

На правах рукописи



Кухарский Михаил Сергеевич

**Эффект производных гамма-карболина на прогрессию протеинопатии в
трансгенных моделях болезни Альцгеймера**

03.01.04 Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологически активных веществ Российской академии наук и в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Научные руководители:

член-корр. РАН, доктор химических наук
Бачурин Сергей Олегович

доктор медицинских наук
Нинкина Наталья Николаевна

Официальные оппоненты:

Гусев Николай Борисович

доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент Российской академии наук, Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова", кафедра биохимии биологического факультета, заведующий кафедрой

Кучеряну Валериян Григорьевич

доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение "Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии" Российской академии медицинских наук, главный научный сотрудник

Ведущая организация:

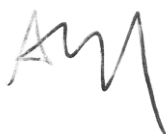
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Защита состоится «5» декабря 2013г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, доктора наук при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы РАН по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1.

Автореферат разослан «31» октября 2013 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



А.Ф. Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространённой формой первичных дегенеративных деменций - распространённость составляет около 10% среди людей от 65 лет и старше. Рост средней продолжительности жизни в развитых странах ведет к существенному увеличению общего числа больных. По современным оценкам более 35 миллионов человек в мире уже страдают данным заболеванием, и ожидается, что к 2050 году эта цифра увеличится до 115 миллионов человек. Общемировые затраты, связанные с лечением и уходом за пациентами с БА за 2010 год составили более 600 миллиардов долларов США. Это определяет социальную значимость БА и актуальность проведения разработок по ее исследованию и созданию методов эффективной терапии.

Успехи, достигнутые в биомедицинской науке, а также привлечение новых современных методов молекулярной биологии и биотехнологии для выявления молекулярных основ патогенеза БА и определения возможных терапевтических мишеней стимулировало разработку новых болезнь-модифицирующих препаратов. Было установлено, что важным звеном патогенеза БА является образование двух типов характерных гистопатологических включений: сенильных бляшек, в формировании которых основную роль играют амилоидные пептиды ($A\beta$), образующиеся при специфическом расщеплении белка-предшественника амилоида (APP), и нейрофибриллярных клубков, формируемых патологическими формами белка tau. Оба эти компонента рассматриваются в настоящее время в качестве перспективных молекулярных мишеней, воздействие на которые позволит замедлить или остановить развитие нейродегенеративного процесса, поэтому создание препаратов для коррекции тау-патии и $A\beta$ -амилоидоза является актуальной задачей терапии БА.

Цель исследования:

Исследование нейропротекторного препарата димебон и его производных как потенциальных регуляторов прогрессии церебрального амилоидоза и формирования тау-реактивных нейрофибриллярных клубков в трансгенных моделях болезни Альцгеймера.

Для достижения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

1. Осуществить постановку трансгенных моделей тау-патии (с использованием мышей линии tau^{P301S}) и церебрального амилоидоза (на мышах линии 5xFAD), применяемых для воспроизведения основных биохимических и патоморфологических характеристик болезни Альцгеймера.
2. Изучить влияние препарата димебон и его производных в ряду гамма-карболинов (DF302 и DF312) на динамику накопления гиперфосфорилированного белка тау в спинном мозге трансгенных мышей, моделирующих тау-патию.
3. Исследовать влияние указанных соединений на прогрессию моторной дисфункции у трансгенных мышей, моделирующих тау-патию.
4. Изучить влияние димебона на соотношение пептидов A β 40 и A β 42, образующихся при специфическом расщеплении белка-предшественника амилоида (APP) в мозге трансгенных мышей, моделирующих церебральный амилоидоз.
5. Исследовать влияние димебона на количество амилоидных отложений, формируемых A β -пептидами в мозге трансгенных мышей, моделирующих церебральный амилоидоз.
6. Оценить действие димебона на когнитивные функции трансгенных мышей, моделирующих церебральный амилоидоз.
7. Исследовать влияние димебона на аутофагосомную систему клеток нервной системы.

Научная новизна исследования.

Впервые исследовано действие гамма-карболиновых соединений на основные патогенетические составляющие БА в трансгенных модельных системах, воспроизводящих прогрессирующий церебральный амилоидоз и тау-патию у мышей. Впервые показано, что гамма-карболиновые соединения оказывают выраженный эффект на формирование внутриклеточных включений амилоидного типа, формируемых гиперфосфорилированными патогенными формами белка тау (нейрофибриллярных клубков), и статистически достоверно замедляют развитие двигательной дисфункции у мышей линии τ^{P301S} . Получены новые оригинальные данные по влиянию димебона на прогрессию церебрального амилоидоза у трансгенных мышей линии 5xFAD. Впервые изучено влияние димебона на соотношение пептидов A β 40 и A β 42 в мозге трансгенных мышей линии 5xFAD и проведен количественный анализ числа амилоидных включений в пораженных отделах головного мозга модельных животных на разных этапах прогрессии амилоидоза в разных возрастных группах. Впервые описана коррекция когнитивной дисфункции, выраженной в проявлениях тревожного поведения, у мышей линии 5xFAD, хронически получавших димебон.

Практическая значимость.

Полученные в диссертационном исследовании данные по специфическому действию гамма-карболиновых соединений, замедляющих прогрессию тау-патии, позволяют наметить новую стратегию создания на их основе болезнь-модифицирующих препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний, в патогенезе которых принципиально важную роль играет агрегация белка тау. Корректирующий когнитивную функцию при церебральном амилоидозе эффект димебона, выявленный на трансгенной модели 5xFAD, является основанием для проведения дальнейших масштабных испытаний гамма-карболиновых соединений при разработке терапии церебральных амилоидозов.

Апробация работы.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на Конференции по Программе «Фундаментальные науки – медицине» (Москва, Россия, 2012), на V Всероссийском с международным участием медико-биологическом конгрессе молодых ученых «Симбиоз-Россия 2012» (Тверь, Россия, 2012), на Международной конференции «Эффективные инструменты современной науки - 2012» (Прага, Чехия, 2012), на Всероссийской молодежной конференции «Медицинские основы жизнедеятельности организма в норме, патологии и эксперименте» (Омск, Россия, 2012), на 11-ой Международной конференции по болезням Альцгеймера и Паркинсона AD/PD™ 2013 (Флоренция, Италия, 2013), на XIX межгородской конференции молодых учёных «Актуальные проблемы патофизиологии – 2013» (Санкт-Петербург, Россия, 2013), на 17-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых, (Пущино, Россия, 2013), на VI конференции Общества Нейротоксикологии «Механизмы нейродегенеративных заболеваний» (Вальдивия, Чили, 2013), на 11-ой съезде Европейского сообщества по лечению БАС (Шеффилд, Великобритания, 2013).

