

СОДЕРЖАНИЕ

Том 38, номер 4, 2021

Методы геномного редактирования в нейробиологии и нейромедицине: возможности и практическое применение (спецвыпуск)

Редакторы А. П. Большаков и М. Ю. Степаничев

Обзоры

Проблемы технологий геномного редактирования и трансгеноза <i>А. П. Большаков</i>	291
Технология геномного редактирования для исследования и коррекции нейродегенеративных заболеваний <i>И. А. Гривенников, В. З. Тарантул</i>	298
Создание и исследование клеточных моделей наследственных нейродегенеративных заболеваний с помощью направленного редактирования геномов <i>С. П. Медведев, Т. Б. Маланханова, К. Р. Валетдинова, С. М. Закиян</i>	313
Редактирование эпигенома при нейродегенеративных заболеваниях <i>А. С. Ветчинова, Е. Ю. Федотова, С. Н. Иллариошкин</i>	320
Использование геномного редактирования для терапии болезни Альцгеймера: от эксперимента к клинике <i>М. Ю. Степаничев</i>	329
Ген <i>SLC6A1</i> и психоневрологические заболевания: роль мутаций, перспективы лечения при помощи систем редактирования генома <i>Е. С. Букина, Н. В. Кондратьев, С. В. Козин, В. Е. Голимбет, А. С. Артюхов, Э. Б. Дашиинимаев</i>	339

Экспериментальные работы

Доставка CRISPR–Cas9 в виде рибонуклеопротеиновых комплексов повышает эффективность редактирования <i>EGFP</i> <i>Я. С. Слесаренко, А. Г. Быконя, А. А. Анучина, М. И. Зайнитдинова, Н. А. Евтушенко, А. В. Лавров, С. А. Смирнихина</i>	355
--	-----

Регулярные статьи

Обзоры

Токсические поражения двигательных нейронов <i>М. Н. Захарова, И. С. Бакулин, А. А. Абрамова</i>	364
---	-----

Экспериментальные работы

Нейрохимические и поведенческие эффекты олигомеров альфа-синуклеина у мышей трехмесячного возраста <i>В. В. Шерстнев, М. А. Грудень, О. А. Соловьева, В. С. Кудрин, В. Б. Наркевич, Н. П. Михайлова, А. М. Ратмиров</i>	378
---	-----

Клиническая нейрохимия

Сравнительная оценка нейрохимических показателей у пациентов с профессиональной патологией, обусловленной воздействием физических и химических факторов <i>Г. М. Бодиенкова, Е. В. Боклаженко</i>	385
---	-----

Contents

Vol. 38, no. 4, 2021

Genomic Editing Methods in Neurobiology and Neuromedicine: Possibilities and Practical Application (Special Issue)

Eds. A. P. Bolshakov and M. Yu. Stepanichev

Review Articles

Problems of Technologies of Genomic Editing and Transgenesis <i>A. P. Bolshakov</i>	291
Genome Edition Technology for the Study and Correction of Neurodegenerative Diseases <i>I. A. Grivennikov, V. Z. Tarantul</i>	298
Creation and Research of Hereditary Neurodegenerative Diseases Cell Models Using Directed Genome Editing <i>S. P. Medvedev, T. B. Malankhanova, K. R. Valetdinova, and S. M. Zakian</i>	313
Editing the Epigenome in Neurodegenerative Diseases <i>A. S. Vetchinova, E. Yu. Fedotova, and S. N. Illarioshkin</i>	320
Using Genome Editing for Alzheimer's Disease Therapy: From Experiment to Clinic <i>M. Yu. Stepanichev</i>	329
<i>SLC6A1</i> and Neuropsychiatric Diseases: The Role of Mutations, Prospects for Treatment with Genome Editing Systems <i>E. S. Bukina, N. V. Kondratiev, S. V. Kozin, V. E. Golimbet, A. S. Artyuhov, and E. B. Dashinimaev</i>	339

Experimental Articles

CRISPR–Cas9 Delivery Via the Ribonucleoprotein Complexes Increased <i>EGFP</i> Editing Efficiency <i>Ya. S. Slesarenko, A. G. Bykonya, A. A. Anuchina, M. I. Zaynitdinova, N. A. Evtushenko, A. V. Lavrov, S. A. Smirnikhina</i>	355
---	-----

Regular Articles

Review Articles

Toxin-Induced Motor Neuron Injury <i>M. N. Zakharova, I. S. Bakulin, and A. A. Abramova</i>	364
--	-----

Experimental Articles

Neurochemical and Behavioral Effects of Alpha-Synuclein Oligomers in Mice of Three Months Age <i>V. V. Sherstnev, M. A. Gruden, O. A. Solovieva, V. S. Kudrin, V. B. Narkevich, N. P. Mikhailova, and A. M. Ratmirov</i>	378
---	-----

Clinical Neurochemistry

Comparative Assessment of Neurochemical Indicators in Patients with Occupational Pathology Due To Physical and Chemical Factors <i>G. M. Bodienkova and E. V. Boklazhenko</i>	385
--	-----

ПРОБЛЕМЫ ТЕХНОЛОГИЙ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ И ТРАНСГЕНЕЗА

© 2021 г. А. П. Большаков*

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук, Москва, Россия

Поступила в редакцию 20.05.2021 г.

После доработки 23.05.2021 г.

Принята к публикации 24.05.2021 г.

В работе коротко суммированы проблемы, возникающие при работе с системами трансгеноза на основе рекомбиназ, а также CRISPR/Cas9. Освещены ряд недавних результатов, касающихся возможных эффектов, индуцируемых тамоксифеном и доксициклином — агентами, которые широко используются для регуляции экспрессии генов в трансгенных животных с индуцибельной экспрессией генов. Согласно этим данным, всегда существует вероятность эктопической тамоксифен-независимой экспрессии трансгена и в настоящее время не всегда можно предсказать, где она будет наблюдаться и насколько это может повлиять на финальную картину экспрессии генов. Схожая картина наблюдается с использованием доксициклин-зависимых систем, когда “неспецифические” эффекты доксициклина просто игнорируются. В работе поднимается вопрос о необходимости проведения контрольных экспериментов, учитывающих развитие возможных побочных эффектов, связанных как с использованием модуляторов экспрессии генов, так и самих систем, изменяющих геном, либо разработке альтернативных подходов.

Ключевые слова: рекомбиназа, CRISPR/Cas9, тамоксифен, доксициклин

DOI: 10.31857/S1027813321040038

Технологии редактирования генома (ТРГ) получили активное развитие в последние десятилетия благодаря применению CRISPR/Cas9 системы для редактирования генома. Важность внедрения данной системы была подчеркнута вручением Дж. Дудна и Э. Шарпантье Нобелевской премии по химии в 2020 году. Однако, несмотря на безусловную значимость созданной технологии, геномное редактирование с самого начала вызывало серьезные вопросы, как у исследователей и разработчиков технологий, так и у обывателей. Одной из сложно разрешимых проблем, касающихся ТРГ, остается проблема, связанная с отсутствием нашего четкого понимания последствий применения ТРГ, а также того, в каких случаях необходимо использование ТРГ при работе с животными и, особенно, человеком. Эта проблема порождает еще одну — тесно связанную с ней — отсутствие четкой методологической базы, обосновывающей то, как, с какой целью и с использованием каких контролей должно проводиться исследование, в котором применяются ТРГ.

Создание нокаутной мыши в 1990 году [1, 2] породило бум использования трансгенных животных (преимущественно мышей) в исследова-

тельских целях, и сейчас практически невозможно встретить научные работы по физиологии и биохимии в высокорейтинговых журналах без использования трансгенных животных. Изначально идея нокаута гена предполагала, что удаление гена целиком или его части или его замена на другой ген (например, ген резистентности к эукариотическому антибиотику) поможет понять функцию, выполняемую нокаутируемым геном. Однако дальнейшие исследования показали, что подобный подход дает результаты, которые не всегда можно легко интерпретировать. Во-первых, нокаут гена может оказаться летальным уже на стадии эмбриогенеза. Во-вторых, один и тот же ген может быть вовлечен во множество процессов в разных клеточных субпопуляциях, и не всегда очевидно, нокаут в какой из субпопуляций оказал наиболее существенный физиологический эффект. В этом случае оказывается важной именно “прицельность” нокаута, когда нокаут производится именно в целевой субпопуляции клеток в желаемом органе, а не во всем геноме животного в целом. В-третьих, замена гена или удаление гена может иметь свои плохо предсказуемые последствия, поскольку это будет изменять укладку хроматина в районе целевого гена и, как следствие, изменять регуляцию соседних генов [3]. В-четвертых, удаленный ген мог экспрессироваться

* Адресат для корреспонденции: 117485 Россия, Москва, ул. Бутлерова 5а, e-mail: ocrachek@yahoo.com.

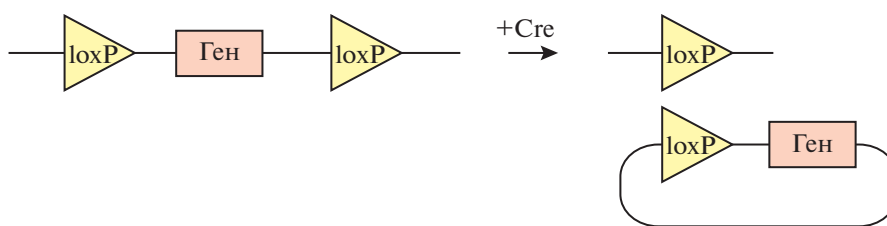


Рис. 1. Схема функционирования Cre рекомбиназы при удалении фрагмента генома. Фрагмент гена фланкирован loxP последовательностями. Экспрессия Cre рекомбиназы под специфическим промотором в целевой клеточной субпопуляции приводит к рекомбинации и удалению из генома последовательности, фланкированной loxP сайтами.

в различных клеточных субпопуляциях на разных стадиях онтогенеза, что также может порождать неопределенность в интерпретации получаемых данных.

Все или, по крайней мере, большинство этих проблем “удалось преодолеть” с использованием условного нокаута (conditional knockout), когда происходит изменение целевого участка ДНК животного только в целевой субпопуляции клеток в желаемый промежуток времени. Однако создание условного нокаута, как таковое, в большинстве случаев является результатом скрещивания трансгенных животных, несущих некоторые целевые мутации (рекомбиназы под целевым промотором или сайты рекомбинации) или введения вирусов, несущих рекомбиназу, трансгенным животным, имеющим сайты рекомбинации в целевых местах генома (рис. 1). Независимо от подхода, для того чтобы предотвратить преждевременную и неселективную экспрессию рекомбиназы, эта экспрессия делается зависимой от дополнительных веществ. Зачастую создание условного нокаута основано на использовании трансгенных животных, у которых в геном вставлен ген рекомбиназы (из бактериофагов или дрожжей). Экспрессия этого гена регулируется либо антибиотиком доксициклином (за счет наличия сайта посадки тетрациклинового активатора либо репрессора в промоторе рекомбиназы), либо тамоксифеном (модулятор эстрогеновых рецепторов, связывающийся с мутантным эстрогеновым рецептором), в отсутствие которого рекомбиназа не может попасть ядро клетки и запустить рекомбинацию. Важно отметить, что использование систем на основе рекомбиназ позволяет выполнять не только нокаут генов, но и нок-ин за счет двойного фланкирования целевой последовательности гена разными loxP последовательностями.

ПРОБЛЕМЫ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАЗ

Несмотря на возможность использования животных с условным трансгенезом, большой популярностью также пользуются животные, у которых экспрессия/локализация рекомбиназы не регу-

лируется дополнительными агентами. Широко используются животные селективно экспрессирующие Cre или Flp рекомбиназы в некоторых субпопуляциях клеток либо за счет экспрессии рекомбиназы под соответствующим промотором либо за счет добавления в маркерный ген клеточной субпопуляции последовательности несущей IRES (internal ribosome entry site) и ген рекомбиназы (см. детали [4]). Известно, что для получения целевого нокаута необходимо провести последовательное скрещивание животных, несущих рекомбиназу (например, Cre|wt/wt), с животными, у которых целевой ген на обоих гомологичных хромосомах фланкирован loxP сайтами¹ (flox/flox). В результате первого скрещивания будет получен частичный нокаут (Cre|wt/flox), который после скрещивания с flox/flox животными даст потомство, у которого произойдет желаемый нокаут целевого фрагмента генома в обеих хромосомах (Cre|flox/flox) (рис. 2a). Коротко отметим здесь, что в ряде случаев рекомбинация может произойти у Cre|wt/flox животных в гаметах, несмотря на наличие специфического промотора [4], и, в результате, нокауту гена на одной хромосоме не только в целевых клетках, но во всех клетках организма. Как видно из описанной схемы, получение нокаута вовлекает использование ряда трансгенных животных, что усложняет не только получение трансгенных животных с нокаутом в целевых клетках, но и интерпретацию полученных на этих животных данных.

Важно отметить, что внесение рекомбиназы в геном не всегда столь безобидно, как может показаться на первый взгляд. Для ряда линий, несущих Cre показано, что фенотип таких животных может существенно меняться, приводя к изменениям в гормональном фоне, способности к обучению и т.д. [5–8]. Несмотря на это, в некоторых исследованиях такие линии продолжают использоваться, при этом в ряде случаев в качестве контроля берут не животных, несущих ген рекомбиназы без удаления целевого гена, но животных, несущих фланкированную loxP сайтами последовательность, хотя необходимость подобного кон-

¹ В случае Flp рекомбиназы должны присутствовать frr сайты.

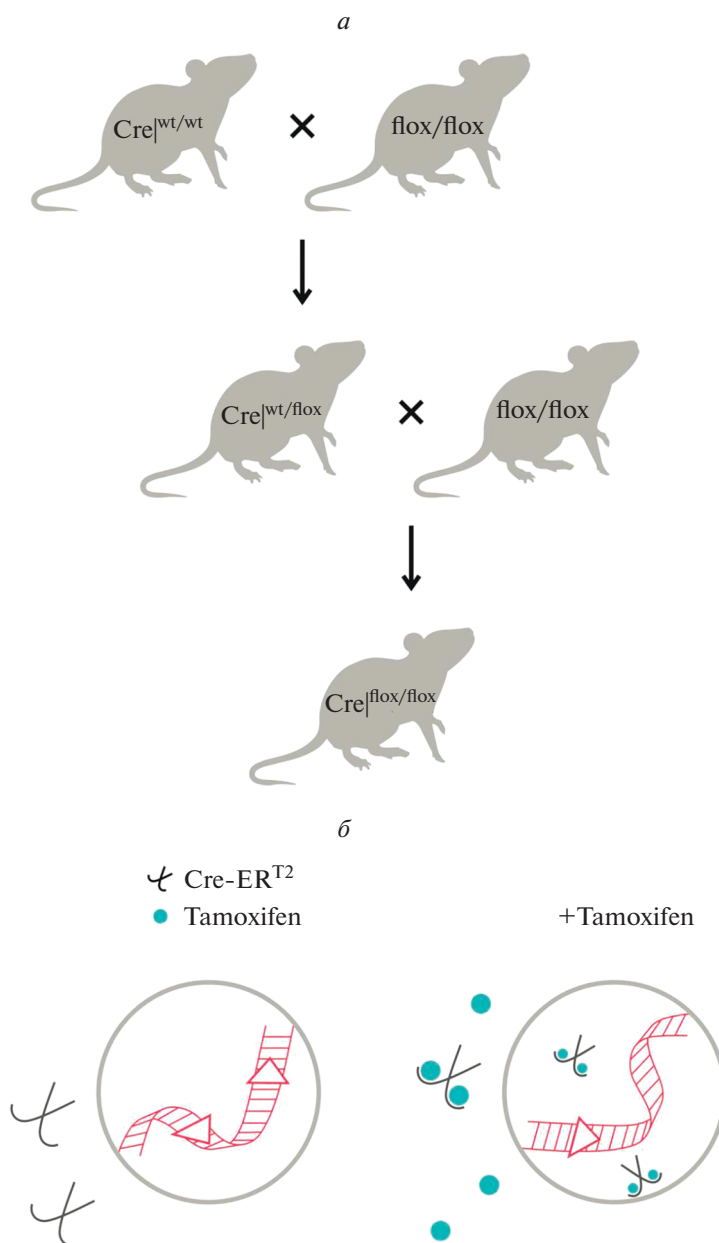


Рис. 2. Получение нокаута в животных, экспрессирующих Cre-рекомбиназу. (а) Получение нокаута целевого гена, фланкированного loxP сайтами (flox/flox) предполагает последовательное скрещивание трансгенных животных, несущих Cre рекомбиназу под промотором целевой клеточной субпопуляции и целевой ген дикого типа на обеих хромосомах (wt/wt) и животных, не экспрессирующих Cre рекомбиназу, но целевой ген (или его фрагмент) в которых фланкирован loxP сайтами. Часть их потомства будет иметь генотип Cre|wt/flox, который при последующем скрещивании с flox/flox животными даст желаемый генотип Cre|flox/flox с нокаутом в целевой клеточной субпопуляции. (б) Тамоксифен-зависимая система рекомбинации (Cre-ER^{T2}) включает в себя экспрессионную кассету с Cre-рекомбиназой под промотором, активным в целевой клеточной субпопуляции, фланкированной мутантным эстрогеновым рецептором, чувствительным к тамоксифену. В отсутствие тамоксифена Cre рекомбиназа не может попасть в ядро (слева); при добавлении тамоксифена происходит связывание этого лиганда с эстрогеновыми рецепторами, связанными с рекомбиназой, после чего Cre может проникнуть в ядро и индуцировать нокаут целевой последовательности в геноме.

