

© Коллектив авторов, 2013 г.
УДК 615.857.064.14:575

**О. И. Большакова, Д. И. Родин,
С. И. Тимошенко, Е. М. Латыпова,
С. В. Саранцева**

ВЛИЯНИЕ НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ВЫЖИВАЕ- МОСТЬ И НЕЙРОДЕГЕНЕРА- ЦИЮ В МОЗГЕ ТРАНСГЕННЫХ *DROSOPHILA MELANOGASTER* С ГИПЕРЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА APP ЧЕЛОВЕКА

Санкт-Петербургский институт ядерной физики имени Б. П. Константинова, г. Гатчина

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (БА) — наиболее часто встречающееся нейродегенеративное заболевание лиц пожилого возраста, основными клиническими проявлениями которого являются потеря памяти, распад психической и интеллектуальной деятельности человека. К основным нейроморфологическим маркерам заболевания относят наличие внутриклеточных нейрофибриллярных клубков, экстраклеточных сенильных бляшек, число которых увеличивается с возрастом, нейродегенерацию преимущественно в гиппокампе и коре головного мозга [2]. Амилоидный пептид β (A β), составляющий основу сенильных бляшек, является нормальным растворимым метаболитом в организме человека и образуется вследствие протеолитического разрезания большого трансмембранного белка-предшественника амилоида (APP) двумя протеазами — β - и γ -секретазами. Как полагают, при БА в большей степени начинает образовываться наиболее склонная к агрегации форма A β , состоящая из 42 аминокислот. В связи с этим основные стратегии разработки лекарственной терапии для БА связаны с поиском препаратов, способных уменьшить образование A β . К сожалению, до настоящего времени попытки антиамилоидогенной терапии не привели к успеху и сопровождались серьезными побочными эффектами. Следовательно, необходим поиск препаратов, модулирующих другие стороны патогенетического процесса, например, нейродегенерацию.

Никотиновая кислота (ниацин, витамин B₃, витамин PP) участвует во многих окислительных реакциях в клетке и широко используется в клинической практике более 40 лет [6]. Недостаток ниацина в организме человека приводит к развитию пеллагры, для которой характерны, в том числе, за-

медленное мышление, потеря памяти. Немногочисленные исследования показывают положительный эффект применения никотиновой кислоты для предупреждения когнитивного дефицита при БА [10].

Цель работы: исследовать влияние никотиновой кислоты на выживаемость и нейродегенерацию *Drosophila melanogaster* с гиперэкспрессией гена APP человека.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были использованы трансгенные линии *Drosophila melanogaster*: *UAS-APP*, содержащая ген APP человека; *UAS-APP-Swedish*, содержащая ген APP человека с мутацией *Swedish*, приводящей к наследственной форме болезни Альцгеймера; *UAS-BACE*, содержащая ген β -секретазы человека. Экспрессия трансгенов была проведена в системе *UAS-GAL4*. В качестве активатора транскрипции был использован драйвер *GAL4-elav^{c155}*, обеспечивающий экспрессию генов в нервных клетках *Drosophila*. Линии были получены из коллекции *Drosophila Bloomington Stock Center*, США. Мухи содержались на стандартной дрожжевой среде при температуре 25 °C при 12-часовом световом дне. Никотиновую кислоту в концентрации 10 мМ добавляли в корм животным.

Для оценки выживаемости мух помещали в пробирки по 30 штук. Каждые 2-е суток их пересаживали на свежий корм. Одновременно производили подсчет умерших особей. В каждом эксперименте было не менее 300 мух. Каждый из вариантов эксперимента включал в себя 3 повтора.

Уровень нейродегенерации определяли на парафиновых срезах мозга, как описано ранее [13].