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 4 статьи и 8 публикаций в сборниках докладов научных конференций.

Структура и объём работы.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, методов и материалов исследования, полученных результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 120 страницах, иллюстрирована 17 рисунками и 2 таблицами. Список цитируемой литературы включает 188 наименования. Работа выполнена при финансовой поддержке Соглашения №8854 в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные.

Линия трансгенных мышей Tg(APP^{SwFILon},PSEN1^{*M146L*L286V})6799Vas/J, известная под условным названием 5xFAD, имеет в геноме трансгенную кассету, содержащую кодирующую часть белка APP с тремя аминокислотными заменами (K670N/M671L; I716V; V717I), ассоциированными с известными наследственными формами БА, и кодирующую часть белка пресенилина с двумя аминокислотными заменами (M146L; L286V), также соответствующими мутациям, обнаруживаемым при наследственных формах БА. Линия получена из коллекции Jackson Laboratory и поддерживалась на генетическом фоне гибридов F1 SJL/C57Bl6 в гемизиготном по трансгенной кассете состоянии.

Мыши линии tau^{P301S} были получены из лаборатории Michel Goedert (MRC LMB, Cambridge, UK). Трансгенная кассета содержит участок, кодирующий мутантный тау белок человека с заменой аминокислоты P301S. Линия велась на генетическом фоне C57Bl6J в гомозиготном по трансгенной кассете состоянии.

Колонии экспериментальных и контрольных мышей содержались в условиях искусственно регулируемого светового дня (12 часов светлого времени, 12 часов темного времени). Работы с животными проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» от 2003 г.

Генотипирование.

Геномную ДНК выделяли из биопсий уха животных с помощью набора GenePak® PCR Core (ООО "Лаборатория ИзоГен"). Генотипирование проводили методом ПЦР с последующим разделением амплифицированных фрагментов ДНК в агарозном геле. Для детекции трансгенной кассеты в геноме мышей линии 5xFAD использовали праймеры: 5'-AGGACTGACCACTCGACCAG-3' и 5'-CGGGGGTCTAGTTCTGCAT-3'.

Соединения.

Димебон. 2,8-Диметил-5-[2-(6-метилпирдин-3-ил)этил]-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-пиридо[4,3-*b*]индол дигидрохлорид, водный раствор (производство ОАО «Органика», г. Новокузнецк).

DF302. 2,8-Диметил-5-[2-(5-фторпирдин-3-ил)этил]-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-пиридо[4,3-*b*]индол дигидрохлорид, водный раствор.

DF312. 8-Метил-5-[2-(5-фторпирдин-3-ил)этил]-2-этил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-пиридо[4,3-*b*]индол дигидрохлорид, водный раствор.

Животные получали исследуемые соединения с 5-ой недели жизни с питьевой водой (концентрация 70 мкг/мл), доступ к воде не ограничивался.

Количественный иммуноблоттинг.

Для анализа белков проводили экстракцию тотального белка из тканей отделов нервной системы. Белки разделяли с помощью денатурирующего ПААГ электрофореза, переносили на PVDF (поливинилдендифторидную) мембрану (Hybon-P, Amersham), используя полусухой метод. После блокировки мембрану инкубировали с первичными антителами, отмывали и инкубировали с вторичными антителами с флуоресцентной меткой Cy3 или Cy5 (Amersham). Интенсивность свечения белковых полос анализировали с использованием системы AlphaInnotec Mutilmage III и программного обеспечения AlphaImager 2200 (AlphaInnotec). Мембрану использовали повторно для инкубации с антителами против GAPDH в качестве внутреннего контроля. Экспериментальные данные представлены как отношение интенсивности флуоресцентного свечения полос исследуемого белка и контрольного GAPDH. При анализе LC3 данные количественного анализа представлены как отношение между интенсивностью свечения белковой изоформы LC3-II к изоформе LC3-I.

Иммуноферментный анализ.

Количественную оценку содержания Aβ пептидов проводили с помощью коммерческого ИФА набора (sandwich-ELISA kits, Life Technologies). Образцы тканей гиппокампа или коры головного мозга мышей гомогенизировали в

растворе 5М гуанидин-HCl после чего разбавляли в ELISA буфере в 50 раз до конечной концентрации гуанидин-HCl 0,1 М. Иммуоферментный анализ проводили согласно протоколу производителя набора, в двух повторениях для каждого образца. Содержание белка в лизатах определяли методом Бредфорда с помощью коммерческого набора DC Protein Assay kit (BioRad) . Конечную концентрацию A β пептидов рассчитывали по оптической плотности при 450 нм с использованием калибровочной кривой.

ОТ-ПЦР в реальном времени.

Для выделения тотальной РНК использовали набор RNeasy Plus (Qiagen) синтезировали комплементарную цепь с помощью обратной транскриптазы SuperScript® III (Invitrogen) и гексамерного рандом-праймера (Promega). ПЦР в реальном времени проводили с полученной кДНК в качестве матрицы в амплификаторе StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems) с использованием набора DyNAmo HS SYBR Green supermix (Finnzymes). В качестве внутреннего контроля использовали уровень экспрессии гена GAPDH мыши.

Гистологический и иммуногистохимический анализ.

Для детекции амилоидных отложений, депарафинизированные срезы головного мозга окрашивали Конго-красным, с последующей дифференцировкой в щелочном этаноле, после чего проводили оценку площади амилоидных включений относительно общей площади среза. В препаратах, которые использовали для иммуногистохимического анализа, блокировали эндогенную активность пероксидазы, для чего проводили регидратацию срезов инкубированием в 3% перекиси водорода в метаноле в течение 30 мин при 4°C. Затем отмывали срезы в ФСБ, блокировали в блокирующем растворе, содержащем 0,4% Твин 20 (ФСБ-Т) и 10% сыворотки лошади или козы, инкубировали с первичными антителами в этом же растворе. Препараты отмывали в ФСБ и далее инкубировали с вторичными биотинилированными антителами против IgG мыши или кролика, (1:500 в ФСБ-Т). Визуализацию проводили раствором ABC (Vector Laboratories) и добавлением (после отмывки)

3,3-диаминобензидина (Sigma). Дегидратацию срезов осуществляли в серии спиртов (50%, 95% и 100% этанол по 5 мин), осветляли срезы в ксилоле, заключали в синтетическую среду DPX (BDH) и подсушивали. Микрофотографии получали при помощи фотокамеры Leica DFS 490 и программного обеспечения Leica Application Suit v. 2.8.1 (Leica Microsystems).

Антитела.