троля всегда подчеркивалась [9]. Получаемые результаты говорят о том, что фактически в настоящий момент мы не можем предсказать последствий внесения изменений в геном, даже когда вносятся, казалось бы, хорошо описанные генетические

инструменты, такие как рекомбиназы или loxP сайты, и необходимы дополнительные контроли для экспериментов, проводимых с их использованием. В настоящий момент, к сожалению, до конца не ясно, какие животные из указанного выше набора

(Cre|wt/wt, Cre|wt/flox, flox/flox, wt/wt) должны выступать в качестве контрольных для нокаута Cre|flox/flox, однако, во избежание ошибочной интерпретации результатов исследование должно включать всех указанных трансгенных животных.

ПРОБЛЕМЫ С ТАМОКСИФЕН-ЗАВИСИМОЙ “ЦЕЛЕВОЙ” ЭКСПРЕССИЕЙ CRE-РЕКОМБИНАЗЫ

Внедрение новых подходов породило ряд новых проблем, которые начали проявляться только в последнее время за счет использования новых технологий. Изначально предполагалось, что использование тамоксифен-зависимой системы позволяет запускать экспрессию рекомбиназы тогда, когда это необходимо и, казалось бы, должно предотвратить эктопическую экспрессию, а короткое применение тамоксифена не будет иметь последствий, кроме активации экспрессии рекомбиназы (рис. 2б). Оказалось, что, несмотря на первичные данные об отсутствии значимого влияния тамоксифена [10, 11], его использование также оказывает дополнительные эффекты и необходимо их учитывать при интерпретации результатов, полученных на трансгенных животных [12]. Проблема также оказалась в том, что у мышей различных линий скорость метаболизма и выведения тамоксифена разная и зависит от возраста [13], что может влиять на эффективность тамоксифен-зависимой рекомбинации у мышей с разным генотипом, а также влиять на длительность побочных эффектов самого тамоксифена. Было показано, что тамоксифен может вызывать изменения в поведении мышей в разных поведенческих тестах [14]. Одним из возможных механизмов, лежащих в основе эффекта тамоксифена, могут быть изменения в Wnt-Dmtra2 сигнальном пути и, как следствие, ослабление пролиферации нейрональных стволовых клеток и нейрогенеза в зубчатой фации гиппокампа и субвентрикулярной зоне [15]. Проблема также заключается в том, что тамоксифен не обладает универсальным эффектом во всех тканях в том смысле, что во всех клетках он связывается с альфа и бета эстрогеновыми рецепторами и способен вытеснять естественные эстрогены, однако, в зависимости от типа клеток, он может, как активировать, так и ингибировать эстрогеновые рецепторы и, соответственно, либо активировать, либо подавлять экспрессию генов, если она регулируется эстрогеновыми рецепторами. Оба типа эстрогеновых рецепторов экспрессируются в клетках мозга [16, 17], однако, какие эффекты, связанные с модуляцией экспрессии генов, тамоксифен вызывает в разных типах клеток мозга остается по большому счету неизвестным. В то же время было показано, что тамоксифен способен модулировать глицинергическую передачу [18], увеличивать число

шипиков на пирамидных нейронах поля СА1 гиппокампа [19] и индуцировать переключение некоторых субпопуляций клеток мозга, включая нейроны зубчатой фации гиппокампа, в стрессовое состояние [20].

Дополнительная проблема тамоксифен-зависимых Cre-систем была обнаружена сравнительно недавно и заключается она в том, что все линии мышей, несущих Cre рекомбиназу, фланкированную мутантным тамоксифен-активируемым эстрогеновым рецептором, экспрессируют Cre рекомбиназу на низком уровне не только в целевых клеточных субпопуляциях, что может приводить к эктопической рекомбинации [21–23]. В результате рекомбинация может происходить в нежелательной клеточной субпопуляции не только при добавлении тамоксифена, но и вообще тамоксифен-независимым образом. В условиях, когда уровень активности Cre рекомбиназы низок, большую роль начинает играть расстояние между LoxP сайтами (чем больше расстояние, тем меньше вероятность рекомбинации) и, возможно, состояние хроматина и геномный контекст, в котором расположена целевая последовательность для рекомбиназы, содержащая LoxP сайты [9]. В настоящее время абсолютно невозможно предсказать, у мышей каких линий и в каких условиях возможна эктопическая рекомбинация. Последнее говорит о том, что эктопическая рекомбинация может происходить абсолютно неконтролируемо в нежелательных клеточных субпопуляциях и вносить свой вклад в результаты, полученные с помощью “целевого” удаления некоторого гена. Казалось бы, достаточно иметь в качестве контроля мышей, которым не вводили тамоксифен, чтобы гарантировать отсутствие ошибки в интерпретации данных, полученных при введении тамоксифена. Однако именно в этом случае непредсказуемость эктопической рекомбинации может привести к неверной интерпретации результатов, когда эктопическая рекомбинация и целевая рекомбинация по-отдельности могут не индуцировать обнаруженного эффекта, а комбинация этих событий, возникающая в мозге животных после инъекции тамоксифена, может вызывать этот эффект. В этом случае упомянутый тамоксифен-независимый “контроль”, оказывается фактически не контролем, а дополнительным типом животных с измененным геномом в некотором типе клеток, и именно наличие этого специфического фона может обеспечивать возникновение физиологического эффекта “целевого” нокаута гена.

В заключении этой части хотелось бы отметить, что проблема использования систем на основе рекомбиназ и тамоксифена заключается не только в том, что исследователи используют эти системы регуляции экспрессии тех или иных генов, а в том, что зачастую в исследованиях мозга и поведения с использованием тамоксифен-зави-

симых систем не делается всех необходимых контрольных экспериментов по выявлению влияния тамоксифена на те параметры, которые изучаются, а также выявления того, в каких клеточных субпопуляциях реально происходят события рекомбинации.

Одним из возможных подходов, который может позволить избежать проблем, связанных с эктопической активностью рекомбиназы, а также упомянутой в предыдущем разделе проблемы, вышеупомянутой проблемы, касающейся последствий добавления гена рекомбиназы в геном, является подход, при котором животным с фланкированной loxP сайтами целевой последовательностью делают стереотаксическую инъекцию рекомбинантных вирусов (лентивирусов или аденоассоциированных), несущих ген рекомбиназы под промотором, характерным для целевой клеточной субпопуляции. Это позволяет избежать ряда вышеописанных неспецифических эффектов, однако, у этого подхода также есть ряд проблем: (1) не для всех клеточных субпопуляций мозга известны достаточно селективные промоторы, хотя их поиск продолжается; и (2) вирусы заражают не все типы клеток с одинаковой эффективностью (например, заражение микроглии до сих пор остается проблемой [24]).

ПРОБЛЕМЫ ТЕТРАЦИКЛИН-ЗАВИСИМЫХ СИСТЕМ

Схожая с тамоксифеном ситуация наблюдается при использовании доксициклина как регулятора тетрациклин-зависимой системы экспрессии генов. В зависимости от того, Tet-on или Tet-off система используется, а также в зависимости от дизайна эксперимента, животные могут получать доксициклин в течение периодов от нескольких дней до нескольких месяцев. Важно отметить, что доксициклин относится к ряду тетрациклиновых антибиотиков, основным механизмом действия которых является ингибирование синтеза белка бактерий за счет нарушения процессинга рибосомальной РНК и накопления в клетках недопроцессированной рРНК [25]. Проблема заключается не только в том, что длительное применение доксициклина будет приводить к сильным изменениям микрофлоры у животных и изменениям функционирования оси “микробиота—кишечник—мозг”, но и в том, что доксициклин может влиять на сборку митохондриальных рибосом и нарушать трансляцию РНК генов, кодируемых митохондриальным геномом [12]. Последнее, в свою очередь, будет сдвигать функционирование клеточной биоэнергетики по всему организму и оказывать влияние не только на те тетрациклин-зависимые системы, которые внесены при генной инженерии, но и буквально на все клетки организма. Однако, несмотря на наличие столь серьезных

дополнительных эффектов, доксициклин продолжает активно использоваться для активации/подавления экспрессии генов и выявления эффектов включения/выключения генов на биохимические и поведенческие показатели без проведения контрольных экспериментов по выявлению возможных эффектов доксициклина. Важно также отметить, что тетрациклин-зависимая система является одной из множества бактериальных систем регуляции транскрипции генов, в которых связывание транскрипционного фактора (репрессора или активатора) с некоторым агентом (тетрациклин, кумат, и т.п.) приводит либо к активации транскрипции целевого гена либо ее репрессии [26]. Поэтому наиболее вероятным решением проблемы, связанной с эффектами доксициклина, может быть создание систем, в которых регуляция транскрипции зависит от других агентов, проникаемых через ГЭБ и не обладающих столь широким спектром действия. Более того, разработка таких инструментов может дать дополнительный толчок к развитию более сложных инструментов для регуляции экспрессии генов, когда за счет внедрения в геном одного животного различных транскрипционных регуляторов можно будет активировать или подавлять экспрессию нескольких генов, вводя комбинации соответствующих агентов. Необходимо отметить, что вместо систем, взятых из бактерий, можно также использовать системы регуляции транскрипции из растений, которые регулируются химическими агентами, либо системы из грибов, активируемые светом [26]. Однако данные системы в настоящее время пока находятся в стадии разработки и пока неясно, насколько их можно будет применять для исследований функций ЦНС.

ПРОБЛЕМЫ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ CRISPR/Cas

Одной из систем редактирования генома, приобретшей большую популярность сегодня, является CRISPR/Cas9, которая может быть использована как для удаления фрагментов генома, так и для внесения мутаций. Однако ее использование в исследованиях ЦНС весьма ограничено в связи с тем, что разрывы и делеции, вносимые системой Crispr плохо регулируются, что приводит к возникновению мозаицизма в клетках, где произошло редактирование генома, и формированию гетерогенной популяции клеток, имеющих по-разному измененный геном [27, 28]. В настоящее время тяжело предсказать, насколько возникновение мозаицизма существенно для последующего анализа эффектов, индуцированных редактированием генома. Кроме того, остается проблема нецелевых мутаций, вносимых CRISPR/Cas9 системой, что может быть актуально в условиях, когда экспрессия Cas9 происходит на протяжении

длительного срока после инъекции вирусов, кодирующих Cas9 и гидовые РНК, в мозг. Однако возможным решением последней проблемы может являться фланкирование промотора Cas9 последовательностью гидовой РНК целевого гена [29]; в этом случае синтез Cas9 будет приводить к инактивации целевого гена, а также вырезанию промотора у Cas9 и прекращению экспрессии фермента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Внедрение технологий геномного редактирования в исследовательский процесс привело к появлению различных инструментов, с помощью которых оказывается возможным выявлять тонкую структуру молекулярных процессов, протекающих в клетках. Особенно актуальными эти технологии оказались для исследований центральной нервной системы, состоящей из гигантского числа различных клеточных субпопуляций. Однако использование сложных инструментов без должного понимания того, к каким последствиям приводит их использование, ведет к неверным интерпретациям получаемых результатов, и, как следствие, к искажению получаемой на основе этих результатов картины мира. Улучшение нашего понимания того, как работают ТРГ неминуемо приводит к необходимости проведения все большего числа контрольных экспериментов, что усложняет сам эксперимент и увеличивает его стоимость. В текущей ситуации, когда высокорейтинговые журналы фактически требуют набора определенного числа методов в статье (что, как следствие, приводит к увеличению стоимости всей научной работы и времени ее выполнения) применение ТРГ в этих работах становится нормой, но одновременно приводит к отсутствию грамотного рецензирования частей этих работ, связанных с ТРГ. С научной точки зрения, последнее фактически может обесценивать ту часть сложной и дорогостоящей работы с использованием ТРГ, которая выполнена без должных контрольных экспериментов. Безусловно, не имеет смысла отвергать использование ТРГ в биологических исследованиях, но остается важным тщательно продумывать и проводить все необходимые контрольные эксперименты, несмотря на удорожание исследовательской работы и кажущуюся бесполезность этих экспериментов. Важно также отметить, что разрабатываемые в настоящий момент альтернативные подходы, включающие не только вышеупомянутые, но и такие, как использование аптамеров, могут помочь обойти описанные в этой работе проблемы и углубить наше понимание молекулярных основ функции ЦНС.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарен М.М. Михайловой за критические замечания, сделанные при подготовке работы, и Ю.С. Спивак за помощь с оформлением рисунков.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации на 2021–2023 годы.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Автор заявляет, что у него нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Koller B.H., Marrack P., Kappler J.W., Smithies O. // J. Immunol. Science. 2010. V. 184. № 9. P. 1227–1230.
2. Zijlstra M., Bix M., Simister N.E., Loring J.M., Raulet D.H., Jaenisch R. // Nature. 1990. V. 344. № 6268. P. 742–746.
3. Horn P.J., Peterson C.L. // Science. 2002. V. 297. № 5588. P. 1824–1827.
4. Song A.J., Palmiter R.D. // Trends in Genetics. 2018. V. 34. № 5. P. 333–340.
5. Declercq J., Brouwers B., Pruniau V.P.E.G., Stijnen P., De Faudeur G., Tuand K., Meulemans S., Serneels L., Schraenen A., Schuit F., Creemers J.W.M. // PLoS One. 2015. V. 10. № 8. P. e0135502.
6. Giusti S.A., Vercelli C.A., Vogl A.M., Kolarz A.W., Pino N.S., Deussing J.M., Refojo D. // J. Psychiatr. Res. 2014. V. 55. № 1. P. 87–95.
7. Harno E., Cottrell E.C., White A. // Cell Metabolism. 2013. V. 18. № 1. P. 21–28.
8. Chen E., Lallai V., Sherafat Y., Grimes N.P., Pushkin A.N., Fowler J.P., Fowler C.D. // J. Neurosci. 2018. V. 38. № 9. P. 2177–2188.
9. Becher B., Waisman A., Lu L.F. // Immunity. 2018. V. 48. № 5. P. 835–836.
10. Vogt M.A., Chourbaji S., Brandwein C., Dormann C., Sprengel R., Gass P. // Exp. Neurol. 2008. V. 211. № 1. P. 25–33.
11. Rotheneichner P., Romanelli P., Bieler L., Pagitsch S., Zaunmair P., Kreutzer C., König R., Marschallinger J., Aigner L., Couillard-Després S. // Front. Neurosci. 2017. V. 11.
12. Wüst R.C.I., Houtkooper R.H., Auwerx J. // J. Cell Biology. 2020. V. 219. № 7.
13. Valny M., Honsa P., Kirdajova D., Kamenik Z., Anderova M. // Front. Cell. Neurosci. 2016. V. 10.
14. Li X., Du Z.J., Chen M.Q., Chen J.J., Liang Z.M., Ding X.T., Zhou M., Li S.J., Li X.W., Yang J.M., Gao T.M. // Genes, Brain Behav. 2020. V. 19. № 4.
15. Lee C.M., Zhou L., Liu J., Shi J., Geng Y., Liu M., Wang J., Su X., Barad N., Wang J., Sun Y.E., Lin Q. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2020. V. 117. № 32. P. 19578–19589.

16. Tasic B., Yao Z., Graybuck L.T., Smith K.A., Nguyen T.N., Bertagnolli D., Goldy J., Garren E., Economo M.N., Viswanathan S., Penn O., Bakken T., Menon V., Miller J., Fong O., Hirokawa K.E., Lathia K., Rimorin C., Tieu M., Larsen R., Casper T., Barkan E., Kroll M., Parry S., Shapovalova N.V., Hirschstein D., Pendergraft J., Sullivan H.A., Kim T.K., Szafer A., Dee N., Groblewski P., Wickersham I., Cetin A., Harris J.A., Levi B.P., Sunkin S.M., Madisen L., Daigle T.L., Looger L., Bernard A., Phillips J., Lein E., Hawrylycz M., Svoboda K., Jones A.R., Koch C., Zeng H. // *Nature*. 2018. V. 563. № 7729. P. 72–78.
17. Zeisel A., Hochgerner H., Lönnerberg P., Johnsson A., Memic F., van der Zwan J., Häring M., Braun E., Borm L.E., La Manno G., Codeluppi S., Furlan A., Lee K., Skene N., Harris K.D., Hjerling-Leffler J., Arenas E., Ernfrors P., Marklund U., Linnarsson S. // *Cell*. 2018. V. 174. № 4. P. 999–1014. e22.
18. Chesnoy-Marchais D. // *Endocrinology*. 2005. V. 146. № 10. P. 4302–4311.
19. González-Burgos I., Rivera-Cervantes M.C., Velázquez-Zamora D.A., Fera-Velasco A., Garcia-Segura L.M. // *Neural Plast.* 2012. V. 2012.
20. Denk F., Ramer L.M., Erskine E.L.K.S., Nassar M.A., Bogdanov Y., Signore M., Wood J.N., McMahon S.B., Ramer M.S. // *Acta Neuropathol. Commun.* 2015. V. 3. P. 74.
21. Álvarez-Aznar A., Martínez-Corral I., Daubel N., Betsholtz C., Mäkinen T. and Gaengel K. // *Transgenic Res.* 2020. V. 29. № 1. P. 53–68.
22. Van Hove H., Antunes A.R.P., De Vlaminck K., Scheyltjens I., Van Ginderachter J.A., Movahedi K. // *European J. Immunology*. 2020. V. 50. № 3. P. 459–463.
23. Chappell-Maor L., Kolesnikov M., Kim J.S., Shemer A., Haimon Z., Grozovski J., Boura-Halfon S., Masuda T., Prinz M., Jung S. // *Eur. J. Immunol.* 2020. V. 50. № 3. P. 353–362.
24. Maes M.E., Colombo G., Schulz R., Siegert S. // *Neurosci. Lett.* 2019. V. 707. P. 134310.
25. Chukwudi C.U., Good L. // *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2019. V. 72. № 4. P. 225–236.
26. Kallunki T., Barisic M., Jäättelä M., Liu B. // *Cells*. 2019. V. 8. № 8. P. 796.
27. Mehravar M., Shirazi A., Nazari M., Banan M. // *Developmental Biology*. 2019. V. 445. № 2. P. 156–162.
28. Yan S., Tu Z., Li S., Li X.J. // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2018. V. 81. P. 488–492.
29. Wang H., Lu H., Lei Y.S., Gong C.Y., Chen Z., Luan Y.Q., Li Q., Jian Y.Z., Wang H.Z., Wu F.L., Tao C.L., Shen H., Bo H.B., Shao H.W., Zhang W.F. // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2020. V. 18. P. 390–401.