Статистический анализ проводили с помощью программы «ANOVA» и критерия множественных сравнений Тьюки — Крамера (программа «Kuplot»). Статистическая значимость учитывалась при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование молекулярных механизмов, лежащих в основе патогенеза нейродегенеративных заболеваний, невозможно без создания моделей заболевания на животных, так как в исследованиях, проводимых *in vitro*, не всегда возможно воспроизвести условия целого организма. В последнее время в качестве модели для изучения нейродегенеративных заболеваний, в частности, БА, используют *Drosophila melanogaster* [4]. Это во многом связано с существованием эволюционного консерватизма между генами человека и дрозофилы. Кроме того, *Drosophila* имеет хорошо развитую центральную нервную систему и поведенческие реакции (обучение и память), что позволяет исследовать ранние эффекты, связанные с нарушением поведения

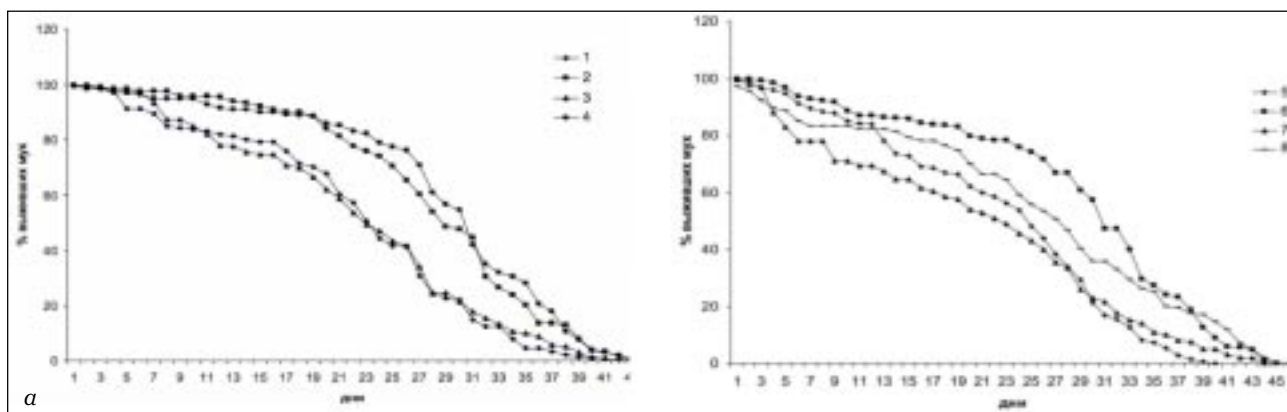
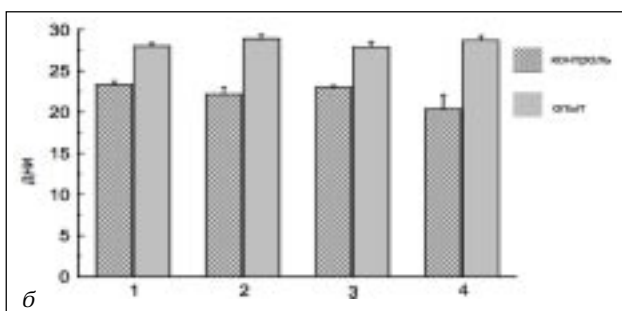


Рис. 1. Влияние никотиновой кислоты на выживаемость трансгенных мух: *a* – кривые выживаемости *Drosophila melanogaster*; 1 – elav; APP/BACE; 2 – elav; APP/BACE + ниацин; 3 – elav; BACE/APP-Sw; 4 – elav; BACE/APP-Sw + ниацин; 5 – elav; APP; 6 – elav; APP + ниацин; 7 – elav; APP-Sw; 8 – elav; APP-Sw + ниацин; *б* – влияние никотиновой кислоты на 50 %-ю выживаемость трансгенных *Drosophila melanogaster*. По оси абсцисс – генотипы линий: 1 – elav, APP; 2 – elav, APP-SW; 3 – elav, APP/BACE, 4 – elav, BACE/APP-SW. Различия средних величин статистически достоверны ($p < 0,05$)



и памяти при экспрессии мутантных генов, вызывающих наследственные формы БА. В то же время *Drosophila* является простой и удобной моделью для изучения терапевтических свойств различных соединений [11].

Ген *Appl Drosophila melanogaster*, ортолог гена APP человека, не содержит последовательности, кодирующей Аβ. В то же время у *Drosophila* представлены все компоненты белкового комплекса, ответственного за активность γ-секретазы, но отсутствует или является необычайно низкой активностью β-секретазы. Поэтому для генерации Аβ необходимы двойные трансгены, экспрессирующие BACE и полноразмерный APP человека. Это обстоятельство дает возможность разделения эффектов APP и Аβ, при котором достаточно сравнить трансгены APP, содержащие и не содержащие BACE.