Для иммуноблоттинга и иммуногистохимии использовали первичные антитела: моноклональные мышинные против тау фосфорилированного по S202 и T205 (AT8, Innogenics); поликлональные кроличьи против GFAP (Sigma-Aldrich); моноклональные мышинные против NeuN (MAB377, Chemicon); поликлональные кроличьи против LC3b (Cell Signalling). Вторичные козы биотинилированные антитела против IgG мыши или кролика (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, Великобритания).

Поведенческое тестирование.

Для оценки двигательной активности, когнитивных функций и эмоционального статуса использовали стандартные методики: тест «вращающийся стержень», тест «вращающийся стержень с обучением», тест «перевернутая сетка», приподнятый крестообразный лабиринт.

Статистическая обработка данных.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программных пакетов Statistica 8.0 (StatSoft, Inc.) и GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эффект гамма-карболинов на прогрессию нейродегенеративного процесса у трансгенных мышей линии tau^{P301S}.

В патогенезе БА важное значение придается нарушению метаболизма и функции тау белка. В связи с этим была проведена оценка влияния димебона и его структурных аналогов DF302 и DF312 на развитие нейродегенеративного процесса у трансгенных мышей линии tau^{P301S}. Характерной особенностью

данной линии животных является высокий уровень экспрессии P301S – мутантной гиперфосфорилированной формы белка тау человека в тканях нервной системы. Наиболее выраженная и легко документируемая патология у τ^{P301S} мышей наблюдается в спинном мозге и сопровождается существенными нарушениями моторной функции уже в относительно раннем возрасте. Прогрессирующая потеря нейронов в вентральных рогах спинного мозга ассоциирована с накоплением филаментов гиперфосфорилированного белка тау. Для оценки действия димебона и его производных на прогрессию тау-патии был проведен биохимический и иммуногистохимический анализ содержания гиперфосфорилированного белка тау в тканях нервной системы модельных животных. В исследовании использовались антитела AT8, специфически узнающие S202 и T205 фосфорилированные формы белка тау. С помощью количественного иммуноблоттинга (рисунок 1) было показано, что по мере развития тау-патии происходит накопление гиперфосфорилированного белка тау в тканях спинного мозга трансгенных мышей. В группе животных, получавших димебон, накопление патогенных форм белка в нейронах спинного мозга происходило существенно медленнее, чем в контрольной группе, и к 6-му месяцу жизни наблюдались статистически достоверные различия ($p=0,014$) в количестве гиперфосфорилированного тау в тканях опытной и контрольной групп животных.

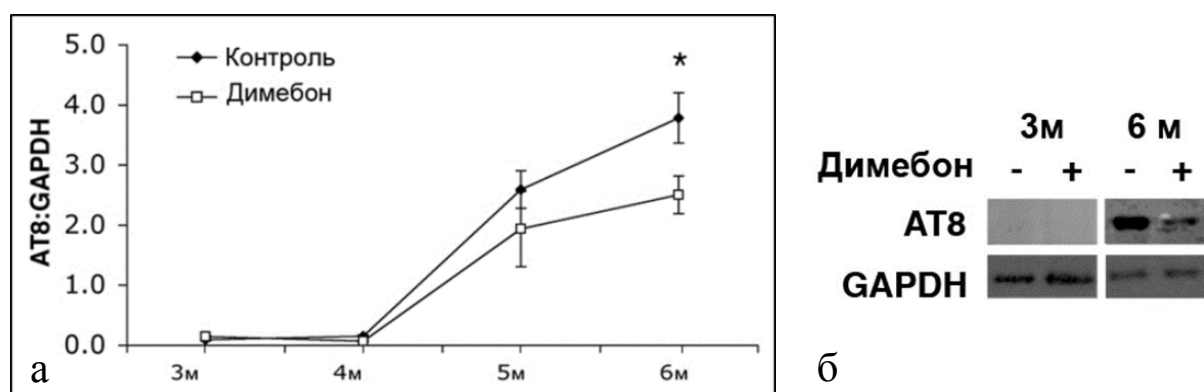


Рисунок 1 – Общее количество гиперфосфорилированного белка тау в спинном мозге τ^{P301S} мышей, получавших димебон, и контрольной группы. а – результаты количественного иммуноблоттинга, приведены средние значения

интенсивности свечения AT8-позитивных белковых полос по отношению к значениям для GAPDH ($n=3$ для 3 и 4 мес., $n=5$ для 5 мес., $n=8$ для 6 мес. животных, * - $p<0,05$). б – репрезентативная фотография результатов вестерн блоттинга для 3 и 6 мес. животных контрольной и опытной групп.

Количество нейронов, содержащих гиперфосфорилированную форму белка тау, было определено иммуногистохимическим окрашиванием срезов грудного отдела спинного мозга мышей с последующим подсчетом числа положительно окрашенных нейронов (рисунок 2). Прогрессирующее увеличение количества AT8-позитивных нейронов было выявлено как в опытной (димебон), так и в контрольной группах, однако, у животных, получавших димебон, отмечалась выраженная тенденция к уменьшению количества таких нейронов, а к 6 месяцу эти различия были статистически достоверными ($p=0,02$). Схожие результаты были получены при исследовании двух новых производных димебона DF302 и DF312 (рисунок 2в). Значимое уменьшение количества нейронов, содержащих гиперфосфорилированные формы тау белка, так же наблюдалось в возрасте 6 месяцев ($p=0,023$ для DF302; $p=0,029$ для DF312).

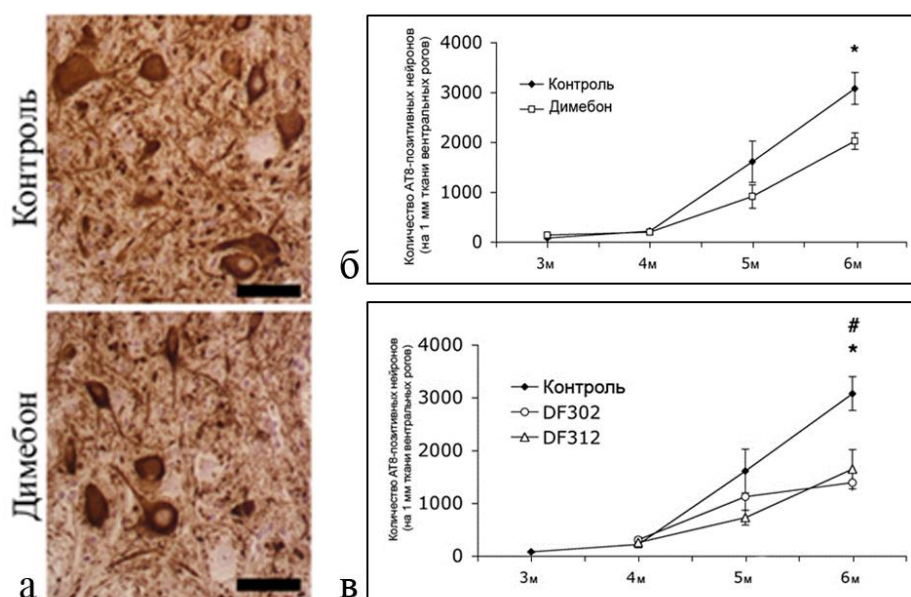


Рисунок 2 – Количество нейронов, содержащих гиперфосфорилированные формы белка тау, в опытных и контрольных группах трансгенных животных

tau^{P301S}. а – иммуногистохимическая окраска антителами AT8 срезов грудного отдела спинного мозга tau^{P301S} мышей; б – результаты для димебона (* - p<0,05); в - результаты для DF302 (* - p<0,05), DF312 (# - p<0,05).