Problems of Technologies of Genomic Editing and Transgenesis

A. P. Bolshakov

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

This study briefly summarizes the problems that arise when working with transgenesis systems based on recombinases and CRISPR/Cas9. A number of recent results are highlighted regarding the possible effects induced by tamoxifen and doxycycline, agents that are widely used to regulate gene expression in transgenic animals with inducible gene expression. According to these data, there is always a possibility of ectopic tamoxifen-independent expression of the transgene, and currently it is not always possible to predict where it will be observed and how this may affect the final picture of gene expression. A similar problem is present with the use of doxycycline-dependent systems, when the “nonspecific” effects of doxycycline are simply ignored. The work raises the problem of the need to conduct control experiments, taking into account the development of possible side effects associated with both the use of gene expression modulators and the systems that alter the genome, as well as the development of alternative approaches.

Keywords: recombinase, CRISPR/Cas9, tamoxifen, doxycycline

ТЕХНОЛОГИЯ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ И КОРРЕКЦИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

© 2021 г. И. А. Гривенников¹, *, В. З. Тарантул¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”, Москва, Россия

Поступила в редакцию 02.06.2021 г.

После доработки 05.07.2021 г.

Принята к публикации 06.07.2021 г.

Прогресс науки в значительной мере связан с возникновением новых технологий. Одной из таких прорывных технологий, созданной в начале XXI века, являются различные варианты геномного редактирования, среди которых наиболее простой и эффективной является технология, основанная на использовании коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (англ. сокр. CRISPR). Другой важнейшей технологией стало получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК, англ. сокр. iPSC). Совместное использование этих двух технологий существенно повысило возможности тонкого манипулирования с геномом для исследования молекулярно-генетических основ различных патологий, поиска генов-мишеней и в перспективе для практического применения в терапевтическом воздействии на разнообразные тяжелые наследственные заболевания. Такой подход оказался чрезвычайно полезным для изучения нейропатологий человека, особенно с учетом того, что многочисленные терапевтические средства, которые оказывают свою эффективность в моделях таких болезней у грызунов, не принесли пользы больным людям. В настоящем обзоре суммированы основные результаты последних лет по генетическому и эпигенетическому редактированию генома, полученные главным образом с использованием различных вариантов технологии CRISPR/Cas9 на моделях ИПСК и культивируемых соматических клеток пациентов с такими тяжелыми нейродегенеративными заболеваниями как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона и боковой амиотрофический склероз.

Ключевые слова: технология CRISPR/Cas9, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, боковой амиотрофический склероз, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, болезнь Гентингтона

DOI: 10.31857/S1027813321040051

Принятые сокращения: Aβ – бета-амилоидный пептид; AICD – внутриклеточный домен предшественника амилоида (amyloid precursor protein intracellular domain); AMPA-рецептор – рецептор α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты; APP – предшественник бета-амилоида (amyloid precursor protein); APOE – аполипопротеин E; CRISPR/Cas9 – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами/CRISPR-ассоциированный ген 9; ДА-нейроны – дофаминергические нейроны; dCas9 – деактивированный Cas9; DSB – двухцепочечный разрыв (double-strand break); GMF – фактор созревания глии (glia maturation factor); GSAP – белок, активирующий γ-секретазу (γ-secretase activating protein); HDR – гомологически направленная репарация (homology directed repair); NHEJ – негомологичное соединение концов (non-homologous end joining); NFT – нейрофибриллярные клубки (neurofibrillary tangles); PSEN – пресенилин (presenilin); TREM2 – триггерный ген ре-

цептора, экспрессируемый на миелоидных клетках 2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2); БАС – боковой амиотрофический склероз; БП – болезнь Паркинсона; БА – болезнь Альцгеймера; БГ – болезнь Гантингтона; ДПП – дипептидные повторы; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ЭР – эндоплазматический ретикулум; Tau – тубулин-ассоциированная единица (tubulin-associated unit); MAPT – ген белка Tau, ассоциированный с микротрубочками (microtubule associated protein tau); ЭСК – эмбриональные стволовые клетки.

ВВЕДЕНИЕ

Нейродегенеративные заболевания – наследственные или приобретенные заболевания нервной системы, сопровождающиеся прогрессирующей гибелью определенных популяций нейронов в центральной нервной системе. К числу таких заболеваний относят болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона, боковой амиотрофический склероз и ряд других более редких нейропатологий. Разные нейродегенеративные заболевания определяются многими общими фундаментальными процессами,

* Адресат для корреспонденции: 123182 Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 2; тел.: 8-499-196-00-14, e-mail: igorag@img.ras.ru.

такими как протеотоксический стресс и сопутствующие ему нарушения в убиквитин-протеасомной и аутофагосомной/лизосомальной системах, окислительный стресс, митофагия, апоптоз и нейровоспаление. Патофизиологию и молекулярную основу этих заболеваний исследуют уже много десятилетий с использованием разных подходов, однако понимание тонких механизмов этих патологий пока остается малоизученным [1]. Основная сложность таких исследований заключалась в том, что изучение образцов мозга пациентов с нейродегенеративными заболеваниями были возможны только *post mortem*, но эти исследования ограничены редкостью таких образцов, этическими проблемами, а также потерей наиболее уязвимых нейронов и ограниченным временным окном для их изучения.

Успеху способствовало создание технологии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), которая позволила получать в большом количестве нейрональные предшественники и зрелые нейроны человека, а также разные типы глиальных клеток от пациентов с различными нейропатологиями. Другой качественно новый этап в исследованиях нейродегенеративных заболеваний связан с разработкой подхода функциональной геномики на основе технологии CRISPR/Cas9 [2]. По сравнению с другими методами редактирования генома, система CRISPR/Cas9 проста, эффективна и более специфична. CRISPR/Cas9-направленное редактирование генов становится перспективным инструментом для нарушения экспрессии генов, вызывающих заболевания, или редактирования патогенных мутаций без изменения имеющегося генетического фона. Генетическое редактирование в ИПСК и дифференцированных из них нейрональных клетках с помощью CRISPR/Cas9 стали критическим подходом к изучению молекулярных механизмов патологий нервной системы и обнаружению терапевтических мишеней для лечения неврологических заболеваний [3, 4] (рис. 1). Обо всем этом и пойдет речь в настоящем обзоре.

Технология CRISPR/Cas9 основана на использовании направляющей РНК (гидРНК), которая содержит область гомологии с геном-мишенью, и эндонуклеазы Cas9. Комплекс рибонуклеопротеинов гидРНК:Cas9 присоединяется к комплементарному участку ДНК-мишени. После этого Cas9 осуществляет в мишени двухцепочечные разрывы, которые восстанавливаются с помощью негомологичного соединения концов (NHEJ) или гомологически направленной репарации (HDR).

Далее на конкретных примерах рассмотрим, как эта технология в сочетании с технологией получения ИПСК продвинула наше понимание природы основных нейродегенеративных заболеваний человека.

БОЛЕЗНЬ ПАРКИНСОНА

Болезнь Паркинсона (БП) — распространенное прогрессирующее нейродегенеративное заболева-

ние, характеризующееся преимущественной гибелью дофаминергических нейронов (ДА-нейронов) в центральной нервной системе. Это заболевание ассоциировано с возрастом и является одной из значимых причин инвалидизации пожилых лиц в современном обществе [5]. Его частота колеблется от 60 до 140 человек на 100 тысяч населения, при этом число больных значительно увеличивается среди представителей старшей возрастной группы [6].

От 10 до 15% случаев БП представлены семейными формами заболевания, связанными с мутациями в генах [7, 8]. На сегодняшний день выявлен ряд таких генов (*SNCA*, *PARK2*, *LRRK2*, *PINK1*, *GBA*, *DJ1*, *UCHL1*, *ATP13A2*), вовлеченных в патогенез семейной формы БП [9–11]. Семейные формы БП могут иметь аутосомно-доминантный или аутосомно-рецессивный тип наследования [12]. Мутации в генах *SNCA*, *LRRK2* и *UCHL1* вызывают БП с аутосомно-доминантной формой наследования. Аутосомно-рецессивные формы заболевания развиваются при наличии мутаций в генах *PINK1*, *DJ-1*, *PARK2*. Наиболее часто к развитию заболевания приводят мутации в генах *LRRK2*, *PARK2* и *SNCA* (рис. 2).

Редактирование генома позволяет исправить разнообразные мутации в этих генах, что имеет как теоретическое значение, так и сугубо прикладное, в свете использования данного подхода в клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний. Кроме того, внесение строго определенных изменений в отдельные участки “нормальных” генов позволяет исследовать функции этих генов и их белковых продуктов.

Так, исправление в ИПСК с помощью технологии “цинк-пальцевых” нуклеаз наиболее часто встречающейся и значимой для развития БП мутации (rs34637584 G > A) в гене *LRRK2* (кодирует белок дардарин, обладающий протеинкиназной активностью), позволило установить, что повреждение митохондриальной ДНК является одним из ранних признаков нейрональной дисфункции и в сочетании с нарушенной аутофагией играет важную роль в развитии данной патологии [13].

Интересные данные были получены группой Reinhardt с соавт. [14]. С использованием технологии “цинк-пальцевых” нуклеаз в двух линиях ИПСК от пациентов с БП, несущих точковую мутацию G2019S в гене *LRRK2*, была проведена коррекция этой мутации. Кроме того, в контрольной линии ИПСК, полученной от здорового донора, было произведено внедрение мутации G2019S. Дальнейший анализ показал, что длина нейритов в клетках генетически исправленной мутантной линии ИПСК была сходной с таковой в контроле и намного превышала длину нейритов в мутантных линиях. Кроме того, во всех линиях, содержащих мутации G2019S, но не в контрольных линиях, была повышена экспрессия α -синуклеина и тау-белка, ассоциированного с микротрубочками. Таким образом, авторам удалось в значительной

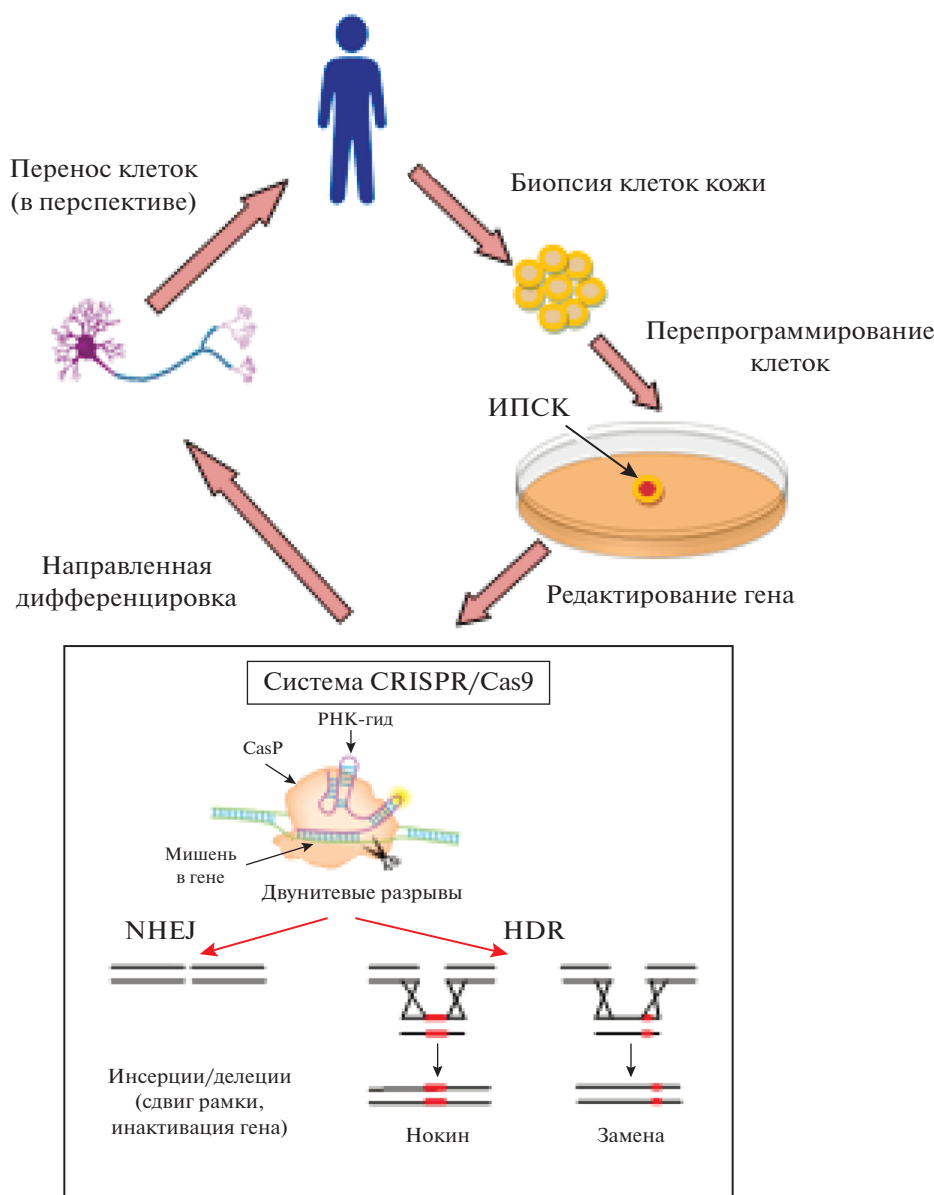


Рис. 1. Общая схема совместного использования ИПСК и системы CRISPR/Cas9 для редактирования генов.

степени обратить патологические фенотипы, ассоциированные с мутацией G2019S в гене *LRRK2*.

В последние годы для геномного редактирования все большее распространение получает нуклеазная система CRISPR/Cas9 [2]. Qing с соавт. [15] с помощью этой технологии осуществили введение мутации G2019S в ген *LRRK2* в ИПСК человека. При последующей дифференцировке мутантных ИПСК в дофаминергические нейроны (ДА-нейроны) у них происходило существенное снижение ветвления отростков, а также значительное уменьшение их длины по сравнению с линиями контрольных клеток. Известно, что данная мутация приводит к увеличению киназной активности белкового продукта дардарина. Обработка таких клеток ингибитором киназы дардарина

приводила к восстановлению нормального фенотипа ДА-нейронов. В итоге проведенной работы авторы показали возможность использования генетического редактирования для эффективного и стандартизированного создания мутантных линий ИПСК для моделирования БП.

С помощью системы CRISPR/Cas9 также была осуществлена коррекция мутации G2019S в гене *LRRK2* в ИПСК человека, полученных из фибробластов кожи пациента с диагностированной формой БП [16]. Было показано, что в различных клонах нейрональных предшественников, дифференцированных из ИПСК после геномного редактирования, наблюдалась тетраплоидия 92 XXYY/46,XY (24–43% клеток в разных клонах). Кроме того, были обнаружены одиночные

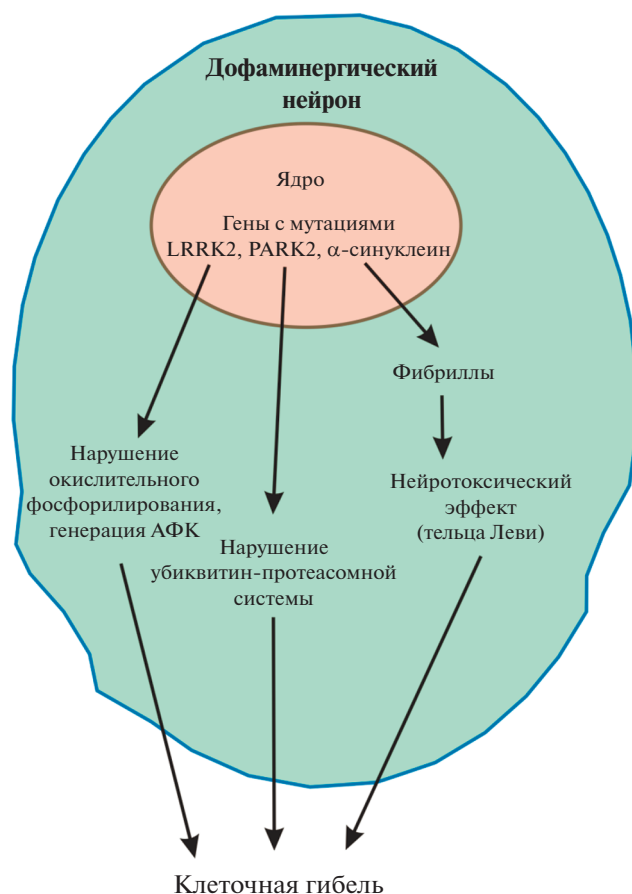


Рис. 2. Схематическое представление участия продуктов мутантных генов *LRRK2*, *PARK2* и *SNCA* в дегенерации дофаминергического нейрона при БП.