Мы провели экспрессию гена APP человека, гена APP с мутацией *Swedish*, а также одновременную экспрессию APP(APP-Sw) и BACE в нервных клетках *Drosophila* и проанализировали кривые выживаемости этих мух. Полученные данные показаны на рис. 1. Продолжительность жизни мух с гиперэкспрессией APP(APP-Sw), а также совместно APP(APP-Sw) и BACE не имела больших различий. Мы не увидели существенного увеличения продолжительности жизни при кормлении мух никотиновой кислотой. В то же время при кормлении никотиновой кислотой наблюдалось изменение формы кривых выживаемости, а именно – появление «плеча», что свидетельствует об уменьшении гибели молодых мух. Кроме того, во всех исследованных

линиях мы наблюдали достоверное увеличение 50 %-й выживаемости: в линиях elav; APP и elav; APP-Sw – на 18 – 30 %, а в линиях elav; APP/BACE и elav; BACE/APP-Sw – на 18 – 23,5 % соответственно. В то же время мы не наблюдали различий между мухами с гиперэкспрессией APP(APP-Sw), а также совместно APP(APP-Sw) и BACE.

При гиперэкспрессии гена APP человека в нервных клетках *Drosophila* на 15-й день жизни животных наблюдалась нейродегенерация в мозге, которая проявлялась в виде полостей различного диаметра и увеличивалась с возрастом [13]. На рис. 2

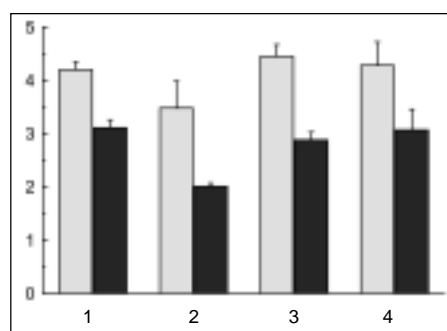


Рис. 2. Влияние никотиновой кислоты на уровень нейродегенерации в мозге мух с гиперэкспрессией APP: по оси ординат – процент нейродегенерации; по оси абсцисс – генотипы линий: 1 – elav; APP; 2 – elav; APP-Sw; 3 – elav; APP/BACE; 4 – elav; BACE/APP-Sw. Различия средних величин по отношению к контролю статистически достоверны ($p < 0,05$)

приведены данные об уровне нейродегенерации в мозге мух через 30 дней после начала эксперимента. Из рисунка следует, что площадь вакуолей в нейроне центрального мозга и оптических долях достоверно ниже в опыте, чем в контроле. В линиях elav; APP/BACE и elav; BACE/APP-Sw уровень нейродегенерации снизился на 27–37 %, а в линиях elav; APP и elav; APP-Sw — на 40–45 %.

Таким образом, применение никотиновой кислоты значительно повышало 50 %-ю выживаемость и несколько увеличивало продолжительность жизни. Наличие «плеча» на кривой выживаемости подопытных животных говорит об эффективности используемого препарата. Оно свидетельствует об улучшении качества жизни животного и дает возможность использования дополнительной терапии в этот временной промежуток. Снижение уровня нейродегенерации у исследованных линий дрозофилы подтверждает нейропротекторные свойства никотиновой кислоты. Следует отметить, что имеющиеся в литературе данные о терапевтических свойствах ниацина в основном касаются его применения для профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний [8], и лишь несколько исследований посвящены возможности его использования для лечения когнитивных нарушений, в частности, при БА [9, 10]. В то же время большое количество работ посвящено никотинамиду. Механизм действия никотинамида, как полагают, обусловлен его свойством ингибировать белки сиртуины, которые являются гистоновыми деацетилазами. Нейропротекторные свойства ингибиторов деацетилаз гистонов показаны на моделях БА [12], рассеянного склероза [1], ишемического инсульта [7] и при травмах мозга различной природы [3].

Исследования, проведенные на модели болезни Паркинсона на *Drosophila melanogaster*, показали, что добавление больших доз никотинамида в пищу уменьшает окислительно-восстановительный стресс и улучшает моторные функции животных [5]. Полученные нами данные показывают нейропротекторный эффект никотиновой кислоты на модели БА *Drosophila melanogaster*. Мы полагаем, что в его основе также лежит снижение окислительно-восстановительного стресса, развитие которого сопровождает БА. Хотя полученные результаты должны быть подкреплены данными по использованию никотиновой кислоты на моделях нейродегенеративных заболеваний, в частности, БА, на других животных, мы предполагаем, что использование ниацина может способствовать снижению нейродегенеративных изменений при БА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gray S. G., Dangond F. Rationale for the use of histone deacetylase inhibitors as a dual therapeutic modality in multiple sclerosis // *Epigenetics*. — 2006. № 1 (2). — P. 67–75.