Далее было показано, что у животных, хронически получавших димебон или его аналоги (DF302, DF312), общее количество нейронов в вентральных рогах грудного отдела спинного мозга не изменяется (рисунок 3). Для этого была использована иммуногистохимическая окраска на нейроспецифический ядерный маркер NeuN. Полученные результаты показывают, что исследованные гамма-карболины препятствуют накоплению гиперфосфорилированного белка тау, но не предотвращают гибель нервных клеток в спинном мозге tau^{P301S} мышей.

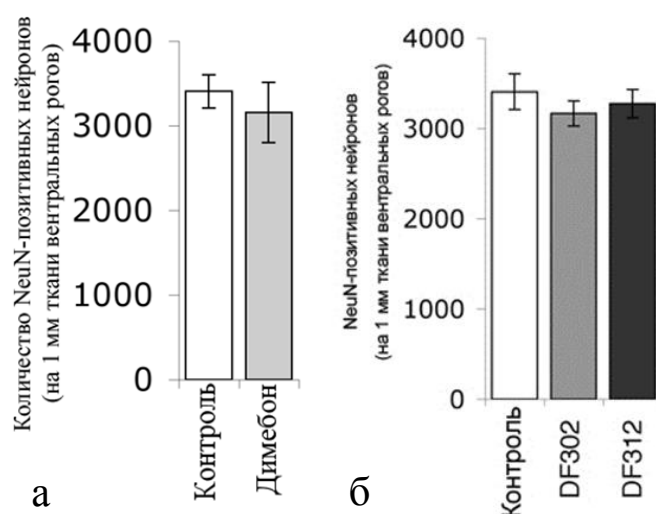


Рисунок 3 – Количество NeuN-позитивных нейронов в вентральных рогах спинного мозга tau^{P301S} мышей, рассчитанное на единицу площади, возраст животных – 9 месяцев. а – результаты для димебона. б – результаты для DF302, DF312.

Обнаруженные нами биохимические изменения в количестве гиперфосфорилированного белка тау прямо коррелировали с функциональным состоянием двигательной системы модельных животных, что подтверждено анализом прогрессии моторной дисфункции с помощью инструментальных тестов «ротарод» и «перевернутая сетка». Анализ двигательной функции

животных проводили ежемесячно, начиная с третьего месяца жизни. Было показано, что у трансгенных мышей с возрастом происходит прогрессивное ухудшение баланса, координации и мышечной силы (рисунок 4). В тоже время животные, получавшие димебон, демонстрировали лучшие показатели при выполнении теста «ротарод» на всех временных точках тестирования (рисунок 4а). По способности удерживаться на перевернутой сетке животные контрольной и опытной групп не отличались друг от друга на 3-м и 5-м месяце, однако показали достоверные отличия на 4-м и 6-м месяце жизни (рисунок 4б).

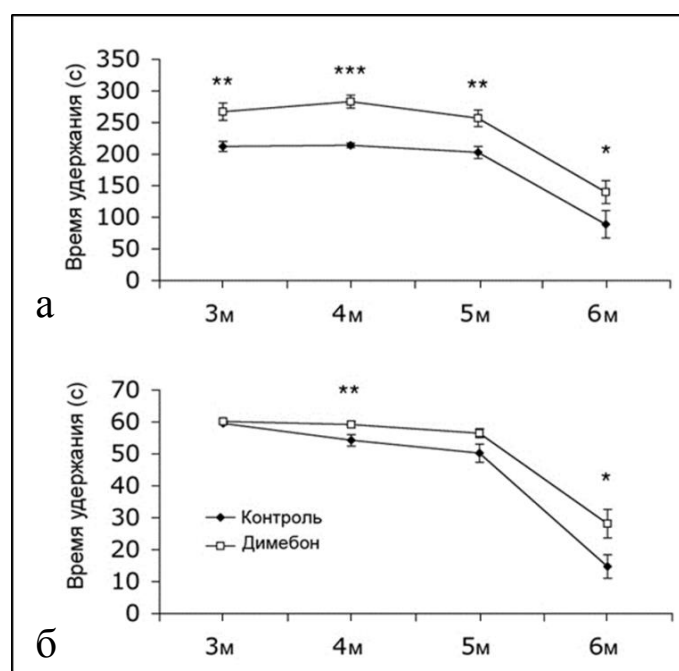


Рисунок 4— Сравнение показателей баланса и координации движений в тестах на вращающемся стержне (а) и «перевернутой сетке» (б) у τ^{P301S} мышей разного возраста, хронически получавших димебон, и контрольной группы. Возраст указан в месяцах (* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$).

Таким образом, димебон существенно замедляет прогрессию моторной дисфункции, развивающейся вследствие накопления агрегированных форм белка тау. Тестирование трансгенных животных, получавших новые производные димебона DF302 и DF312 показало, что они обладают схожим с димебоном эффектом (рисунок 5).

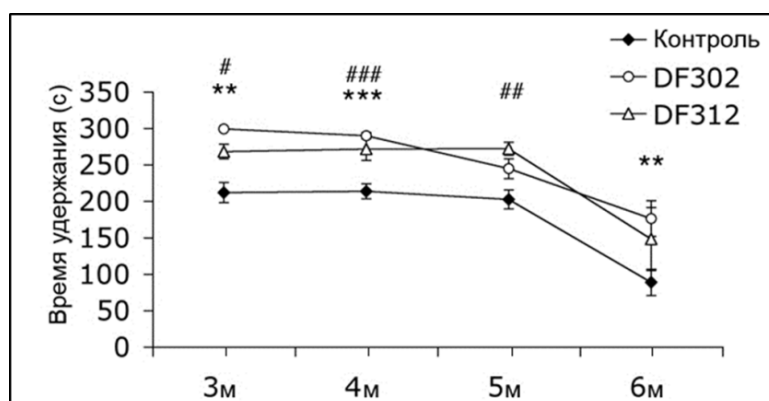


Рисунок 5 – Сравнение показателей баланса и координации движений в тесте на вращающемся стержне у τ^{P301S} мышей, хронически получавших препараты DF302, DF312, и контрольной группы.