транслокации и разрывы хромосом. Полученные данные свидетельствуют о необходимости тщательного морфологического анализа получаемых культур клеток и разработки улучшенных методов геномного редактирования, обеспечивающих стабильность генома в таких клетках.

Известно, что приматы являются наиболее близкими к человеку млекопитающими по своим физиологическим свойствам. Поэтому использование их в качестве моделей различных тяжелых заболеваний человека является перспективной задачей. Vermilyea с соавт. [17] использовали эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и ИПСК от обыкновенной мартышки для моделирования молекулярных и клеточных механизмов патогенеза БП. С помощью технологии CRISPR/Cas9 авторы ввели в клетки ген *LRRK2* с мутацией G2019S, а также укороченный вариант этого гена. Также, как и в клетках человека, введение мутантного гена приводило к увеличению киназной активности дардарина. После дифференцировки трансфицированных мутантных клеток в нейрональном направлении в них было обнаружено увеличение уровня активных форм кислорода,

снижение выживаемости ДА-нейронов и уменьшение длины и ветвления нейритов у этих клеток. Причем в клетках с введенным укороченным геном таких фенотипических изменений не происходило. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования соответствующих клеток приматов для создания моделей БП.

Система CRISPR/Cas9 была использована также для поиска генов, осуществляющих физиологическую регуляцию гена *PARK2*, который кодирует белок паркин, обладающий E3-убиквитин-лигазной активностью. Мутации в этом гене ведут к нарушению функций данного фермента, что сопровождается накоплением аномальных белковых субстратов в клетке, индукцией апоптоза и гибелью нейронов [18]. Широкомасштабный геномный нокаут, проведенный с помощью технологии CRISPR/Cas9 в клетках, экспрессирующих трансген *GFP-PARK2*, позволил идентифицировать 53 регулятора экспрессии этого гена, включая ген-репрессор *THAP11* [19].

Ген *SNCA* (*PARK1*) кодирует α -синуклеин — белок, который является основным компонентом так называемых телец Леви. Нарушение синтеза или процессинга данного белка, вследствие соответствующих мутаций, является центральным звеном молекулярного патогенетического каскада, ведущего к накоплению в клетке нерастворимых белковых комплексов и прогрессирующей гибели нейронов при БП [12]. Arias-Fuenzalida с соотр. [20] разработали эффективный метод точного введения мутаций в интересующий ген и быстрый отбор соответствующих клонов, с применением комбинации CRISPR/Cas9 системы и FACS анализа. С помощью этого метода в ген *SNCA* ИПСК от здорового человека были введены A30P и A53T мутации, ответственные за развитие симптомов БП. Анализ дифференцированных в нейрональном направлении мутантных клеток выявил у них нарушения в клеточном дыхании и синтезе АТФ. Разработанный метод, по мнению авторов, позволит в дальнейшем перейти к автоматизации процесса редактирования генома с быстрой оценкой фенотипа получаемых клеток.

С использованием технологии CRISPR/Cas9 Chen с соавт. [21] делетировали ген *SNCA* в ЭСК человека и получили соответствующие гетеро и гомозиготные (*SNCA*+/- and *SNCA*-/-) линии клеток. Затем эти клетки дифференцировали в ДА-нейроны и индуцировали в них процесс синуклеинопатии добавлением экзогенно сформированных фибрилл α -синуклеина. Авторы показали, что *SNCA*+/- и *SNCA*-/- нейроны были более устойчивы к образованию патологических агрегатов по сравнению с исходными нейронами. Таким образом, частичное или полное удаление аллелей гена *SNCA* отражает степень устойчивости клеток к патологии, связанной с формированием телец Леви.

Технология CRISPR/Cas9 была использована также для изучения нейровоспалительных путей,

вовлеченных в патогенез БП, в частности, сигнального пути протеинкиназы $C\delta$ (PKC δ). Подавление в ДА-нейронах экспрессии гена, кодирующего PKC δ , сильно снижало индуцируемый эндосомальным апоптоз в этих клетках [22].

В последние годы появилась определенная надежда на новые терапевтические стратегии, направленные на эпигенетические изменения в геноме клеток человека. Так, известно, что повышенные уровни SNCA, связанные с трипликацией гена, вовлечены в патогенез БП. В то же время для поддержания функции нейронов необходим нормальный физиологический уровень SNCA. Поскольку метилирование ДНК в 1-ом интроне гена SNCA регулирует транскрипцию этого гена, для точной регуляции уровней его экспрессии была использована система, которая основана на CRISPR-деактивированном Cas9 (dCas9) слитым с каталитическим доменом ДНК-метилтрансферазы 3A (DNMT3A) [23]. С помощью такого подхода в нейронах, с трипликацией SNCA, полученных из ИПСК пациента с БП, было осуществлено направленное метилирование ДНК в 1-ом интроне гена SNCA. Это вызывало снижение транскрипции мРНК и уровня синтеза белка α -синуклеина в нейронах. В итоге происходило ревертирование патологических свойств фенотипа ДА-нейронов к норме. Полученные результаты позволяют предположить, что технология CRISPR-dCas9-DNMT3A имеет определенный потенциал для лечения БП в качестве нового терапевтического подхода на основе эпигенетики. Модификации гистонов, такие как H3K4me3 и H3K27ac, способны увеличивать транскрипцию гена SNCA, внося таким образом вклад в патогенез БП. Guha-thakurta с соотр. [24], используя уникальную систему, основанную на технологии CRISPR/dCas9 (CRISPR/dCas9 SunTag-JARID1A), существенным образом снизили уровень H3K4me3 в районе промотора гена SNCA, что привело к снижению уровня экспрессии этого гена как в линии клеток SH-SY5Y, так и в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, полученных от пациентов с БП.

Следует отметить, что при исследовании патогенеза БП с использованием ИПСК человека и технологии CRISPR/Cas9 особое внимание надо обратить на создании моделей таких как 3D культуры (органоиды), а также моделей, включающих совместное культивирование нейронов, клеток глиального ряда и микроглии [25].

БОЛЕЗНЬ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Болезнь Альцгеймера (БА) — прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, обычно поражающее взрослых людей, которое является наиболее распространенной причиной деменции и в конечном итоге приводящая к смерти. В настоящее время около 40 млн людей в мире подвержены этому заболеванию [26]. БА характеризуется обширной потерей холинергических нейронов и на-

коплением в головном мозге внутриклеточных нейрофибриллярных клубков, состоящих из гиперфосфорилированного Тау-белка, и внеклеточных амилоидных бляшек, содержащих бета-амилоидный пептид (А β). Хотя и А β , и Тау могут проявлять токсичность независимо друг от друга, между ними существует тесная взаимосвязь: накопление А β может индуцировать гиперфосфорилирование Тау. На протяжении длительного времени проводятся многочисленные исследования этой патологии, однако патофизиология и молекулярные механизмы развития БА до сих пор остаются предметом споров. Существует множество предположений относительно основной причины БА. В 1970-х годах, когда был продемонстрирован холинергический дефицит в мозге пациентов с БА, опосредованный дефицитом фермента холинацетилтрансферазы, возникла “холинергическая гипотеза” [27]. Продолжает существовать так называемая “пресенилиновая гипотеза”, согласно которой потеря нормальной функции мутантным геном PSEN1 (входит в комплекс фермента γ -секретазы) вызывает БА через доминирующее негативное влияние на аллель дикого типа [28]. Структурные и функциональные различия митохондрий у больных БА привели к “гипотезе митохондриального каскада” БА [29]. Однако преобладающая на сегодняшний день точка зрения о причине этого заболевания заключается в накоплении А β и называется “гипотеза амилоидного каскада” [30, 31]. Схема функционирования этого каскада изображена на рис. 3.

К настоящему времени у пациентов с семейной формой БА описано более 300 вариантов мутаций в генах, кодирующих белок-предшественник аполинпопротеина (APP), пресенилин 1 (PSEN1) и пресенилин 2 (PSEN2) (<https://www.alzforum.org/mutations>). Кроме этого, в спонтанных формах БА идентифицировано более 30 генетических локусов, мутации в которых ассоциированы с БА через пути, участвующие в продукции бета-амилоида (А β), и его клиренса [32]. При этом многочисленные дополнительные гены риска в спонтанных формах экспрессируются преимущественно в ненейронных клетках головного мозга [4]. Эти новые данные начинают смещать фокус исследований БА в сторону лучшего понимания роли и функций ненейронных клеток во время нейродегенерации.

Чтобы разобраться с причинно-следственной взаимосвязью между мутациями и заболеванием, было использовано редактирование генов с помощью системы CRISPR/Cas9. Такой подход дает теперь возможность устанавливать, какие из ранее известных и вновь идентифицированных мутаций действительно непосредственно ответственны за фенотипы БА [33].

Давно известны доминантные мутации либо в субстрате (APP), либо в протеазе (PSEN), которые ассоциированы с ранним началом БА [34, 35]. Большинство из них усиливают синтез β -амило-

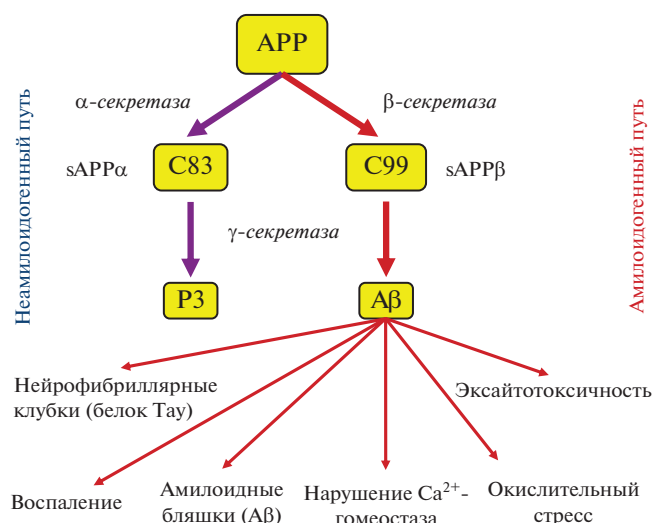


Рис. 3. Схема функционирования амилоидного каскада. Предшественник бета-амиоида (APP) разрезается ферментами α -секретазой (неамилоидогенный путь) или β -секретазой (амилоидогенный путь) с образованием секретируемых форм пептида C83 (sAPP α) и C99 (sAPP β) соответственно. Затем трансмембранный фрагмент C99 разрезается γ -секретазой (включает субъединицу PSEN) с образованием β -амилоидных пептидов (A β), состоящих из 39–43 аминокислот. Секретция длинных A β (особенно A β 42) ассоциирована с различными нарушениями в нервной системе, приводящими к БА.

идного пептида, состоящего из 42 аминокислот (A β 42), основного компонента сенильных бляшек. Дисбаланс между продукцией и клиренсом патогенного A β 42 является очень ранним, часто инициирующим фактором БА [36].

Для изучения роли этих мутаций в развитии БА было применено геномное редактирование. Например, с помощью системы CRISPR/Cas9 осуществляли коррекцию доминантной мутации N141I в гене *PSEN2*, используя для этого в качестве модели базальные холинергические нейроны человека, полученные из ИПСК и несущие эту точечную мутацию [37]. Коррекция этой мутации в гене *PSEN2* приводила к устранению электрофизиологического дефицита в клетках и уменьшала в них соотношение A β 42/40. Полученные данные подтверждают существование тесной взаимосвязи между мутацией N141I в гене *PSEN2* и увеличением соотношения A β 42/40, а также нарушением электрофизиологии нейронов у пациентов с БА.

Система CRISPR/Cas9 была также использована в фибробластах пациента с семейной формой БА, содержащих мутацию APP^{swe} [38]. Селективное нарушение экспрессии мутантного аллеля вызывало снижение в клетках секретируемого A β на 60%. Авторы предполагают, что использованный подход в перспективе может быть применен в терапевтических целях.

Для подавления патогенного амилоидогенного пути в нейронах, полученных из ИПСК от пациента с семейной формой БА, несущего мутацию V717I в APP, с помощью системы CRISPR/Cas9 редактировали ген *APP* на крайнем С-конце [39]. Были подобраны условия, при которых в клетках ослаблялись как расщепление APP до APP- β , так и продукция A β (амилоидогенный путь). Одновременно повышалась нейропротекторное расщепление APP с образованием APP- α (неамилоидогенный путь). При этом N-концевые и компенсаторные гомологи APP оставались нетронутыми, без видимого влияния на нейрофизиологию *in vitro*.

Недавно описан интересный вариант терапии *in vitro* с помощью модифицированной системы CRISPR/Cas9. Ранее в скандинавской популяции была обнаружена исландская мутация *APP* (A673T). У людей, несущих эту мутацию, почти не наблюдается накопления пептидов A β в мозге до глубокой старости. Основываясь на этих данных, мутацию A673T ввели в ген *APP* клеток HEK293T, рядом с уже содержащейся в этом гене патогенной мутацией E674K [40]. В результате этой процедуры в клетках происходило снижение синтеза патогенных пептидов A β . Таким образом, можно через введение дополнительной мутации останавливать патологические процессы, ведущие к БА.

В случаях, когда обнаруживаемая у пациентов с БА мутация является новой и нет возможности в получении семейного анамнеза и клинических образцов для исследований сегрегации мутаций, сложно приписать клинические проявления БА наличию этой мутации. Недавно описан один из подходов для решения этой задачи применительно к генам *PSEN1* и *PSEN2*. С помощью CRISPR/Cas9 был осуществлен двойной нокаут генов *PSEN1* и *PSEN2* в клетках нейробластомы мыши N2A, что приводило к полному исчезновению в них A β 40 и A β 42 [41]. Трансфекция в эти клетки экзогенного дикого типа гена *PSEN1* или *PSEN2*, обеспечивала полное восстановление продукции A β 40 и A β 42 до уровней дикого типа. На этой модели было также протестировано несколько известных и новых мутаций в гене *PSEN1* с неопределенной патогенностью и влиянием на функцию γ -секретазы. Все они показывали увеличение соотношения A β 42/A β 40, а также влияние на стабильность γ -секретазы.

Поскольку β -секретазы необходима для производства пептидов A β , нацеливание на кодирующий ее ген *BACE1* является потенциальной стратегией лечения БА. Благодаря использованию наноконструкта, состоящего из гидРНК, Cas9 и амфифильного пептида R7L10, Park с соавт. [42] удалось подавить экспрессию этого гена, что привело к ингибированию A β -ассоциированной патологии в моделях БА, созданных на мышах.

Другой потенциальной мишенью для генной терапии при БА является внутримембранный комплекс, содержащий γ -секретазу и белок, активирующий γ -секретазу (GSAP). Нокаут гена *GSAP* с

помощью системы CRISPR/Cas9 в клетках HEK293, которые экспрессируют APP, снижал активность γ -секретазы и, следовательно, генерацию A β . При этом прекращение экспрессии гена *GSAP* приводило к изменению конформации белка PSEN1 и снижению секреции A β . Полученные результаты открывают еще один путь к изучению модуляции γ -секретазы и, в конечном итоге, к совершенствованию терапевтических средств при БА [43].

Одним из подходов к изучению причин БА является раскрытие роли патологического белка Тау в прогрессировании заболевания. Этот белок кодируется геном *MAPT*, им обогащены аксоны развивающихся и зрелых нейронов. На важность гиперфосфорилирования Тау в развитии БА указывают клинические исследования, установившие тесную корреляцию между развитием БА с Тау-положительными нейрофибриллярными клубками (neurofibrillary tangles) (NFTs) [44]. Недавно с целью установления генетических модуляторов множественных морфологических и функциональных клеточных фенотипов, связанных с БА, на клеточной модели Тау-патологии был проведен широкомасштабный скрининг с помощью автоматизированной системы CRISPR/Cas9 в сочетании с мультиплексными гидРНК [45]. В результате было получено несколько интересных результатов. В частности, была обнаружена сильная связь между лизосомами и агрегацией Тау. Установлено также, что агрегацию Тау модулирует сеть генов, включая регуляторный путь NF- κ B и комплекс LKB1, которые участвуют в регуляции иммунного ответа.

