элемента концепции разработки патогенетической терапии нейродегенеративных заболеваний [43]. В настоящее время имеется достаточно оснований для того, чтобы отнести отечественный препарат Димебон и его производные к группе перспективных соединений, на основе которых могут создаваться новые соединения этого ряда с улучшенными показателями фармакокинетики и эффективности действия и которые могут быть использованы в составе комплексной патогенетической терапии социально значимых нейродегенеративных болезней. ●

Исследование нейродегенеративных процессов в модельных системах поддержано грантом РНФ (№ 18-15-00357), содержание животных обеспечено программой поддержки биоресурсных коллекций ИФАВ РАН (ФАНО № 0090-2017-0016) и проведено на оборудовании ЦКП ИФАВ РАН и ЦКП ИБГ РАН, в рамках Государственного задания ИФАВ РАН (тема по ГЗ № 0090-2017-0019) и программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Skvortsova V.I., Bachurin S.O., Razinskaia O.D., Smirnov A.P., Kovrazhkina E.A., Pochigaeva K.I., Ninkina N.N., Shelkovnikova T.A., Ustiugov A.A. // Zh. Nevrol. Psikhiatr. im. S.S. Korsakova. 2011. V. 111. № 2. P. 4–9.
2. Bachurin S., Ninkina N., Tarasova T., Shelkovnikova T., Kovrazhkina E., Smirnov A., Razinskaia O., Skvortsova V. // Zh. Nevrol. Psikhiatr. im. S.S. Korsakova. 2013. V. 113. № 10. P. 74.
3. Bachurin S., Ninkina N., Tarasova T., Shelkovnikova T., Kovrazhkina E., Smirnov A., Razinskaya O., Skvortsova V. // Zh. Nevrol. Psikhiatr. im. S.S. Korsakova. 2013. V. 113. № 9. P. 86.
4. Mackenzie I.R., Bigio E.H., Ince P.G., Geser F., Neumann M., Cairns N.J., Kwong L.K., Forman M.S., Ravits J., Stewart H., et al. // Ann. Neurol. 2007. V. 61. № 5. P. 427–434.
5. Neumann M., Sampathu D.M., Kwong L.K., Truax A.C., Micsenyi M.C., Chou T.T., Bruce J., Schuck T., Grossman M., Clark C.M., et al. // Science. 2006. V. 314. № 5796. P. 130–133.
6. Scotter E.L., Chen H.J., Shaw C.E. // Neurotherapeutics. 2015. V. 12. № 2. P. 352–363.
7. Ustyugov A., Shevtsova E., Bachurin S. // Mol. Neurobiol. 2015. V. 52. № 2. P. 970–978.
8. Ustyugov A., Shevtsova E., Barreto G.E., Ashraf G.M., Bachurin S.O., Aliev G. // Curr. Med. Chem. 2016. doi: 10.2174/0929867323666160804122746.
9. Bachurin S., Bukatina E., Lermontova N., Tkachenko S., Afanasiev A., Grigoriev V., Grigorieva I., Ivanov Y., Sablin S., Zefirov N. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2001. V. 939. P. 425–435.
10. Doody R.S., Gavrilova S.I., Sano M., Thomas R.G., Aisen P.S., Bachurin S.O., Seely L., Hung D., Dimebon I. // Lancet. 2008. V. 372. № 9634. P. 207–215.
11. Kieburtz K., McDermott M.P., Voss T.S., Corey-Bloom J., Deue L.M., Dorsey E.R., Factor S., Geschwind M.D., Hodgeman K., Kayson E., et al. // Arch. Neurol. 2010. V. 67. № 2. P. 154–160.
12. Bharadwaj P.R., Bates K.A., Porter T., Teimouri E., Perry G., Steele J.W., Gandy S., Groth D., Martins R.N., Verdile G. // Transl. Psychiatry. 2013. V. 3. e332.
13. Bachurin S.O., Bovina E.V., Ustyugov A.A. // Med. Res. Rev. 2017. V. 37. № 5. P. 1186–1225.
14. Cano-Cuenca N., Solis-Garcia del Pozo J.E., Jordan J. // J. Alzheimers Dis. 2014. V. 38. № 1. P. 155–164.
15. Peters O.M., Connor-Robson N., Sokolov V.B., Aksinenko A.Y., Kukharsky M.S., Bachurin S.O., Ninkina N., Buchman V.L. // J. Alzheimers Dis. 2013. V. 33. № 4. P. 1041–1049.
16. Steele J.W., Gandy S. // Autophagy. 2013. V. 9. № 4. P. 617–618.
17. Steele J.W., Lachenmayer M.L., Ju S., Stock A., Liken J., Kim S.H., Delgado L.M., Alfaro I.E., Bernales S., Verdile G., et al. // Mol. Psychiatry. 2013. V. 18. № 8. P. 889–897.
18. Wang J., Ferruzzi M.G., Varghese M., Qian X., Cheng A., Xie M., Zhao W., Ho L., Pasinetti G.M. // Mol. Neurodegener. 2011. V. 6. № 1. P. 7.
19. Perez S.E., Nadeem M., Sadleir K.R., Matras J., Kelley C.M., Counts S.E., Vassar R., Mufson E.J. // Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol. 2012. V. 4. № 3. P. 115–127.