Возраст указан в месяцах (Для DF302 * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$. Для DF312 # - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$).

Анализ эффекта димебона на развитие церебрального амилоидоза у трансгенных мышей линии 5xFAD.

В различных отделах мозга животных линии 5xFAD вскоре после рождения отмечается быстро прогрессирующее накопление β -амилоидных пептидов, в основном $A\beta_{42}$ и в меньшей степени $A\beta_{40}$. С помощью ИФА была проведена сравнительная оценка концентрации этих пептидов в гиппокампе и коре головного мозга у 9-ти и 15-ти месячных контрольных трансгенных животных и трансгенных животных, хронически получавших димебон с питьевой водой.

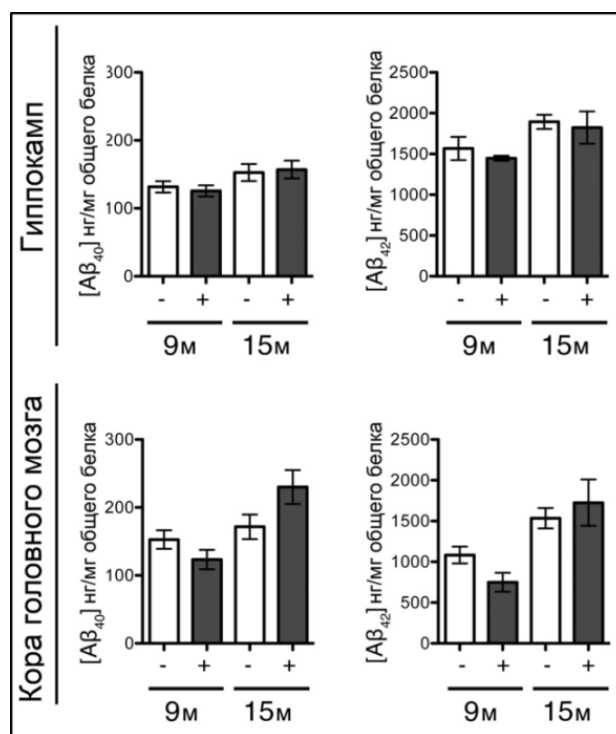


Рисунок 6 – Концентрация Aβ₄₀ и Aβ₄₂ пептидов в гиппокампе и коре головного мозга у 5xFAD мышей контрольной группы (-) и 5xFAD мышей, хронически получавших димебон (+), в двух возрастных группах.

Полученные данные показали (рисунок 6), что димебон не оказывал существенного влияния на концентрацию амилоидных пептидов (Aβ₄₂, Aβ₄₀) в гиппокампе мышей линии 5xFAD, при этом в коре головного мозга наблюдалось некоторое понижение концентрации Aβ-пептидов на 9-ом месяце наблюдения и повышение концентрации 15-ом месяце, однако статистически значимых различий выявлено не было ($p > 0,05$, критерий Манна-Уитни) и обнаруженный нами эффект требует дальнейших исследований, с использованием большего количества животных.

Далее было исследовано количество амилоидных отложений в гиппокампе и коре головного мозга экспериментальных животных разного возраста (3-, 9- и 15-ти месячных), выявляемых окрашиванием гистологических срезов специфическим красителем на амилоид Конго красным. Известно, что у 5xFAD мышей в период с 3-го по 15-ый месяц жизни

происходит выраженное накопление включений в гиппокампе (рисунок 7) и соматосенсорной коре.

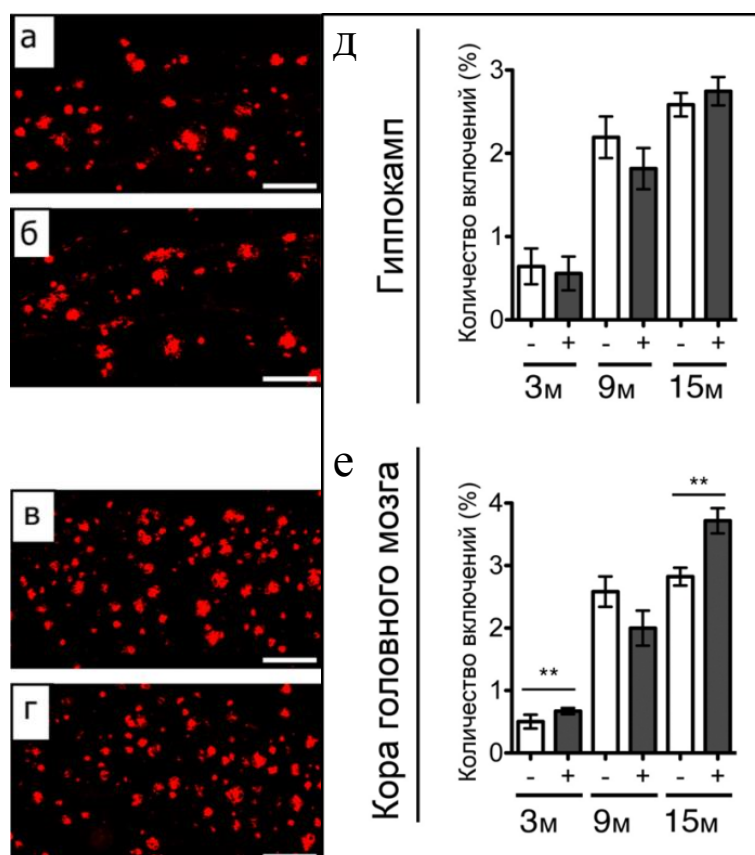


Рисунок 7 – Количество амилоидных отложений в гиппокампе (а,б,д) и соматосенсорной коре (в,г,е) 5xFAD мышей в контрольной группе (-) и группе, получавшей димебон (+). а-г – репрезентативные фотографии препаратов, окрашенных Конго красным: а, в – контроль; б, г - димебон (** - $p < 0,01$).