Считается, что основными факторами риска позднего начала БА является наличие аллели E4 (R112/R158) в гене аполипопротеина (*APOE4*) [46]. При этом аллель E3 (C112/R158) гена *APOE* не оказывала негативных эффектов. Нейроны человека, полученные из ИПСК, экспрессирующих белок APOE4, характеризуются более высоким уровнем фосфорилирования белка Тау и повышенной дегенерацией ГАМК-ергических нейронов. APOE4 связывается с A β и вместе с ним образует сенильные бляшки. С помощью двух подходов осуществляли замещение в геноме ИПСК человека аллеля *APOE4* на аллель *APOE3*. Комог и соавт. [47] использовали для этой цели редактирование пар оснований с помощью системы, состоящей из CRISPR/Cas9 и фермента цитидиндезаминазы, способного осуществлять прямое превращение цитидина в уридин, тем самым осуществляя замену C $\rightarrow$ T (или G $\rightarrow$ A). Ванг с соавт. [48] проводили редактирование путем замены в аллеле *APOE4* фрагмента ДНК, кодирующего аминокислотные остатки 112–158, на подобный фрагмент из аллеля *APOE3*. Применение обоих подходов приводило к реверсии фенотипов нейронов к норме, что указывает на специфические патогенные эффекты APOE4. Полученные результаты позволили авторам заключить, что коррекция патогенной конформации APOE4 может стать терапевтическим подходом для лечения APOE4-связанной БА.

Lin с соавт. [49] использовали CRISPR/Cas9 для получения из клеточной линии с *APOE3* изогенных гомозиготных ИПСК с аллелем *APOE4*. Из этих клеток были сформированы нейроны, астроциты и микроглия-подобные клетки. Переключение с *APOE3* на *APOE4* резко изменило транскриптом как нейронов, так и глии. В нейронах, содержащих аллель *APOE4*, происходило нарушение метаболических путей, связанных с формированием синапсов. Кокультивирование модифицированных микроглия-подобных клеток с органоидами, полученными из нервных клеток, несущих дупликацию гена *APP*, показало, что *APOE4* отрицательно влияет на некоторые аспекты функции микроглии, которые потенциально препятствуют способности микроглии очищать внеклеточный A β из мозга БА.

Геномное редактирование было использовано для изучения еще одного фактора риска sporadicческой БА — белка FERMT2. Мутагенез в гене, кодирующем этот белок, проведенный с помощью системы CRISPR/Cas9 в нейронах и астроцитах человека, показал, что уменьшение экспрессии этого гена в изученных клетках снижает секрецию A β и фосфорилирование Тау, т.е. способствует реверсии к нормальному фенотипу [50].

Известно, что дефекты эндосомальной сети являются еще одним из ранних событий в патогенезе БА [51]. Среди генов, которые могут влиять на развитие этой патологии, является ген *SORL1* [52]. Недавно Кнупп с соавт. [53], используя систему CRISPR/Cas9 показали, что при удалении гена *SORL1* в нейронах, полученных из ИПСК, происходит изменение трафика и процессинга APP в эндосомальной сети. Эти данные свидетельствуют о том, что цитопатологию при БА обеспечивают не только расщепление APP, но и транспорт этого белка.

В связи с важной ролью хронического нейровоспаления в патогенезе БА внимание было обращено также на провоспалительный фактор созревания глии (GMF), содержание которого значительно повышается в различных частях мозга при БА. Редактирование гена *GMF* в immortalized микроглиальных клетках с помощью CRISPR/Cas9 вызывало ингибирование воспалительного сигнального пути, что связано с подавлением фосфорилирования p38 MAPK, которая обычно повышается у пациентов с БА [54]. Авторы полагают, что такое редактирование может стать новой терапевтической стратегией при БА.

С генетикой и нейропатологией позднего начала БА тесно связана микроглия, которая в качестве первичной иммунной клетки мозга выполняет ключевые функции макрофагов, такие как фагоцитоз остатков мертвых клеток и белковых агрегатов, сигнализация цитокинов/хемокинов, а также иммунный надзор и ответ [55]. Она обеспечивает трофическую поддержку нейронов, стимулирование дифференцировки олигодендроцитов и модуляции синаптической активности и

пластичности. Среди специфичных локусов риска БА в микроглии обнаружены варианты триггерного гена рецептора, экспрессируемого на миелоидных клетках 2 (*TREM2*), которые вызывают такое же увеличение риска, как и аллель *APOE* ε4. Мутации, обнаруженные в этом гене, обычно приводят к частичной или полной потере его функции. Для выяснения механизмов действия таких мутаций были использованы изогенные линии клеток глии, полученные из ИПСК, в которых с помощью системы CRISPR/Cas9 ген *TREM2* был полностью инактивирован [56]. У генетически модифицированных клеток снижалась выживаемость, ухудшался фагоцитоз ключевых субстратов, включая *APOE*, подавлялся SDF-1α/CXCR4-опосредованный хемотаксис и сильно повышалась чувствительность к вызываемой стрессом гибели клеток. Все это в модельной системе БА (трансгенных мыши) приводило к нарушению кластеризации клеток глии вокруг амилоидных бляшек и ухудшало их миграцию к культурам, продуцирующим βA. Полученные результаты раскрывают новые аспекты биологии *TREM2* человека и важной роли глии в развитии и прогрессировании БА. В настоящее время преобладающая терапевтическая стратегия в лечении БА основана на восстановлении холинергической функции за счет использования соединений, которые блокируют ферменты, расщепляющие ацетилхолин [57]. Однако такой подход пока мало эффективен.

Приведенные выше примеры позволяют заключить, что совместное использование системы CRISPR/Cas9 и технологии ИПСК существенно продвинуло исследователей к пониманию механизмов возникновения и развития БА и указало на новые пути поиска подходов для лечения этого заболевания. Результаты, полученные в последние годы с помощью редактирования генов, связанных с амилоидогенным путем, позволяют ожидать серьезных изменений в стратегиях лечения БА.

БОКОВОЙ АМИОТРОФИЧЕСКИЙ СКЛЕРОЗ

Боковой амиотрофический склероз (БАС) является смертельно опасным нейродегенеративным заболеванием человека. БАС ассоциируется с прогрессирующей потерей двигательных нейронов головного и спинного мозга, приводящей к мышечной слабости, параличу и в конечном итоге к смерти. Средняя выживаемость пациентов с БАС составляет 2–5 лет после его диагностирования.

Исследователи пока не пришли к согласию относительно патофизиологии этого заболевания. Одни из них склонны считать правильной гипотезу, которая подразумевает, что истоки дегенерации нейронов лежат в мышечных клетках или нейромышечных синапсах. При этом дегенерация окончательных нейронов начинается с нервных окончаний и прогрессирует к клеточным телам в спинном мозге. Другая гипотеза предполагает, что первичное повреждение происходит в корти-

кальных моторных нейронах и впоследствии распространяется антероградным образом на кортикоспинальные проекции [58]. Это заболевание связано с различными генетическими изменениями. В 5–10% случаев БАС наследуются по законам Менделя. К настоящему времени открыто около трех десятков генов и локусов, существенно влияющих на вероятность возникновения данного заболевания (рис. 4). Большая часть из них связана с миссенс мутациями в таких генах как *FUS*, *SOD1* и *TARDBP* или экспансией повторов в генах *C9orf72* и *ATXN2*. Эти мутации составляют до 60% семейных и 10% спорадических форм БАС; причина остальных случаев остается неясной.

Тонкие молекулярно-генетические механизмы, приводящие к БАС, долгое время оставались малоизученными пока на помощь не пришла система редактирования генов CRISPR/Cas9 [60]. Далее будут приведены примеры использования этой системы для изучения роли различных мутаций в патогенезе БАС.

Одним из признаков БАС, характерным для более 97% пациентов, является наличие убиквитинированных цитоплазматических включений, состоящих в основном из Tar-DNA-связывающего белка 43 кДа (TDP-43) [61]. Недавно установлено участие TDP-43 в ответе на повреждение ДНК как ключевого компонента нехомологичного соединения концов (NHEJ) при репарации двухцепочечных разрывов ДНК (DSBs) в постмитотических нейронах. С помощью кондиционного нокаута гена *TARDBP*, кодирующего TDP-43, по индуцибельной технологии CRISPR/Cas9 в нейрональной линии клеток человека было показано, что истощение TDP-43 коррелирует с накоплением DSB, устойчивой активацией ответа на повреждение ДНК и последующей апоптотической гибелью клеток [62]. Таким образом, TDP-43 играет важную роль в поддержании геномной целостности нейронов.

Однако это, по-видимому, не единственная роль TDP-43. Эксперименты на нейронах, полученных из ИПСК пациентов с мутацией M337V в TDP-43, показали, что в этих клетках нарушен сплайсинг мРНК сортилина, что отражается в снижении уровня секреции BDNF, который необходим для выживания нейронов и синаптической пластичности [63]. В результате коррекции гена с помощью технологии CRISPR/Cas9 мутации M337V в TDP-43 в трех линиях iPSCs и дифференцировки их в нейроны установили, что наблюдавшиеся нарушения в нейронах исчезали. Авторы предположили, что основные изменения в нервных клетках, вызванные aberrантной активностью TDP-43, могут быть объяснены аномальной функцией нескольких критических белков, включая BDNF.

Еще одной из частых причин семейных форм БАС является экспансия гексануклеотидных повторов (GGGGCC) в первом интроне гена *C9orf72*. Экспансии этих повторов приводит к обра-

зованию дипептидных повторов (ДПП) в белке, что способствует его агрегации и может приводить к нейродегенерации [64]. Для установления роли этих повторов в развитии БАС в нейронах, полученных из ИПСК, проводили удаление области экспансии повторов в гене *C9orf72* с помощью технологии CRISPR/Cas9, с использованием двух гидРНК [65]. Делеция экспансии повтора приводила к уменьшению образования в ядре фокусов транскрибированной с повторов РНК и уменьшала метилирование островков CpG вблизи повторов G₄C₂, что характерно для клеток с мутантным геном *C9orf72*. При этом изменялась экспрессия генов, связанных с процессингом РНК, ядерным транспортом, синаптической передачей и регуляцией фосфатного обмена.

Сходные результаты были получены еще в одном исследовании с использованием ИПСК, несущих от 638 до 960 повторов в гене *C9orf72* [66]. Удаление области экспансии ДПП с использованием CRISPR/Cas9 приводило к спасению AMPA-индуцированной эксайтотоксичности и изменению экспрессии тех же генов, что и в описанном выше исследовании Прибади с соавт. [65]. На модели клеток линии K562 лейкемии человека с помощью системы CRISPR/Cas9 был проведен скрининг с целью выявления супрессоров и усилителей токсичности синтетических ДПП [67]. Такой подход позволил обнаружить мощные модификаторы токсичности этих ДПП, генные продукты которых функционируют в нуклеоплазматическом транспорте, эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), протеасомах, процессинге РНК и модификации хроматина. Один из таких модификаторов, TMX2, модулировал генную сигнатуру стресса ЭР, вызываемого дипептидами *C9orf72* в нейронах, и улучшал выживаемость индуцированных моторных нейронов у пациентов с БАС, содержащих мутантный *C9orf72*.

Давно существуют свидетельства того, что глиальные клетки могут влиять на гибель моторных нейронов при БАС [68, 69]. В частности, установлено, что мутация в гене *SOD1* индуцирует внеклеточную автономную гибель моторных нейронов через токсическое действие ближайшего клеточного окружения [68]. Для изучения последствий экспрессии мутанта *C9orf72* в астроцитах, которые являются важными автономными участниками патогенеза БАС, были использованы система CRISPR/Cas9 и ИПСК человека [70]. Астроциты, полученные из ИПСК пациентов с БАС, содержали внутриядерные фокусы РНК, характерные для БАС. После коррекции экспансии повторов G₄C₂ в мутантном гене *C9orf72* эти фокусы РНК в астроцитах исчезали. Электрофизиологический анализ показал, что ко-культивирование астроцитов, несущих мутацию, с нормальными мотонейронами приводит к потере потенциала действия в мотонейронах. В то же время после удаления экспансии повторов в астроцитах их совместное культивирование с мотонейронами не изменяло свойств последних.

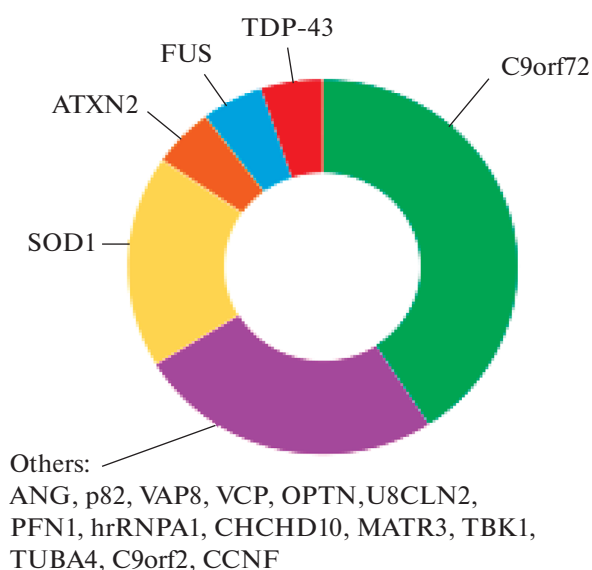


Рис. 4. Частоты различных мутантных генов в семейных формах БАС [по 59].

Полученные данные свидетельствуют о том, что мутация гена *C9orf72* в астроцитах ответственна как за клеточно-автономную астроцитарную патологию, так и за патофизиологию неавтономных автономных двигательных нейронов. Первый ген, мутации в котором приводят к БАС, был идентифицирован как ген супероксиддисмутазы Cu/Zn 1 (*SOD1*) [71]. В этом гене было описано около 30 мутаций, ассоциированных с БАС. Эти мутации оказывали влияние на нейрональную возбудимость, стресс ЭР, митохондриальную дисфункцию, окислительный стресс, нарушение транспорта белков и накопление неправильно свернутого белка *SOD1* [72].

Для исследования роли мутаций в гене *SOD1* в качестве модели были использованы ИПСК, полученные от пациентов с БАС. Целенаправленная генная коррекция мутации A272C в *SOD1* в ИПСК и последующий анализ дифференцированных из них моторных нейронов, показали значительные изменения в экспрессии генов, участвующих в активности нервной системы, передаче сигналов и гомеостазе ЭР [73].

Подобного рода исследование было проведено на ИПСК, полученных от пациента с БАС, которые содержали другую мутацию гена *SOD1* (E100G) [74]. Коррекция этой мутации в гене *SOD1* в изогенной клеточной линии с помощью системы CRISPR/Cas9 увеличивала долю моторных нейронов, размер сомы и длину нейритов и уменьшала гибель клеток. Транскрипционные изменения, обнаруженные при секвенировании РНК в генно-модифицированных нейронах, идентифицировали изменения в нескольких метаболических путях, включая те, которые связаны с AP1, окислительным фосфорилированием и функционированием ионных каналов. Ингибирование в мо-

дифицированных клетках ERK, MAPK, JNK, WNT, TP53 и CDK-киназ, уменьшало дегенерацию моторных нейронов. Полученные данные позволили авторам предположить, что эти метаболические пути имеют решающее значение при SOD1-ассоциированном БАС.

Несколько иную стратегию применили Imamura с соавт. [75]. В ИПСК, полученных от пациента с БАС, несущего мутацию L144FVX в гене *SOD1*, эту мутацию исправляли путем вставки с помощью CRISPR/Cas9 последовательностей гена *SOD1* дикого типа. В скорректированной клеточной линии происходила реверсия патологического фенотипа, связанного с *SOD1*, которая включает увеличение выживаемости моторных нейронов и дегенерацию неправильно свернутого белка SOD1.

Исследования механизмов возникновения и развития БАС с помощью редактирования генома проводились и на модели лабораторных животных. Система CRISPR/Cas9 позволяет легко вводить патогенные мутации в различные гены, проверять гипотезы о совместном появлении аллелей в начале и прогрессировании заболевания и исследовать влияние разных модификаторов в присутствии известного причинного аллеля [76]. У трансгенных мышей со сверхэкспрессирующимся мутантным геном *SOD1* наблюдали значительную потерю двигательных нейронов, аксональную денервацию, прогрессирующий паралич, агрегацию белков и сокращение продолжительности жизни [77]. Удаление гена *SOD1* с помощью редактирования генома значительно улучшало продолжительность жизни трансгенных мышей и существенно восстанавливало область мышечной дистрофии [78].

Недавно было проведено CRISPR/Cas9-опосредованное редактирование *SOD1* с мутацией G93A, связанных с БАС в двух трансгенных моделях [79]. Эта модификация полностью предотвратила развитие каких-либо признаков БАС. Трансгенные мыши оказались здоровыми без явных признаков других заболеваний, таких как злокачественное перерождение клеток или воспалительные заболевания, даже после наблюдения до 2-летнего возраста. Вместе с тем, авторы обнаружили у трансгенных мышей с отредактированным геномом высокую частоту больших делеций ДНК. Эти данные указывают на необходимость оптимизации терапевтического таргетинга для предотвращения или минимизации непреднамеренных и потенциально вредных событий. Тем не менее, редактирование генов в сочетании с использованием ИПСК и трансгенных животных дает все основания утверждать о существовании тесной причинно-следственной связи между различными мутациями в гене *SOD1* и развитием БАС.