20. Peters O.M., Shelkovnikova T., Tarasova T., Springe S., Kukharsky M.S., Smith G.A., Brooks S., Kozin S.A., Kotelevtsev Y., Bachurin S.O., et al. // J. Alzheimers Dis. 2013. V. 36. № 3. P. 589–596.
21. Ninkina N., Peters O., Millership S., Salem H., van der Putten H., Buchman V.L. // Hum. Mol. Genet. 2009. V. 18. № 10. P. 1779–1794.
22. Peters O.M., Millership S., Shelkovnikova T.A., Soto I., Keeling L., Hann A., Marsh-Armstrong N., Buchman V.L., Ninkina N. // Neurobiol. Dis. 2012. V. 48. № 1. P. 124–131.
23. 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. // Neurotox. Res. 2012. V. 22. № 1. P. 33–42.
24. Bachurin S.O., Ustyugov A.A., Peters O., Shelkovnikova T.A., Buchman V.L., Ninkina N.N. // Dokl. Biochem. Biophys. 2009. V. 428. P. 235–238.
25. Ustyugov A.A., Shelkovnikova T.A., Kokhan V.S., Khritankova I.V., Peters O., Buchman V.L., Bachurin S.O., Ninkina N.N. // Bull. Exp. Biol. Med. 2012. V. 152. № 6. P. 731–733.
26. Coughlan K.S., Mitchem M.R., Hogg M.C., Prehn J.H. // Neurobiol. Aging. 2015. V. 36. № 2. P. 1140–1150.
27. Tesla R., Wolf H.P., Xu P., Drawbridge J., Estill S.J., Huntington P., McDaniel L., Knobbe W., Burket A., Tran S., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. № 42. P. 17016–17021.
28. 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., et al. // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. № 35. P. 25266–25274.
29. Deikin A.V., Kovrazhkina E.A., Ovchinnikov R.K., Bronovitskii E.V., Razinskaia O.D., Smirnov A.P., Ermolkevich T.G., Eliakov A.B., Popov A.N., Fedorov E.N., et al. // Zh. Nevrol. Psikhiatr. im. S.S. Korsakova. 2014. V. 114. № 8. P. 62–69.
30. Bronovitsky E.V., Deikin A.V., Ermolkevich T.G., Elyakov A.B., Fedorov E.N., Sadchikova E.R., Goldman I.L., Ovchinnikov R.K., Roman A.Y., Khritankova I.V., et al. // Dokl. Biochem. Biophys. 2015. V. 462. P. 189–192.
31. Maltsev A.V., Deykin A.V., Ovchinnikov R.K., Chicheva M.M., Kovrazhkina E.A., Razinskaya O.D., Bronovitsky E.V., Budevich A.I., Kirikovich Y.K., Bachurin S.O., et al. // Zh. Nevrol. Psikhiatr. im. S.S. Korsakova. 2017. V. 117. № 4. P. 64–67.
32. Schaffhauser H., Mathiasen J.R., Dicamillo A., Huffman M.J., Lu L.D., McKenna B.A., Qian J., Marino M.J. // Biochem. Pharmacol. 2009. V. 78. № 8. P. 1035–1042.
33. Wu J., Li Q., Bezprozvanny I. // Mol. Neurodegener. 2008. V. 3. P. 15.
34. Wang C.C., Kuo J.R.,Wang S.J. // Eur. J. Pharmacol. 2014. V. 734. P. 67–76.
35. Weisova P., Alvarez S.P., Kilbride S.M., Anilkumar U., Baumann B., Jordan J., Bernas T., Huber H.J., Dussmann H., Prehn J.H. // Transl. Psychiatry. 2013. V. 3. e317.
36. Zhang S., Hedskog L., Petersen C.A., Winblad B., Ankarcrona M. // J. Alzheimers Dis. 2010. V. 21. № 2. P. 389–402.
37. Eckert S.H., Eckmann J., Renner K., Eckert G.P., Leuner K., Muller W.E. // J. Alzheimers Dis. 2012. V. 31. № 1. P. 21–32.
38. Yamashita M., Nonaka T., Arai T., Kametani F., Buchman V.L., Ninkina N., Bachurin S.O., Akiyama H., Goedert M., Hasegawa M. // FEBS Lett. 2009. V. 583. № 14. P. 2419–2424.
39. Кухарский М.С., Хританкова И.В., Лыткина О.А., Овчинников Р.К., Устюгов А.А., Шелковникова Т.А., Броновицкий Е.В., Кохан В.С., Нинкина Н.Н., Бачурин С.О. // Патогенез. 2013. V. 11. № 1. P. 53–60.
40. Khritankova I.V., Kukharskiy M.S., Lytkina O.A., Bachurin S.O., Shorning B.Y. // Dokl. Biochem. Biophys. 2012. V. 446. P. 251–253.
41. Steele J.W., Ju S., Lachenmayer M.L., Liken J., Stock A., Kim S.H., Delgado L.M., Alfaro I.E., Bernales S., Verdile G., et al. // Mol. Psychiatry. 2013. V. 18. № 8. P. 882–888.
42. Bharadwaj P.R., Verdile G., Barr R.K., Gupta V., Steele J.W., Lachenmayer M.L., Yue Z., Ehrlich M.E., Petsko G., Ju S., et al. // J. Alzheimers Dis. 2012. V. 32. № 4. P. 949–967.
43. Kumar V., Sami N., Kashav T., Islam A., Ahmad F., Hassan M.I. // Eur. J. Med. Chem. 2016. V. 124. P. 1105–1120.