Нами было выявлено статистически достоверное увеличение количества амилоидных включений в коре головного мозга 5xFAD мышей 3-х и 15-ти месячного возраста, хронически получавших димебон (рисунок 7е). При этом препарат не оказывал действия на процесс накопления включений в гиппокампе (рисунок 7д). У 3-х месячных мышей контрольной группы площадь покрытия конгофильными включениями, относительно всей исследуемой области составляла $0,50 \pm 0,11\%$, у животных, получавших димебон $0,67 \pm 0,05\%$ ($p = 0,0052$; критерий Манна-Уитни). На временной точке в 9 месяцев наблюдалась тенденция к уменьшению количества включений под действием

димебона, однако эти различия не являлись статистически значимыми. У стареющих же 5xFAD мышей (возраст 15 месяцев) общая площадь амилоидных включений на единицу гистологически-исследуемой области была больше в коре головного мозга животных, получавших димебон ($3,72 \pm 0,20\%$), чем в контрольной группе ($2,82 \pm 0,14\%$; $p=0,0017$; критерий Манна-Уитни). Депонирование патогенных A β пептидов в составе инертных экстраклеточных структур – амилоидных бляшек, считается многими исследователями защитным процессом, обеспечивающим вывод патогенных форм потенциально-амилоидогенных белков и токсичных растворимых промежуточных продуктов их агрегации из цитоплазмы нейронов и перевод в нерастворимые белковые комплексы патогистологических включений. Нами получены первые указания на то, что Димебон может стимулировать этот защитный механизм, обеспечивая, таким образом, нейропротекторный эффект на поздних стадиях протеинопатии.

Одним из важных показателей развития деменции у животных является изменение их веса. Нами была проведена оценка прироста массы у стареющих 5xFAD мышей. Статистическая обработка данных проводилась методом двухфакторного дисперсионного анализа с последующим апостериорным сравнением групп (post-hoc), с помощью теста Бонферрони. Начиная с 7-го месяца, наблюдалось значительное отставание в наборе массы 5xFAD мышей по сравнению с контрольной группой нетрансгенных мышей (рисунок 8). У стареющих 5xFAD мышей, хронически получавших димебон, было выявлено некоторое замедление потери веса. Расхождение кривых прироста массы тела у группы ТГ димебон и ТГ контроль наблюдалось между 10-м и 14-м месяцами жизни.

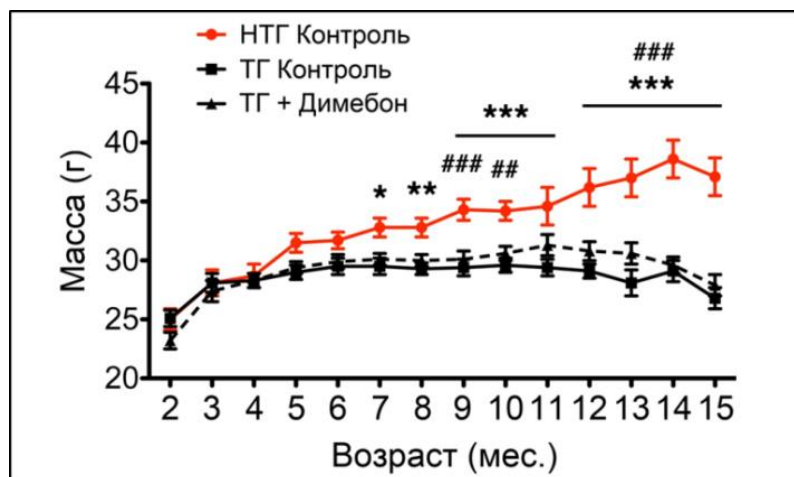


Рисунок 8 – Масса тела 5xFAD мышей, хронически получавших или не получавших димебон. Красным показаны значения для мышей дикого типа соответствующих возрастов.

Показателем прогрессирующего нейродегенеративного процесса у 5xFAD мышей является развивающаяся с возрастом моторная дисфункция, которая выявляется на вращающемся стержне в тесте «ротарод» с обучением. Во всех тестах был продемонстрирован эффект обучения, проявляющийся в лучшем выполнении теста на второй и третий дни тестирования. В возрасте 9-ти и 15-ти месяцев обе группы трансгенных мышей (ТГ контроль и ТГ димебон) хуже выполняли тест, в сравнении с нетрансгенными животными. Различий между группами ТГ контроль и ТГ димебон зафиксировано не было (рисунок 9).

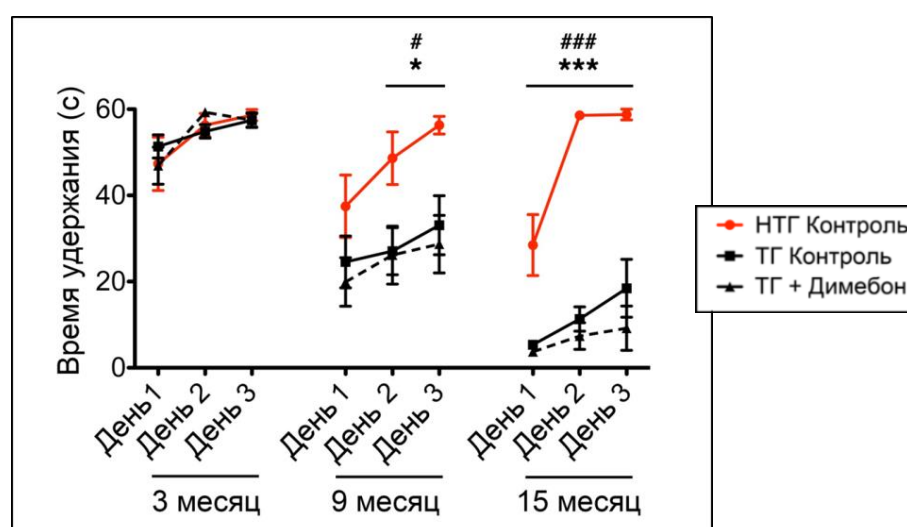


Рисунок 9 – Тестирование 5xFAD мышей разного возраста на вращающемся стержне при трехдневном обучении (сравнение НТГ контроль и ТГ контроль * * * * *)

- $p < 0,05$; *** - $p < 0,001$; сравнение НТГ контроль и ТГ димебон # - $p < 0,05$; ### - $p < 0,001$).

Другой фенотипической характеристикой линии 5xFAD является когнитивная дисфункция, проявляющаяся дефицитом тревожного поведения у стареющих мышей при тестировании в приподнятом крестообразном лабиринте, что проявляется в увеличении количества заходов и общего времени, проведенного в светлом отсеке. Нами было показано, что администрирование димебона 5xFAD мышам приводило к существенной коррекции когнитивной функции у стареющих животных. Так, число заходов в светлый рукав лабиринта снижалось практически до уровня значений контрольной группы здоровых животных дикого типа того же возраста (9 месяцев), что говорит о коррекции дефицита тревожного поведения (рисунок 10). И хотя показатели снижения среднего времени, проведенного в светлом отсеке лабиринта, не достигали статистической достоверности в силу высокой дисперсии признака, различия ($p = 0,1962$), выявленный нами эффект димебона на проявления церебрального амилоидоза у стареющих мышей, является основанием для дальнейшего исследования гамма-карболиновых соединений.