Еще одним геном, ассоциированным с развитием БАС, является ген *FUS*. Этот ген кодирует РНК-связывающий белок, локализующийся преимущественно в ядре. Считается, что в норме он участвует в процессах репарации повреждений ДНК, транскрипции, сплайсинга, а также аксонального

транспорта. [80]. С мутациями в гене *FUS* связано большое разнообразие клинических фенотипов, начиная от общих проявлений заболевания и заканчивая наиболее агрессивными, ювенильными формами заболевания. Для выяснения влияния этих мутаций на развитие БАС и механизмов их действия также использовали технологию редактирования с помощью CRISPR/Cas9 применительно к ИПСК пациентов с БАС. Редактирование ДНК в клетках, содержащих миссенс-мутации G1566A в гене *FUS*, показало [73], что в мотонейронах, полученных из ИПСК, восстанавливались типичная цитоплазматическая локализация *FUS*, возбудимость и аксональный транспорт. В моторных нейронах с мутацией R521H в гене *FUS* наблюдали электрофизиологические изменения и дефекты аксонального транспорта. CRISPR/Cas9-опосредованная коррекция гена в ИПСК, полученных от пациентов с этой мутацией, восстанавливала возникшие дефекты в нейронах [81]. Систему CRISPR/Cas9 использовали также для коррекции рецессивной мутации *FUS* H517Q в ИПСК от пациентов с БАС [73]. При этом в мотонейронах, полученных из ИПСК, активировались p38 и ERK-киназа, что свидетельствует о ключевом пути активации сигнализации MAPK в *FUS*-опосредованной нейродегенерации при БАС.

Приведенные выше данные указывают на важную роль технологии геномного редактирования ИПСК для установления новых молекулярных механизмов, приводящих к БАС при разных генных мутациях, и поиска на разных моделях подходов к лечению этого заболевания.

БОЛЕЗНЬ ГЕНТИНГТОНА

Болезнь Гентингтона (БГ) — это аутосомно-наследственное неврологическое расстройство, характеризующееся деменцией и моторными нарушениями. Основной причиной этого заболевания считается генетическое нарушение, вызываемое экспансией триплетов CAG (кодируют аминокислоту глутамин) в первом экзоне гена хантингтина (*HTT*), структура которого хорошо изучена (рис. 5), но его функции остаются неизвестными [82, 83].

В гене дикого типа у разных здоровых людей присутствует разное количество CAG-повторов, однако, БГ развивается только когда их число превышает 36. Причем чем большее количество CAG-повторов присутствует в гене, тем тяжелее и стремительнее протекает болезнь. Нейроморфологическая картина характеризуется атрофией стриатума, а на поздней стадии также атрофией коры головного мозга. Частота встречаемости заболевания среди населения с европейскими корнями составляет примерно 3–7 на 100000, среди других рас она ниже [84].

Относительной “простотой” данного заболевания при всей тяжести течения является то, что за его развитие отвечают мутации (разное количество CAG-повторов) в одном единственном гене. Поэтому были предприняты попытки коррекции

длинных CAG-повторов с помощью CRISPR/Cas9 системы в клетках, полученных от пациентов с диагностированной БГ. В принципе работы по редактированию гена *HTT* развивались по двум направлениям. Первое – исправление мутаций в этом гене у пациентов с БГ и, второе, введение мутаций в здоровые клетки.

Впервые коррекция гена *HTT* с помощью CRISPR/Cas9 метода была продемонстрирована в работах An с соавт. [85, 86]. Однако им не удалось удалить из полученных линий клеток генетический вектор, содержащий ген селекции, который потенциально мог бы оказывать существенное влияние на регуляцию экспрессии гена *HTT*. Позднее это осуществили Xu с соотр. [87] с использованием CRISPR/Cas9 и piggyBac технологий. Полученные из ИПСК линии клеток сохраняли плюрипотентность и нормальный кариотип, а также способность к дифференцировке в возбудимые и синаптически активные нейроны. Кроме того и, что особенно важно, клетки с отредактированным геномом имели фенотип присущий нормальным клеткам, тогда как ИПСК, полученные от пациента с БГ, демонстрировали нарушения в образовании розеток, повышенную чувствительность к присутствию нейротрофических факторов и нарушения в митохондриальном дыхании.

Ooi с соотр. [88], используя ЭСК, получили панель изогенных клеточных линий с разным количеством CAG-повторов в гене *HTT*. Такой подход позволил авторам оценить тяжесть течения данной патологии в зависимости от длины этих повторов.

Сходная по идеологии работа была также выполнена другой группой исследователей [89]. С использованием технологий CRISPR/Cas9 авторы ввели в первый экзон гена *HTT* эмбриональных фибробластов человека 69 CAG-повторов. Причем соответствующий вектор для гомологичной рекомбинации не содержал вектор с геном селекции. Такой подход обеспечивал получение изогенных линий клеток и позволял проводить сравнение эффектов нормального и мутантного генов *HTT* на клеточном уровне. В дальнейшем авторы путем репрограммирования получили линии ИПСК, которые были дифференцированы в ГАМК-ергические шипиковые нейроны полосатого тела. “Мутантные” нейроны проявляли существенные отличия от “нормальных” клеток при образовании розеток *in vitro* и были более чувствительны к удалению из ростовой среды нейротрофических факторов. Кроме того, в “мутантных” нейронах были обнаружены ультраструктурные дефекты, не связанные с агрегатами белка гентингина, что указывало на появление дефектов на более ранних стадиях развития БГ [89].

Таким образом, использование технологии CRISPR/Cas9 позволяет создавать разнообразные клеточные модели БГ, которые можно использовать как для исследований молекулярных механизмов данной патологии, так и для скрининга потенциальных лекарственных средств. В перспективе возможно использование “исправ-

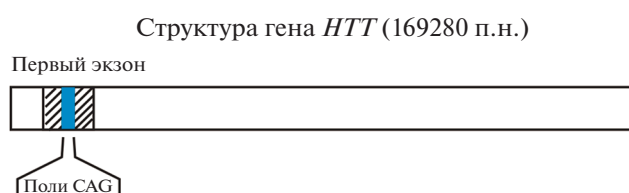


Рис. 5. Структура гена гентингина (*HTT*). Схематически показана локализация CAG-повторов в первом экзоне этого гена.

ленных” клеток для клеточной терапии этого тяжелого и неизлечимого в настоящее время заболевания [90–92].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фундаментальные исследования по редактированию генома показали целесообразность использования этой мощной технологии в качестве интервенционного инструмента для лечения нейродегенеративных заболеваний. Учитывая, что многочисленные усилия по поиску лекарств от нейродегенеративных заболеваний, хотя и показали многообещающие результаты в исследованиях на лабораторных животных, однако они часто терпели неудачу в испытаниях на людях. Кроме того, хотя эти модели обеспечили лучшее понимание механизмов патогенеза нейродегенеративных заболеваний *in vivo*, они часто ограничены отсутствием специфической дегенерации нейронов и не могут воспроизвести прогрессирование заболевания и особенности двигательных расстройств. Более перспективными для этой цели могут служить крупные животные, особенно похожие на людей нечеловекообразные приматы. Эти животные позволяют воспроизводить основные нейропатологические проявления, присущие человеку, которые могут не наблюдаться при использовании в качестве моделей грызунов. Из-за сходства физиологии, анатомии и поведения нечеловекообразных приматов с людьми они полезны для поиска эффективных терапевтических мишеней и терапевтических средств для лечения нейродегенеративных расстройств [93].

Вместе с тем, существует настоятельная необходимость изучения нейродегенеративных процессов в модельных системах на основе клеток человека. Появление технологии ИПСК имеет большие перспективы для преодоления существующих ограничений. Эта технология совместно с технологией CRISPR/Cas9, уже начала давать принципиально новые данные о патологических механизмах, лежащих в основе нейродегенеративных заболеваний, и обещает продвинуть вперед исследования как в области нейродегенерации, так и за ее пределами. На сегодняшний день основные достижения и надежды, возлагаемые на эти технологии, связаны главным образом с углублением нашего понимания ключевых нейропатоло-

гических процессов и с поиском генов-мишеней для терапевтического воздействия на них.

Следует, однако, заметить, что современные подходы к редактированию генов имеют существенные ограничения по практическому применению. Во-первых, удаление или полная инактивация отдельных генов, скорее всего, окажет пагубное воздействие на физиологию клеток, поскольку большинство генов играют в организме определенную роль. Во-вторых, стратегии, направленные на коррекцию мутаций, применимы только к небольшой доле (<10%) наследственных нейродегенеративных заболеваний. Серьезной проблемой остается также частая нецелевая модификация генома CRISPR-Cas9. Кроме того, для каждой мутации в генах необходим свой подход к редактированию, что еще больше усложняет его практическое использование. Очевидно, что потребуются еще немалые усилия, чтобы сделать технологию редактирования генома безопасной и эффективной для терапевтического применения. В этом отношении может оказаться полезным программируемое редактирование эпигенома, которое является настраиваемым, обратимым, не требует разрывов ДНК и не вызывает клеточную токсичность, связанную со стандартным редактированием генов [94].

Несмотря на важные преимущества, предоставляемые использованием ИПСК человека для исследований нейродегенеративных заболеваний, следует учитывать некоторые недостатки этой модели. Необходимо помнить о существовании соматического мозаицизма, который возникает как *in vivo*, так и в моделях на основе ИПСК [95]. Кроме того, следует иметь в виду, что нейроны, полученные из ИПСК, больше напоминают клетки мозга плода [96]. Поэтому они, по-видимому, лучше моделируют различные аспекты предрасположенности к заболеванию, чем само состояние заболевания. Нейрональные предшественники и нейроны, полученные из ИПСК пациента с нейродегенеративными заболеваниями, скорее всего, могут служить моделями самых ранних форм этих нейропатологий.

Большие перспективы в моделировании нейродегенеративных заболеваний связывают сегодня также с использованием органоидов — самоорганизующихся моделей нервных тканей *in vitro* [97]. В отличие от 2D модели на основе ИПСК 3D модель церебральных органоидов может быть более эффективной для изучения механизмов возникновения различных нейропатологий и для скрининга лекарств. Предполагается, что в дальнейшем эта модель будет усовершенствована в результате увеличения клеточного разнообразия в органоидах за счет включения в нее нескольких типов глиальных клеток и сосудистой сети.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 21-15-00103.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dugger B.N., Dickson D.W. // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2017. V. 9. № 7. P. a028035. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028035>
2. Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. // Science. 2013. V. 339. № 6121. P. 819–823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
3. Kampmann M. // Nat. Rev. Neurol. 2020. V. 16. № 9. P. 465–480. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-0373-z>
4. Penney J., Ralvenius W.T., Tsai L.-H. // Mol. Psychiatry. 2020. V. 25. № 1. P. 148–167. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0468-3>
5. de Lau L.M., Breteler M.M. // Lancet Neurol. 2006. V. 5. № 6. P. 525–535. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70471-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70471-9)
6. Jankovic J. // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 2008. V. 79. № 4. P. 368–376.
7. Elbaz A., Carcaillon L., Kab S., Moisan F. // Rev. Neurol. (Paris). 2016. V. 172. № 1. P. 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2015.09.012>
8. Левин О.С., Федорова Н.В. // Болезнь Паркинсона. 7-е изд. М.: МЕДпресс-информ, 2017. 384 с.
9. Shulman J.M., De Jager P.L., Feany M.B. // Annu. Rev. Pathol. 2011. V. 6. P. 193–222.
10. Иллариошкин С.Н., Хаспеков Л.Г., Гривенников И.А. // Моделирование болезни Паркинсона с использованием индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Монография. М.: Соверо-пресс, 2016. 183 с.
11. Blauwendraat C., Nalls M.A., Singleton A.B. // Lancet Neurol. 2020. V. 19. P. 170–178.
12. Shadrina M.I., Slominsky P.A., Limborska S.A. // International Review of Cell and Molecular Biology. 2010. V. 281. P. 229–266. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(10\)81006-8](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(10)81006-8)
13. Sanders L.H., Laganieri J., Cooper O., Mak S.K., Vu B.J., Huang Y.A., Paschon D.E., Vangipuram M., Sundararajan R., Urnov F.D., Langston J.W., Gregory P.D., Zhang H.S., Greenamyre J.T., Isacson O., Schüle B. // Neurobiol. Dis. 2014. V. 62. P. 381–386. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.10.013>
14. Reinhardt P., Schmid B., Burbulla L.F., Schöndorf D.C., Wagner L., Glatz M., Höing S., Hargus G., Heck S.A., Dhingra A., Wu G., Müller S., Brockmann K., Kluba T., Maisel M., Krüger R., Berg D., Tsytysyura Y., Thiel C.S., Psathaki O.-E., Klingauf J., Kuhlmann T., Klewin M., Müller H., Gasser T., Schöler H.R., Sterneckert J. // Cell Stem Cell. 2013. V. 12. P. 354–367. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.01.008>
15. Qing X., Walter J., Jarazo J., Arias-Fuenzalida J., Hillje A.-L., Schwamborn J.C. // Stem Cell Res. 2017. V. 24. P. 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.08.013>
16. Ветчинова А.С., Иллариошкин С.Н., Новосадова Е.В., Абрамичева Н.Ю., Хаспеков Л.Г., Гривенников И.А. // Сибирское медицинское обозрение. 2017. V. 4. P. 53–58. <https://doi.org/10.20333/2500136-2017-4-53-58>

17. Vermilyea S.C., Babinski A., Tran N., To S., Guthrie S., Kluss J.H., Schmidt J.K., Wiep J.G., Meyer M.G., Murphy M.E., Cookson M.R., Emborg M.E., Golos T. G. // *Sci. Reps.* 2020. V. 10. P. 3447–3461. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60273-2>
18. Funayama M., Hasegawa K., Kowa H. // *Ann. Neurol.* 2002. V. 51. P. 296–301.
19. Potting C., Crochemore C., Moretti F., Nigsch F., Schmidt I., Manneville C., Carbone W., Knehr J., De Jesus R., Lindeman A., Maher R., Russ C., McAllister G., Reece-Hoyes J.S., Hoffman G.R., Roma G., Müller M., Sailer A.W., Helliwell S.B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018. V. 115. P. E180–E189. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711023115>
20. Arias-Fuenzalida J., Jarazo J., Qing X., Walter J., Gomez-Giro G., Nickels S.L., Zaehres H., Schöler H.R., Schwamborn J.C. // *Stem Cell Reports.* 2017. V. 9. P. 1423–1431. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.08.026>
21. Chen Y., Dolt K.S., Kriek M., Baker T., Downey P., Drummond N.J., Canham M.A., Natalwala A., Rosser S., Kunath T. // *Eur. J. Neurosci.* 2019. V. 49. P. 510–524. <https://doi.org/10.1111/ejn.14286>
22. Song C., Charli A., Luo J., Zainab Riaz Z., Jin H., Anantharam V., Kanthasamy A., Kanthasamy A.G. // *Toxicol. Sci.* 2019. V. 169. № 2. P. 333–352. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz049>
23. Kantor B., Tagliafierro L., Gu J., Zamora M.E., Ilich E., Grenier C., Huang Z.Y., Murphy S., Chiba-Falek O. // *Mol. Ther.* 2018. V. 26. P. 2638–2649. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.08.019>
24. Guhathakurta S., Kim J., Adams L., Basu S., Song M.K., Adler E., Je G., Fiadeiro M.B., Kim Y.S. // *EMBO Mol. Med.* 2021. V. 13. P. e12188. <https://doi.org/10.15252/emmm.202012188>
25. Coccia E., Ahfeldt T. // *Stem Cell Res. Ther.* 2021. V. 12. P. 253–264. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02326-5>
26. Alzheimer's Association (2019) // *Alzheimers Dement.* 2019. V. 15. P. 321–387. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.01.010>
27. Drachman D.A., Leavitt J. // *Arch. Neurol.* 1974. V. 30. № 2. P. 113–121. <https://doi.org/10.1001/archneur.1974.00490320001001>
28. Heilig E.A., Gutti U., Tai T., Shen J., Kelleher R.J. // *J. Neurosci.* 2013. V. 33. № 28. P. 11606–11617.
29. Swerdlow R.H. // *J. Alzheimers Dis.* 2018. 62. № 3. P. 1403–1416.
30. Татарникова О.Г., Орлов М.А., Бобкова Н.В. // *Успехи биологической химии.* 2015. Т. 55. С. 351–390.
31. Soria Lopez J.A., González H.M., Léger G.C. // *Handb. Clin. Neurol.* 2019. V. 167. P. 231–255. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804766-8.00013-3>
32. Karch C.M., Goate A.M. // *Biol. Psychiatry.* 2015. V. 77. № 1. P. 43–51.
33. Barman N.C., Khan N.M., Islam M., Nain Z., Roy R.K., Haque A., Barman S.K. // *Neurol. Ther.* 2020. V. 9. № 2. P. 419–434. <https://doi.org/10.1007/s40120-020-00218-z>
34. Chartier-Harlin M.C., Crawford F., Houlden H., Warren A., Hughes D., Fidani L., Goate A., Rossor M., Roques P., Hardy J. // *Nature.* 1991. V. 353. № 6347. P. 844–846. <https://doi.org/10.1038/353844a0>
35. Mullan M., Crawford F., Axelman K., Houlden H., Lilius L., Winblad B., Lannfelt L. // *Nat. Genet.* 1992. V. 1. № 5. P. 345–347. <https://doi.org/10.1038/ng0892-345>
36. Selkoe D.J., Hardy J. // *EMBO Mol. Med.* 2016. V. 8. № 6. P. 595–608. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606210>
37. Ortiz-Virumbrales M., Moreno C.L., Kruglikov I., Marazuela P., Sproul A., Jacob S., Zimmer M., Paull D., Zhang B., Schadt E.E., Ehrlich M.E., Tanzi R.E., Arancio O., Noggle S., Gandy S. // *Acta Neuropathol. Commun.* 2017. V. 5. № 1. P. 1–20. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0475-z>
38. György B., Lööv C., Zaborowski M.P., Takeda S., Kleinstiver B.P., Commins C., Kastanenka K., Mu D., Volak A., Giedraitis V., Lannfelt L., Maguire C.A., Joung J.K., Hyman B.T., Breakefield X.O., Ingelsson M. // *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2018. V. 11. P. 429–440. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.03.007>
39. Sun J., Carlson-Stevermer J., Das U., Shen M., Delenclos M., Snead A.M., Koo S.Y., Wang L., Qiao D., Loi J., Petersen A.J., Stockton M., Bhattacharyya A., Jones M.V., Zhao X., McLean P.J., Sproul A.A., Saha K., Roy S. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 53. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07971-8>
40. Guyon A., Rousseau J., Bégin F.G., Bertin T., Lamothe G., Tremblay J.P. // *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2021. V. 24. P. 253–263. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.02.032>
41. Pimenova A.A., Goate A.M. // *Neurobiol. Dis.* 2020. V. 138. P. 104785. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104785>
42. Park H., Oh J., Shim G., Cho B., Chang Y., Kim S., Baek S., Kim H., Shin J., Choi H. // *Nat. Neurosci.* 2019. V. 22. № 4. P. 524–528.
43. Wong E., Liao G.P., Chang J.C., Xu P., Li Y.M., Greengard P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019. V. 116. № 13. P. 6385–6390. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820160116>
44. Naseri N.N., Wang H., Guo J., Sharma M., Luo W. // *Neurosci. Lett.* 2019. V. 705. P. 183–194. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.04.022>
45. Duan L., Hu M., Tamm J.A., Grinberg Y.Y., Shen F., Chai Y., Xi H., Gibilisco L., Ravikumar B., Gautam V., Karran E., Townsend M., Talanian R.V. // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. № 1. P. 2879. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82658-7>
46. Eisenstein M. // *Nature.* 2011. V. 475. № 7355. P. 20–22. <https://doi.org/10.1038/475S20a>
47. Komor A.C., Kim Y.B., Packer M.S., Zuris J.A., Liu D.R. // *Nature.* 2016. V. 533. № 7603. P. 420–424. <https://doi.org/10.1038/nature17946>
48. Wang C., Najm R., Xu Q., Jeong D.E., Walker D., Balestra M.E., Yoon S.Y., Yuan H., Li G., Miller Z.A., Miller B.L., Malloy M.J., Huang Y. // *Nat. Med.* 2018. V. 24. № 5. P. 647–657. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0004-z>
49. Lin Y.-T., Seo J., Gao F., Feldman H.M., Wen H.-L., Penney J., Cam H.P., Gjonneska E., Raja W.K., Cheng J., Rueda R., Kritskiy O., Abdurrob F., Peng Z., Milo B., Yu C.J., Elmsaouri S., Dey D., Ko T., Yankner B.A., Tsai L.-H. // *Neuron.* 2018. V. 98. № 6. P. 1141–1154. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.05.008e7>
50. Sullivan S.E., Liao M., Smith R.V., White C., Lagomarsino V.N., Xu J. // *Hum. Mol. Genet.* 2019. V. 28. № 5. P. 718–735.