2. Haass C., Schlossmacher M. G., Hung A. Y. et al. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism // *Nature*. — 1992. — № 359. — P. 322–325.

3. Hoane M. R., Tan A. A., Pierce J. L. et al. Nicotinamide treatment reduces behavioral impairments and provides cortical protection after fluid percussion injury in the rat // *J. Neurotrauma*. — 2006. — № 23 (10). — P. 1535–1548.

4. Jeibmann A., Paulus W. *Drosophila melanogaster* as a Model Organism of Brain Diseases // *Int. J. Mol. Sci.* — 2009. — № 10. — P. 407–440.

5. Jia H., Li X., Gao H. et al. High doses of nicotinamide prevent oxidative mitochondrial dysfunction in a cellular model and improve motor deficit in a *Drosophila* model of Parkinson's disease // *J. Neurosci. Res.* — 2008. — № 86 (9). — P. 2083–2090.

6. Knip M., Douek I. F., Moore W. P. et al. European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial Group. Safety of high-dose nicotinamide: a review // *Diabetologia*. — 2000. — № 43 (11). — P. 1337–45.

7. Liu D., Gharavi R., Pitta M. et al. Nicotinamide Prevents NAD⁺ Depletion and Protects Neurons Against Excitotoxicity and Cerebral Ischemia: NAD⁺ Consumption by SIRT1 may Endanger Energetically Compromised Neurons // *Neuromolecular Med.* — 2009. — № 11 (1). — P. 28–42.

8. MacKay D., Hathcock J., Guarneri E. Niacin: chemical forms, bioavailability, and health effects // *Nutr. Rev.* — 2012. — № 70 (6). — P. 357–366.

9. Morris M. C., Evans D. A., Bienias J. L. et al. Dietary niacin and the risk of incident Alzheimer's disease and of cognitive decline // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. — 2004. — № 75 (8). — P. 1093–1099.

10. Morris M. C., Schneider J. A., Tangney C. C. Thoughts on B-vitamins and dementia // *J. Alzheimers. Dis.* — 2006. — № 9 (4). — P. 429–433.

11. Pandey U. B., Nichols C. D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery // *Pharmacol. Rev.* — 2011. — № 63 (2). — P. 411–436.

12. Ricobaraza A., Cuadrado-Tejedor M., Perez-Mediavilla A. et al. Phenylbutyrate Ameliorates Cognitive Deficit and Reduces Tau Pathology in an Alzheimer's Disease Mouse Model // *Neuropsychopharmacology*. — 2009. — № 34. — P. 1721–1732.

13. Sarantseva S., Timoshenko S., Bolshakova O. et al. Apolipoprotein E-mimetics inhibit neurodegeneration and restore cognitive functions in a transgenic *Drosophila* model of Alzheimer's disease // *PLoS One*. — 2009. — № 4 (12). — P. 8191.

РЕЗЮМЕ

О. И. Большакова, Д. И. Родин, С. И. Тимошенко, Е. М. Латыпова, С. В. Саранцева

Влияние никотиновой кислоты на выживаемость и нейродегенерацию в мозге трансгенных *Drosophila melanogaster* с гиперэкспрессией гена APP человека

На трансгенных линиях *Drosophila melanogaster*, воспроизводящих основные нейроморфологические признаки болезни Альцгеймера, исследованы нейропротекторные свойства никотиновой кислоты. Показано, что никотиновая кислота увеличила выживаемость всех исследованных линий и снизила уровень нейродегенерации в мозге 30-дневных мух.

Ключевые слова: никотиновая кислота, дрозофила, болезнь Альцгеймера.