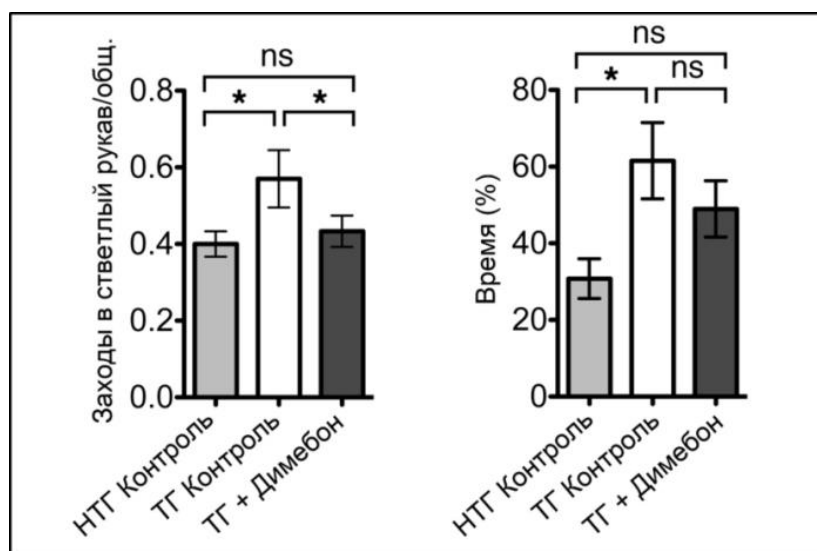


Рисунок 10 – Сравнительная оценка дефицита тревожного поведения у стареющих 5xFAD, получавших и не получавших димебон, в приподнятом

крестообразном лабиринте, возраст 9 месяцев (* - $p < 0,05$; критерий Манна-Уитни).

Изучение влияния димебона на аутофагосомную систему.

Недавно целым рядом лабораторий независимо были получены данные, свидетельствующие о том, что димебон способен стимулировать аутофагию при различных типах протеинопатий и, тем самым, оптимизировать контролируемую деградацию патогенных белковых агрегатов. Нами впервые было показано, что обработка димебоном культуры клеток нейробластомы человека SH SY5Y приводит к повышению уровня транскрипции маркерных белков аутофагии. Методом количественной ОТ-ПЦР была выявлена активация экспрессии генов *Atg5* и *Atg12* через 2 часа после добавления димебона и через 1 час для *Atg16* (рисунок 11).

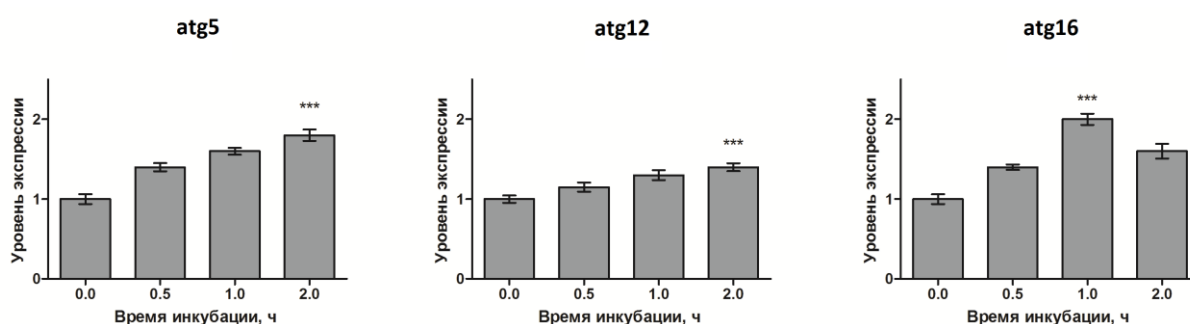


Рисунок 11 – Анализ уровней экспрессии мРНК, кодирующих маркерные белки аутофагии, методом количественной ПЦР в реальном времени (***- достоверные различия в сравнении с базовым уровнем, $p < 0,001$, критерий Стьюдента).

Обнаруженный нами быстрый синхронный рост в уровнях транскрипции *Atg5*, *Atg12*, *Atg16* в ответ на обработку клеточной культуры димебоном указывает на один из возможных механизмов его действия – как активатора аутофагосомной системы, поскольку продукты этих генов участвуют в формировании белкового комплекса после ковалентного связывания ATG5 с

ATG12 и присоединения ATG16, который необходим для формирования аутофагосомы.

Для исследования отдаленного эффекта хронического введения димебона на активность аутофагосомной системы в тканях пораженных отделов нервной системы модельных мышей была проведена оценка количественного соотношения между изоформами белка LC3. Известно, что при повышении активности аутофагии баланс между LC3-I и LC3-II сдвигается в сторону изоформы LC3-II. Данные количественного иммуноблоттинга не выявили изменений в соотношении LC3 изоформ в препаратах тотального белка спинного мозга τ^{P301S} мышей в возрасте 5 и 6 месяцев (рисунок 12: а, б), что говорит о том, что на поздних стадиях тау-патии нейропротекторный эффект гамма-карболинов не может быть объяснен лишь активацией аутофагосомной системы.