51. Van Acker Z.P., Bretou M., Annaert W. // *Mol. Neurodegener.* 2019. V. 14. № 1. P. 20–39.
<https://doi.org/10.1186/s13024-019-0323-7>
52. Rogaev E., Meng Y., Lee J.H., Gu Y., Kawarai T., Zou F., Katayama T., Baldwin C.T., Cheng R., Hasegawa H., Chen F., Shibata N., Lunetta K.L., Pardossi-Piquard R., Bohm C., Wakutani Y., Cupples L.A., Cuenco K.T., Green R.C., Pinessi L., Rainero I., Sorbi S., Bruni A., Duara R., Friedland R.P., Inzelberg R., Hampe W., Bujo H., Song Y.Q., Andersen O.M., Willnow T.E., Graff-Radford N., Petersen R.C., Dickson D., Der S.D., Fraser P.E., Schmitt-Ulms G., Younkin S., Mayeux R., Farrer L.A., St George-Hyslop P. // *Nat. Genet.* 2007. V. 39. № 2. P. 168–177.
<https://doi.org/10.1038/ng1943>
53. Knupp A., Mishra S., Martinez R., Braggini J.E., Szabo M., Kinoshita C., Hailey D.W., Small S.A., Jayadev S., Young J.E. // *Cell Rep.* 2020. V. 31. № 9. P. 107719.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107719>
54. Raikwar S.P., Thangavel R., Dubova I., Selvakumar G.P., Ahmed M.E., Kempuraj D., Zaheer S.A., Iyer S.S., Zaheer A. // *Mol. Neurobiol.* 2019. V. 56. № 1. P. 378–393.
<https://doi.org/10.1007/s12035-018-1068-y>
55. McQuade A., Blurton-Jones M. // *J. Mol. Biol.* 2019. V. 431. № 9. P. 1805–1817.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.01.045>
56. McQuade A., Kang Y.J., Hasselmann J., Jairaman A., Sotelo A., Coburn M., Shabestari S.K., Chadarevian J.P., Fote G., Tu C.H., Danhash E., Silva J., Martinez E., Cotman C., Prieto G.A., Thompson L.M., Steffan J.S., Smith I., Davtyan H., Cahalan M., Cho H., Blurton-Jones M. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 5370–5386.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-19227-5>
57. Hampel H., Mesulam M.M., Cuervo A.C., Farlow M.R., Giacobini E., Grossberg G.T., Khachaturian A.S., Vergallo A., Cavado E., Snyder P.J., Khachaturian Z.S. // *Brain.* 2018. V. 141. № 7. P. 1917–1933.
<https://doi.org/10.1093/brain/awy132>
58. Kiernan M.C., Vucic S., Cheah B.C., Turner M.R., Eisen A., Hardiman O., Burrell J.R., Zoing, M.C. // *The Lancet.* 2011. V. 377. № 9769. P. 942–955.
[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(10\)61156-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(10)61156-7)
59. Nguyen H.P., Broeckhoven C.V., van der Zee J. // *Trends Genet.* 2018. V. 34. P. 404–423.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.03.001>
60. Yun Y., Ha Y. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 11. P. 3801–3815.
<https://doi.org/10.3390/ijms21113801>
61. 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., McCluskey L.F., Miller B.L., Masliah E., Mackenzie I.R., Feldman H., Feiden W., Kretzschmar H.A., Trojanowski J.Q., Lee V.M.-Y. // *Science.* 2006. V. 314. № 5796. P. 130–133.
62. Mitra J., Guerrero E.N., Hegde P.M., Liachko N.F., Wang H., Vasquez V., Gao J., Pandey A., Taylor J.P., Kraemer B.C., Wu P., Boldogh I., Garruto R.M., Mitra S., Rao K.S., Hegde M.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2019. V. 116. № 10. P. 4696–4705.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1818415116>
63. Tann J.Y., Wong L.W., Sajikumar S., Ibáñez C.F. // *EMBO J.* 2019. V. 38. № 5. P. e100989.
<https://doi.org/10.15252/embj.2018100989>
64. Mori K., Weng S.M., Arzberger T., May S., Rentzsch K., Kremmer E., Schmid B., Kretzschmar H.A., Cruts M., Van Broeckhoven C., Haass C., Edbauer D. // *Science.* 2013. V. 339. P. 1335–1338.
65. Pribadi M., Yang Z., Kim T.S., Swartz E.W., Huang A.Y., Chen J.A., Dokuru D., Baek J., Gao F., Fua A.T. // *J. bioRxiv.* 2016. P. 051193.
<https://doi.org/10.1101/051193>
66. Selvaraj B.T., Livesey M.R., Zhao C., Gregory J.M., James O.T., Cleary E.M., Chouhan A.K., Gane A.B., Perkins E.M., Dando O., Lillico S.G., Lee Y.B., Nishimura A.L., Poreci U., Thankamony S., Pray M., Vasistha N.A., Magnani D., Borooah S., Burr K., Story D., McCampbell A., Shaw C.E., Kind P.C., Aitman T.J., Whitelaw C.B.A., Wilmut I., Smith C., Miles G.B., Hardingham G.E., Wyllie D.J.A., Chandran S. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. P. 347–360.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-02729-0>
67. Kramer N.J., Haney M.S., Morgens D.W., Jovičić A., Couthouis J., Li A., Ousey J., Ma R., Bieri G., Tsui C.K., Shi Y., Hertz N.T., Tessier-Lavigne M., Ichida J.K., Bassik M.C., Gitler A.D. // *Nat. Genet.* 2018. V. 50. № 4. P. 603–612.
<https://doi.org/10.1038/s41588-018-0070-7>
68. Boillée S., Velde C.V., Cleveland D.V. // *Neuron.* 2006. V. 52. № 1. P. 39–59.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.018>
69. Ilieva H., Polymenidou M., Cleveland D.W. // *J. Cell Biol.* 2009. V. 187. № 6. P. 761–772.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200908164>
70. Zhao C., Devlin A.C., Chouhan A.K., Selvaraj B.T., Stavrou M., Burr K., Brivio V., He X., Mehta A.R., Story D., Shaw C.E., Dando O., Hardingham G.E., Miles G.B., Chandran S. // *Glia.* 2020. V. 68. № 5. P. 1046–1064.
<https://doi.org/10.1002/glia.23761>
71. Rosen D.R., Siddique T., Patterson D., Figlewicz D.A., Sapp P., Hentati A., Donaldson D., Goto J., O'Regan J.P., Deng H.X. // *Nature.* 1993. V. 362. № 6415. P. 59–62.
<https://doi.org/10.1038/362059a0>
72. Kaur S.J., McKeown S.R., Rashid S. // *Gene.* 2016. V. 577. № 2. P. 109–118.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.11.049>
73. Wang L., Yi F., Fu L., Yang J., Wang S., Wang Z., Suzuki K., Sun L., Xu X., Yu Y. // *Protein Cell.* 2017. V. 8. P. 365–378.
<https://doi.org/10.1007/s13238-017-0397-3>
74. Bhinge A., Namboori S.C., Zhang X., VanDongen A.M.J., Stanton L.W. // *Stem Cell Rep.* 2017. V. 8. P. 856–869.
<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.02.019>
75. Imamura K., Izumi Y., Watanabe A., Tsukita K., Wolijien K., Yamamoto T., Hotta A., Kondo T., Kitaoka S., Ohta A. // *Sci. Transl. Med.* 2017. V. 9. P. eaaf3962.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf3962>
76. Lutz C. // *Brain Research.* 2018. V. 1693. P. 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.03.024>
77. Philips T., Rothstein J.D. // *Curr. Protoc. Pharmacol.* 2015. V. 69. P. 5.67.1–5.67.21.
<https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0567s69>
78. Duan W., Guo M., Yi L., Liu Y., Li Z., Ma Y., Zhang G., Liu Y., Bu H., Song X., Li C. // *Gene Ther.* 2020. V. 27. № 3–4. P. 157–169.
<https://doi.org/10.1038/s41434-019-0116-1>
79. Deng H.X., Zhai H., Shi Y., Liu G., Lowry J., Liu B., Ryan E.B., Yan J., Yang Y., Zhang N., Yang Z., Liu E., Ma Y.C., Siddique T. // *Commun. Biol.* 2021. V. 4. № 1. P. 396–406.
<https://doi.org/10.1038/s42003-021-01942-4>

80. Sharma A., Lyashchenko A.K., Lu L., Nasrabad S.E., Elmaleh M., Mendelsohn M., Nemes A., Tapia J.C., Mentis G.Z., Shneider N.A. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 10465–10478. <https://doi.org/10.1038/ncomms10465>
81. Guo W., Naujock M., Fumagalli L., Vandoorne T., Baatsen P., Boon R., Ordovás L., Patel A., Welters M., Vanwelden T., Geens N., Tricot T., Benoy V., Steyaert J., Lefebvre-Omar C., Boesmans W., Jarpe M., Sterneckert J., Wegner F., Petri S., Bohl D., Vanden Berghe P., Robberecht W., Van Damme P., Verfaillie C., Van Den Bosch L. // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. № 1. P. 861–875. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00911-y>
82. Walker F.O. // *Lancet* 2007; 369 (9557), 218–228. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60111-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60111-1)
83. Bates G.P., Dorsey R., Gusella J.F., Hayden M.R., Kay C., Leavitt B.R., Nance M., Ross C.A., Scahill R.I., Wetzel R., Wild E.J., Tabrizi S.J. // *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2015. V. 1. P. 15005. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.5>
84. Kay C., Collins J.A., Miedzybrodzka Z., Madore S.J., Gordon E.S., Gerry N., Davidson M., Slama R.A., Hayden M.R. // *Neurology.* 2016. V. 87. № 3. P. 282–288. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002858>
85. An M.C., Zhang N., Scott G., Montoro D., Wittkop T., Mooney S., Melov S., Ellerby L.M. // *Cell Stem Cell.* 2012. V. 11. P. 253–263.
86. An M.C., O'Brien R.N., Zhang N., Patra B.N., Cruz La De M., Ray, A., Ellerby L.M. // *PLoS Curr.* 2014. V. 6. <https://doi.org/10.1371/currents.hd.0242d2e7ad72225-efa72f6964589369a>
87. Xu X., Tay Y., Sim B., Yoon Su-In, Huang Y., Ooi J., Utami K.H., Ziaei A., Ng B., Radulescu C., Low D., Ng A.Y.J., Loh M., Venkatesh B., Ginhoux F., Augustine G.J., Pouladi M.A. // *Stem Cell Reports.* 2017. V. 8. P. 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.01.022>
88. Ooi J., Langley S.R., Xu X., Utami K.H., Sim B., Huang Y., Harmston N.P., Tay Y.L., Ziaei A., Zeng R. // *Cell Rep.* 2019. V. 26. № 9. P. 2494–2508.
89. Malankhanova T., Suldina L., Grigor'eva E., Medvedev S., Minina J., Morozova K., Kiseleva E., Zakian S., Malakhova A. // *J. Pers. Med.* 2020. V. 10. № 4. P. 215. <https://doi.org/10.3390/jpm10040215>
90. Shin J.W., Kim K.H., Chao M.J., Atwal R.S., Gillis T., MacDonald M.E., Gusella J.F., Lee J.-M. // *Hum. Mol. Genet.* 2016. V. 25. № 20. P. 4566–4576. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw286>
91. Monteys A.M., Ebanks S.A., Keiser M.S., Davidson B.L. // *Mol. Ther.* 2017. V. 25. P. 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2016.11.010>
92. Dabrowska M., Juzwa W., Krzyzosiak W.J., Olejniczak M. // *ront. // Neurosci.* 2018. V. 12. P. 75. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00075>
93. Barazesh M., Mohammadi S., Bahrami Y., Mokarram P., Morowvat M.H., Saidijam M., Karimipoor M., Kavousipour S., Vosoughi A.R., Khanaki K. // *Current Gene Therapy.* 2021. V. 21. № 2. P. 130–148. <https://doi.org/10.2174/1566523220666201214115024>
94. Nuñez J.K., Chen J., Pommier G.C., Cogan J.Z., Replogle J.M., Adriaens C., Ramadoss G.N., Shi Q., Hung K.L., Samelson A.J., Pogson A.N., Kim J.Y.S., Chung A., Leonetti M.D., Chang H.Y., Kampmann M., Bernstein B.E., Hovestadt V., Gilbert L.A., Weissman J.S. // *Cell.* 2021. V. 184. № 9. P. 2503–2519. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.025>
95. McConnell M.J., Lindberg M.R., Brennand K.J., Piper J.C., Voet T., Cowing-Zitron C., Shumilina S., Lasken R.S., Vermeesch J.R., Hall I.M., Gage F.H. // *Science.* 2013. V. 342. № 6158. P. 632–637. <https://doi.org/10.1126/science.1243472>
96. Vera E., Studer L. // *Development.* 2015. V. 142. № 18. P. 3085–3089. <https://doi.org/10.1242/dev.1206670>
97. Wray S. // *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2021. V. 111. P. 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.05.012>

Genome Edition Technology for the Study and Correction of Neurodegenerative Diseases

I. A. Grivennikov^a and V. Z. Tarantul^a

^a*Federal State Budgetary Organization Institute of Molecular Genetics of the National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia*

The progress of science is largely associated with the emergence of new technologies. One of such breakthrough technologies, created at the beginning of the XXI century, are various variants of genomic editing, among which the simplest and most effective is the technology based on the use of short palindromic repeats regularly arranged in groups (CRISPR). Another important technology was the production of induced pluripotent stem cells (iPSC). The joint use of these two technologies has significantly increased the possibilities of precise manipulation with genome for the study of the molecular and genetic bases of various pathologies, the search for target genes and, in future, for practical application in the therapeutic effect on a variety of severe hereditary diseases. This approach has proved extremely useful for studying human neuropathologies, especially given the fact that numerous therapeutic agents that have their effectiveness in models of such diseases in rodents have not brought benefits to sick people. This review summarizes the main results of recent years on genetic and epigenetic edition of the genome, obtained mainly using various variants of the CRISPR/Cas9 technology on iPSC models and cultured somatic cells of patients with severe neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease and amyotrophic lateral sclerosis.