SUMMARY

O. I. Bolshakova, D. I. Rodin, S. I. Timoshenko,
E. M. Latypova, S. V. Sarantseva

Effect of nicotinic acid on the survival rate, and neurodegeneration of transgenic *Drosophila melanogaster* with overexpression of human APP gene

Transgenic *Drosophila melanogaster* lines modeling the main neuromorphological markers of Alzheimer's disease were used to study the neuroprotective properties of nicotinic acid. Thirty days old flies treated with nicotinic acid showed better survival rate and reduced neurodegeneration.

Key words: nicotinic acid, *Drosophila melanogaster*, Alzheimer's disease.

© В. Н. Очколяс, 2013 г.
УДК [616.83]-005.1-06:616.831.31-009.24]-08.739.6

В. Н. Очколяс

ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ АМРА-РЕЦЕПТОРОВ ГЛЮТАМАТА ПРИ УЛУЧШЕНИИ МОЗГОВОГО КРОВОТОКА В БАСЕЙНЕ ВНУТРЕННЕЙ СОННОЙ АРТЕРИИ У БОЛЬНЫХ С ПОСТИНСУЛЬТНОЙ ЭПИЛЕПСИЕЙ

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова

ВВЕДЕНИЕ

Снижение мозгового кровотока при острой церебральной ишемии вследствие стеноза или окклюзии брахиоцефальных артерий при отсутствии структурных и функциональных механизмов компенсации мозгового кровотока приводит к функциональной и аноксической деполяризации нейронов в пораженном сосудистом бассейне [7]. Основным патогенетическим механизмом формирования ишемического очага при критическом снижении мозгового кровотока является феномен эксайтотоксичности [15]. Данный патогенетический механизм реализуется через глутамат-кальциевый каскад: избыточное высвобождение глутамата из окончаний ишемизированных нейронов в межклеточное пространство и синаптическую щель приводит к активации и последующей альтерации NMDA- (N-methyl-D-aspartate) и АМРА- (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) рецепторов глутамата [9, 11].

Согласно современным представлениям о механизмах эпилептогенеза, в основе эпилептического разряда лежит формирование пароксизмального деполяризационного сдвига (ПДС) мембранного потенциала [13]. Большая роль в формировании ПДС отводится ионным каналам натрия и кальция АМРА-рецепторов глутамата [1, 2, 4, 14].

По данным аналитических работ, оперирующих большим количеством клинических наблюдений, у лиц старше 60 лет развитие эпилептических приступов в 30 % случаев связано с нарушением мозгового кровообращения [10, 12]. Частота встречаемости постинсультной эпилепсии составляет от 4,12 до 9,8 % [5, 6].

Целью исследования является изучение особенностей альтерации и темпа восстановления АМРА-рецепторов глутамата у больных с постинсультной эпилепсией в условиях улучшения кровотока в бассейне внутренней сонной артерии (ВСА).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследованы 92 больных с ишемической болезнью головного мозга, оперированных по поводу гемодинамически значимых стенозов ВСА в отделении сердечно-сосудистой хирургии городской больницы № 26 Санкт-Петербурга. Мужчин было 70 (76,1 %), женщин – 22 (23,9 %). Возраст больных варьировал от 36 до 74 лет, средний возраст – $58,5 \pm 8,1$ года. Исследуемую группу составили 8 (8,7 %) больных, в клинической картине заболевания которых регистрировались эпилептические приступы, контрольную – 84 (91,3 %) больных, у которых эпилептических приступов не наблюдалось.

Больные обследованы в рамках диагностического комплекса, включающего оценку соматического и неврологического статуса ($n = 92$), КТ ($n = 50$), МРТ с МР-ангиографией ($n = 42$), УЗДГ с определением параметров цереброваскулярной реактивности ($n = 92$), дуплексное сканирование ($n = 38$), ЭЭГ ($n = 42$), церебральную ангиографию ($n = 92$).

Больным была произведена каротидная эндартерэктомия (КЭАЭ) по классической и эверсионной методике [8]. Время пережатия ВСА составило $35,42 \pm 0,69$ мин при классической КЭАЭ и $33,82 \pm 0,63$ мин при эверсионной КЭАЭ.

Достоверных различий в группах по полу, возрасту, стороне поражения, тактике и технике оперативных вмешательств не выявлено.

В качестве оценки степени альтерации АМРА-рецепторов глутамата использован иммуноферментный метод полуколичественного определения уровня аутоантител в периферической крови (ААТ) к GluR1-субъединице АМРА-рецепторов (GluR1) –