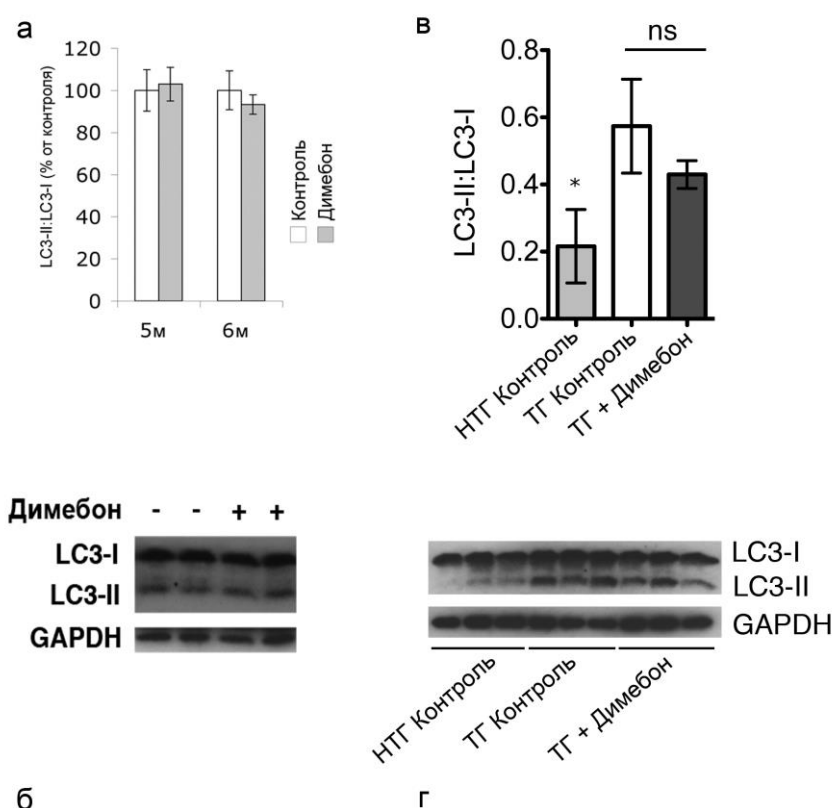


Рисунок 12 – Соотношение LC3-I и LC3-II изоформ в препаратах тотального белка из тканей спинного или головного мозга трансгенных мышей на развитых стадиях тау-патии и Аβ-амилоидоза соответственно. а,б – линия τ^{P301S} ,

приведены данные для 5-ти и 6-ти месячных животных получавших (+) и не получавших (-) димебон. в,г – линия 5xFAD, возраст животных 9 месяцев. б,г – репрезентативные фотографии иммуноблоттинга.

Интересно отметить, что у 5xFAD мышей аутофагосомная система перманентно активирована и уровень изоформы LC3-II стабильно повышен в тканях нервной системы. При этом нам не удалось показать дополнительного увеличения уровня изоформы LC3-II у стареющих 5xFAD мышей, хронически получавших димебон (рисунок 12: в, г). По-видимому, на поздних стадиях данного типа протеинопатии, выявленный терапевтический эффект гамма-карболинов так же не может быть объяснен активацией аутофагосомной системы.

ВЫВОДЫ

1. Хроническое введение димебона и его фторированных аналогов (DF302 и DF312) снижает уровень гиперфосфорилированных форм белка тау в спинном мозге трансгенных мышей, моделирующих тау-патию.
2. В пораженных отделах нервной системы трансгенных мышей, моделирующих тау-патию, количество нейронов, содержащих гиперфосфорилированные формы белка тау, снижается при хроническом введении исследованных соединений при сохранении общего числа нейронов.
3. Хроническое введение димебона и его производных замедляет прогрессию моторной дисфункции у трансгенных мышей, моделирующих тау-патию.
4. Хроническое введение димебона не оказывает статистически значимого эффекта на концентрацию A β 40 и A β 42 пептидов в гиппокампе и коре головного мозга трансгенных мышей, моделирующих церебральный амилоидоз.
5. Количество внеклеточных амилоидных отложений – конечных продуктов агрегации A β -пептидов, увеличивается в коре головного мозга трансгенных мышей, моделирующих церебральный амилоидоз, при хроническом введении димебона.
6. Хроническое введение димебона способствует частичной нормализации тревожного поведения у трансгенных мышей, моделирующих церебральный амилоидоз.
7. Выявленный терапевтический эффект гамма-карболинов на поздних стадиях протеинопатий, характерных для болезни Альцгеймера, не является следствием активации аутофагосомной системы.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. Хританкова И.В., Кухарский М.С., Лыткина О.А., Бачурин С.О., Шоринг Б.Ю. Активация компонентов аутофагосомной системы под действием димебона в культуре клеток нейробластомы человека // Доклады академии наук. – М., 2012. – Т. 446. – № 4. С. 471-473.
2. 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. 1041-9
3. 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., Ninkina N., Buchman V. L. Chronic Administration of Dimebon does not Ameliorate Amyloid-beta Pathology in 5xFAD Transgenic Mice // J Alzheimers Dis. – 2013. – V. 36, № 3. – P. 589-96.
4. 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. Разработка клеточной модели TDP43-протеинопатии для поиска подходов к патогенетической терапии фронтотемпоральной лобарной дегенерации // Патогенез. – М., 2013. – Т.11. – №1. С. 53-60.

Тезисы докладов

5. Бачурин С.О., Хританкова И.В., Кухарский М.С., Устюгов А.А. Направленный поиск инновационных лекарственных препаратов, препятствующих развитию протеинопатий в мозге. Конференция по Программе «Фундаментальные науки – медицине», раздел «Мозг: фундаментальные и прикладные проблемы», 1-2 ноября 2012 года, г. Москва. С. 85-86
6. Кухарский М. С., Тарасова Т. В., Овчинников Р.К., Бачурин С.О. Димебон ингибирует прогрессию нейродегенеративных процессов в tau-

- трансгенных мышах. V Всероссийский с международным участием медико-биологический конгресс молодых ученых «Симбиоз-Россия 2012», 3-8 декабря 2012 года, г. Тверь.
7. Khritankova I.V., Lytkina O.A., Kukharskiy M.S. Dimebon stimulates activation of autophagy-related events in cell culture. «Эффективные инструменты современной науки - 2012», 27 апреля – 5 мая 2012 года, г. Прага, Чехия. С.17-20.
 8. Разинская О.Д., Тарасова Т.В., Лыткина О.А., Кухарский М.С., Смирнов А.П., Ковражкина Е.А. Анализ сыворотки крови пациентов с БАС на присутствие аутоантител к потенциально амилоидогенному белку гамма-синуклеину, «Медицинские основы жизнедеятельности организма в норме, патологии и эксперименте», 5-6 сентября 2012 года, г. Омск.
 9. Bachurin S., Ninkina N., Peters O., Kukharsky M., Khritankova I., Sokolov V., Aksinenko A., Buchman V. Dimebon and its Derivates Ameliorate Pathology in TauP301S Transgenic Mice. The 11th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Disease 2013, March 6-10, Florence, Italy.
 10. Razinskaya O.D., Smirnov A.P., Ovchinnikov R.K., Bronovitsky E., Kukharsky M.S., Kovrazhkina E.A. Analysis of C9ORF72 locus in ALS patients in Moscow population, «11th ENCALS Meeting 2013», 31st May to 2nd June, Sheffield, United Kingdom.
 11. Ninkina N., Peters O., Kukharsky M. S., Bachurin S. O. and Buchman V. L. Selective effect of gamma-carbolines on various types of proteinopathies, «VI Neurotoxicity Society Meeting: Mechanisms of neurodegenerative disorders», 21-24 March 2013, Valdivia, Chile.
 12. Кухарский М.С., Тарасова Т.В., Овчинников Р.К., Бачурин С.О. Ингибирование нейродегенеративного процесса в трансгеномной модели таупатии под действием Димебона. XIX Межгородская конференция молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии», 10-11 апреля 2013, Санкт-Петербург. С. 71-72.