Keywords: CRISPR/Cas9 technology, induced pluripotent stem cells, amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, Huntington's disease

УДК 577.24:602.9

СОЗДАНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЕЙ НАСЛЕДСТВЕННЫХ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ПОМОЩЬЮ НАПРАВЛЕННОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ

© 2021 г. С. П. Медведев^{1, 2, 3, *}, Т. Б. Маланханова^{1, 2, 3}, К. Р. Валетдинова^{1, 3}, С. М. Закиян^{1, 2, 3}

¹ФГБНУ “Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН”, Новосибирск, Россия

²ФГБУН “Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН”, Новосибирск, Россия

³ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина”

Минздрава России, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 19.05.2021 г.

После доработки 20.05.2021 г.

Принята к публикации 21.05.2021 г.

Нейродегенеративные заболевания занимают значительную долю в структуре заболеваемости по всему миру. В частности, в связи с увеличением среднего возраста населения в большинстве развитых стран, резко возрастает доля пациентов с такими диагнозами, как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона. Существующие методы лечения носят преимущественно симптоматический характер и, позволяя в ряде случаев добиться выраженного клинического эффекта, не могут пока предотвратить продолжающуюся гибель нейронов или обратить вспять нейродегенеративный процесс. Во многом эти проблемы связаны и с недостаточным пониманием молекулярно-генетических механизмов, которые лежат в основе патогенеза, а также с отсутствием моделей, позволяющих получать не только качественные, но и количественные данные о процессах, происходящих в нейронах пациентов. Развитие технологий индуцированной плюрипотентности, направленной дифференцировки плюрипотентных клеток, а также редактирования генов с помощью программируемых нуклеаз, позволяет существенно расширить арсенал исследовательских инструментов, особенно в области поиска новых мишеней для лекарственной и генной терапии.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, клеточные модели, CRISPR–Cas9

DOI: 10.31857/S1027813321040075

ВВЕДЕНИЕ

Клеточные технологии являются одним из основных и наиболее динамично развивающихся направлений современной биомедицины и имеют огромный потенциал применения в фармакологии, токсикологии и регенеративной медицине. Клетки, культивируемые в лабораторных условиях, активно используются для тестирования новых лекарственных соединений на ранних этапах их разработки [1, 2]. На сегодняшний день в фармакологических исследованиях используются первичные культуры соматических клеток человека, трансгенные соматические клетки, моделирующие то или иное заболевание в условиях *in vitro*, а также многочисленные модельные линии клеток лабораторных животных и сами животные [3–7]. Однако перечисленные выше модели имеют значительные ограничения в использовании. Жи-

вотные и их клетки, используемые в исследованиях свойств лекарственных веществ, значительно отличаются по своей генетике, физиологии, морфологии от человека и клеток его тела [8]. Трансгенные клетки человека, получаемые на основе таких перевиваемых линий как HEK293 или HeLa, как правило, также не позволяют полноценно смоделировать патогенез заболевания, существующего *in vivo* [9–11]. Кроме того, существует серьезная проблема получения культур специфических типов соматических клеток, то есть именно тех типов клеток, на которых проявляется основной патологический эффект при том или ином заболевании. Например, получение культур дофаминэргических нейронов (гибнут при болезни Паркинсона), моторных нейронов (спинальная мышечная атрофия, боковой амиотрофический склероз), кардиомиоцитов (синдром удлиненной QT-фазы сердечного ритма и другие сердечно-сосудистые заболевания) является процедурой высокоинвазивной, а иногда просто невозможной. Кроме того, соматические клетки часто имеют

* Адресат для корреспонденции: 630090 Россия, Новосибирск, пр-т академика Лаврентьева, д. 10; тел.: +7 (383) 363-49-63*1035; e-mail: medvedev@bionet.nsc.ru.

ограниченный потенциал выживания и пролиферации в культуре, что затрудняет получение значительной массы клеток для тестирования библиотек потенциальных лекарственных соединений, которые могут состоять из десятков и сотен тысяч веществ [12].

Все перечисленные выше проблемы снижают уровень достоверности результатов исследований, что, в свою очередь, способствует росту ложноположительных или ложноотрицательных результатов всего цикла тестирования конкретного лекарственного соединения. Рост ошибочных результатов в фармакологии, как правило, связан со значительными экономическими потерями. Выходом из данной ситуации может стать использование универсальных или плюрипотентных клеток, которые способны неограниченно культивироваться и давать в результате дифференцировки необходимые для исследований клеточные производные. Создание клеточных платформ, которые совмещают в себе трансгенные клеточные линии для проведения направленного нокаута генов, выявления роли однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) и количественного измерения происходящих в клетках патологических процессов, может существенно расширить наши представления о молекулярно-генетических механизмах патогенеза заболеваний, найти новые мишени для лекарственной и генной терапии, а также проводить скрининговые исследования перспективных лекарственных соединений.

ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

В 2006 году произошло революционное событие для всей клеточной биологии. Группой японских исследователей было обнаружено, что соматические клетки мыши могут быть подвергнуты перепрограммированию путем сверхэкспрессии набора определенных факторов (Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc) [13]. Позже несколькими группами ученых были получены подобные клетки человека [14–16]. Полученные клетки, которые по своим свойствам были очень сходны с эмбриональными стволовыми клетками, были названы индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (ИПСК). Данное открытие привлекло огромное внимание мирового научного сообщества, так как в руках исследователей появился уникальный инструмент, который может быть использован в различных фундаментальных и прикладных исследованиях, включающих изучение биологии развития человека, моделирование заболеваний и доклинические испытания в лабораторных условиях, а также применение ИПСК в заместительной терапии.

ИПСК человека имеют ряд существенных преимуществ в контексте применения в доклини-

ческих испытаниях потенциальных лекарственных соединений:

- ИПСК могут быть получены из различных типов соматических клеток человека (от фибробластов кожи до клеток периферической крови). Методики получения соматических клеток, пригодных для получения ИПСК, как правило, являются малоинвазивными [14, 17–19];

- по своим свойствам ИПСК очень сходны с эмбриональными стволовыми клетками человека, являются плюрипотентными, то есть могут давать при дифференцировке практически все производные, из которых состоит тело взрослого человека [14–17, 20];

- ИПСК обладают неограниченным потенциалом пролиферации в культуре и при необходимости могут быть получены в масштабе, необходимом для проведения скрининга библиотек лекарственных соединений [21];

- ИПСК аутологичны по отношению к донору соматических клеток. Они могут быть получены от конкретного пациента в любой период его жизни, что дает возможность поиска лекарств и исследования их возможных токсических свойств на клетках пациентов с конкретным генетическим фоном. Данное свойство ИПСК может сделать их одной из основ медицины нового поколения, так называемой персонифицированной медицины [22];

- Применение ИПСК дает новые возможности исследования патогенеза и поиска лекарств для терапии комплексных заболеваний, которые захватывают не один тип клеток. Например, из ИПСК, полученных из клеток одного пациента, могут быть получены нейроны, кардиомиоциты, гепатоциты и другие типы дифференцированных клеток. Таким образом, становится возможным исследование действия лекарственных соединений на клетки с разными молекулярно-генетическими, физиологическими и биохимическими характеристиками, в то же время полученными от одного пациента [22–26].

Несмотря на значительный прогресс в создании клеточных моделей заболеваний на основе ИПСК, в исследованиях пациент-специфичных ИПСК ученые сталкиваются с несколькими проблемами. Во-первых, невозможно подобрать полностью адекватный “здоровый” контроль для исследования дифференцировки и оценки влияния различных воздействий на клетки. Контрольные клетки, полученные от здоровых людей, имеют другой общий генетический фон. Во-вторых, линии клеток могут отличаться друг от друга по спектру дифференцировки, иметь разную скорость деления и другие индивидуальные особенности, даже если они получены одним методом и в одной лаборатории. Безусловно, данные особенности могут сказываться на точности результатов исследований в целом. В-третьих, существует большая про-

блема, связанная с наличием пациентов, которые могли бы стать донорами соматических клеток. Особенно остро эта проблема стоит, если речь идет о редких наследственных заболеваниях или редких разновидностях мутаций [27]. Кроме того, для работы с пациентами необходим определенный набор разрешений и лицензий. В последние годы активно развиваются технологии направленного редактирования геномов, которые открывают новые, еще более широкие, возможности применения ИПСК в биомедицинских исследованиях и позволяют решить вышеперечисленные проблемы.

CRISPR-ОПОСРЕДОВАННЫЕ СИСТЕМЫ – ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЕЙ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В начале 2013 г. были опубликованы работы, в которых описывалось использование компонентов адаптивной иммунной системы бактерий CRISPR–Cas9 для редактирования геномов млекопитающих [28, 29]. Данная система, обладает высокой эффективностью и специфичностью работы, но при этом отличается простотой создания генетических конструкций. Для создания конструкции, опознающей конкретную последовательность ДНК в геноме, достаточно поместить синтетический фрагмент ДНК длиной около 20 нуклеотидов (спейсер) в специальный вектор, экспрессирующий направляющую РНК (нРНК) и нуклеазу Cas9. Спейсер является частью нРНК, и его последовательность определяет специфичность связывания нРНК с ДНК-мишенью. Связывание осуществляется по принципу комплементарности оснований РНК–ДНК. При этом, нуклеаза Cas9, находящаяся в комплексе с нРНК производит двунитевой разрыв ДНК. Разрывы ДНК, которые были внесены нуклеазой, репарируются по двум основным общим механизмам. Это негомологичное сшивание концов и гомологичная рекомбинация. При негомологичном сшивании концов ДНК, как правило, в месте разрыва образуются небольшие делеции или/и инсерции нуклеотидов, что может приводить к сдвигу рамки считывания генов (если разрыв находится в кодирующей области) и, как следствие, к нокауту гена. Если же репарация идет по механизму гомологичной рекомбинации, а для этого необходима донорная молекула ДНК, то в конкретное место генома может быть помещен трансген или заменен единственный нуклеотид. Этот механизм может с успехом применяться для внесения или исправления генных мутаций, внесения репортерных генов и так далее [28, 29].

С момента первых работ по применению CRISPR–Cas9 для модификации геномов в клетках животных и человека, эта технология претерпела значительное совершенствование. В частности, были созданы новые, генноинженерные варианты

белка Cas9, которые практически не обладают нецелевой активностью, а также найдены альтернативные системы, например, CRISPR–Cpf1 (Cas12a) [30–32].

Прогресс в области создания и применения CRISPR-опосредованных систем открывает широкие перспективы их применения для изучения полигенных нейродегенеративных заболеваний, например, таких как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера или боковой амиотрофический склероз. При исследовании клеточных моделей нейродегенеративных заболеваний данные системы редактирования можно использовать в следующих направлениях:

- Нокаут генов для поиска тех из них, которые задействованы в патогенезе заболеваний напрямую или модифицируют его [33];
- Создание изогенных клеточных моделей [26, 34–36];
- Создание трансгенных клеточных линий, которые предназначены для мониторинга направленной дифференцировки в релевантные типы нейронов, а также получения качественных и количественных данных о происходящих в клетках патологических процессах (апоптоз, окислительный стресс, дисфункция эндоплазматического ретикулума) [37, 38].

ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЕ СЕНСОРЫ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ

Одним из перспективных подходов для исследования молекулярно-генетических механизмов нейродегенерации *in vitro* может быть совмещение технологий создания линий пациент-специфичных ИПСК, редактирования геномов, генетически кодируемых биосенсоров и направленной дифференцировки ИПСК в релевантные типы нейронов. Для этого могут быть применены генетические конструкции, которые могут быть интегрированы в локус *AAT51* ИПСК пациентов и здоровых доноров с применением системы CRISPR–Cas9 [38]. Использование направленной интеграции трансгенов в локус *AAT51*, который относится к так называемым “safe harbor” локусам, позволяет контролировать число копий трансгенов на геном, а также обеспечивает более стабильную экспрессию трансгенов [39]. Генетически кодируемые сенсоры представляют собой искусственно созданные генноинженерные конструкции, которые позволяют визуализировать и получать количественные данные о процессах, происходящих в живых клетках, например, в нейронах, получаемых при направленной дифференцировке ИПСК пациентов с нейродегенеративными заболеваниями [40, 41]. В частности, с помощью сенсоров можно изучать такие процессы, как окислительный стресс и

дисфункция эндоплазматического ретикулума. Высокий уровень метаболизма нейронов подразумевает высокие показатели образования активных форм кислорода (АФК), и соответственно, нейроны должны обладать эффективной системой защиты от них, однако ее становится недостаточно при оксидативном стрессе. Известно, что глутатион является внутриклеточным антиоксидантом, и при развитии патологического процесса показана значительная роль нарушения гомеостаза глутатиона [42]. Например, снижение концентрации глутатиона в митохондриях влечет за собой активацию нейрональной 12-липоксигеназы, что приводит к образованию пероксидов, притоку Ca^{2+} и, в конечном счете, к гибели клеток. Например, при болезни Паркинсона происходит потеря дофаминергических нейронов в черной субстанции головного мозга, а дополнительными источниками окислительного стресса является автоокисление дофамина, которое приводит к образованию АФК, и ферментативное окисление, катализируемое моноаминоксидазой, которое приводит к образованию перекиси водорода. Обычно H_2O_2 инактивируется каталазой или глутатион-S-пероксидазой в реакции, в которой глутатион используется в качестве кофактора. Было показано, что с помощью генетически кодируемых сенсоров возможно получить достаточно чувствительную систему для оценки окислительно-восстановительного потенциала глутатиона в живых клетках. Фермент Gtx1 в конструкции обеспечивает реакции окисления и восстановления белка roGFP2 после взаимодействия с глутатионом. Оценка окислительно-восстановительного потенциала при этом проводится с помощью ратиометрических расчетов уровней возбуждения светом определенной длины волны (405/488 нм) белка roGFP2. Еще одним преимуществом данного подхода является то, что можно применить два типа конструкций (Cyto и Mito), которые позволяют производить независимые измерения в цитоплазме и митохондриях клеток (за счет наличия сигнального пептида, который перенаправляет белок-сенсор в митохондрии). Данные конструкции будут интегрированы под доксициклин-зависимый промотор, чтобы системе можно было активировать на разных стадиях дифференцировки ИПСК в зрелые дофаминергические нейроны. Помимо этого, данная система может быть применена для выявления и тестирования химических соединений, направленных на нормализацию уровня АФК.

Следующий, не менее важный момент, — явление стресса эндоплазматического ретикулума (ЭПР), который вызван накоплением несвернутых, дефектных белков в люмене ЭПР [43]. Данный патофизиологический процесс характерен для большинства нейродегенеративных заболеваний и может быть одной из мишеней для терапевтического воздействия [44–49]. Для формирования

третичной структуры белка важно образование дисульфидных связей, что опосредуется ферментом протеиндисульфид-изомеразы, который в свою очередь активируется окислением. Данный процесс тесно связан с образованием перекиси водорода, в пространстве в котором оказываются вновь синтезированные белки. В ЭПР при этом накапливаются денатурированные или частично свернутые белки в таком случае активируется система Unfolded Protein Response (UPR). UPR может способствовать повышению активности шаперонов и снижению синтеза белка. Этот механизм представлен белками, заякоренными в мембране ЭПР — PERK, IRE1 и ATF6. Показано, что мутация белка паркина приводит к нарушению функции протеасом, и соответственно, к перегрузке ЭПР. Было показано на мышах и на культуре клеток, что можно визуализировать и стресс ЭПР с помощью генетически кодируемых сенсоров.

Для изучения процессов связанных со стрессом ЭПР может быть применена следующая тестовая модель: в локус *AATVSI*, под контролем доксициклин-управляемого промотора производится встройка конструкции XBP1-флуоресцентный белок [50], функционирование которой зависит от активации UPR с через белок IRE1 (в XBP1 эндорибонуклеаза IRE1 будет вырезать 26-нуклеотидный интрон сдвигая рамку считывания белка, тем самым обеспечивая экспрессию той части конструкции, которая кодирует флуоресцентный белок), что позволит визуализировать клетки с активированным белком IRE1. Клетки с активированной системой UPR (имеющие красное свечение) могут быть отсортированы и использованы для более подробного молекулярно-генетического и биохимического исследования. Кроме того, данная система может работать в обратном направлении. Выделенные с помощью сортировки клетки могут применяться для тестирования препаратов, которые направлены на коррекцию нарушений фолдинга белков в ЭПР (рис. 1).

Помимо этого, может быть применена система, в которой ген, кодирующий флуоресцентный белок, заменен геном люциферазы. Это позволит проводить измерения уровня активности люциферазы (который будет прямо пропорционален уровню активации IRE1 и стресс-зависимого сплайсинга мРНК XBP1) в ответ на различные воздействия, в том числе, на действие низкомолекулярных химических соединений. Кроме того, данный вариант сенсора позволяет масштабировать измерения до 96-луночного формата, что существенно повышает производительность и дает возможность скрининга библиотек потенциальных лекарственных препаратов (рис. 1).

Помимо использования взаимодействия IRE1 и XBP1 существуют и другие сенсоры стресса ЭПР, например, основанные на визуализации ак-

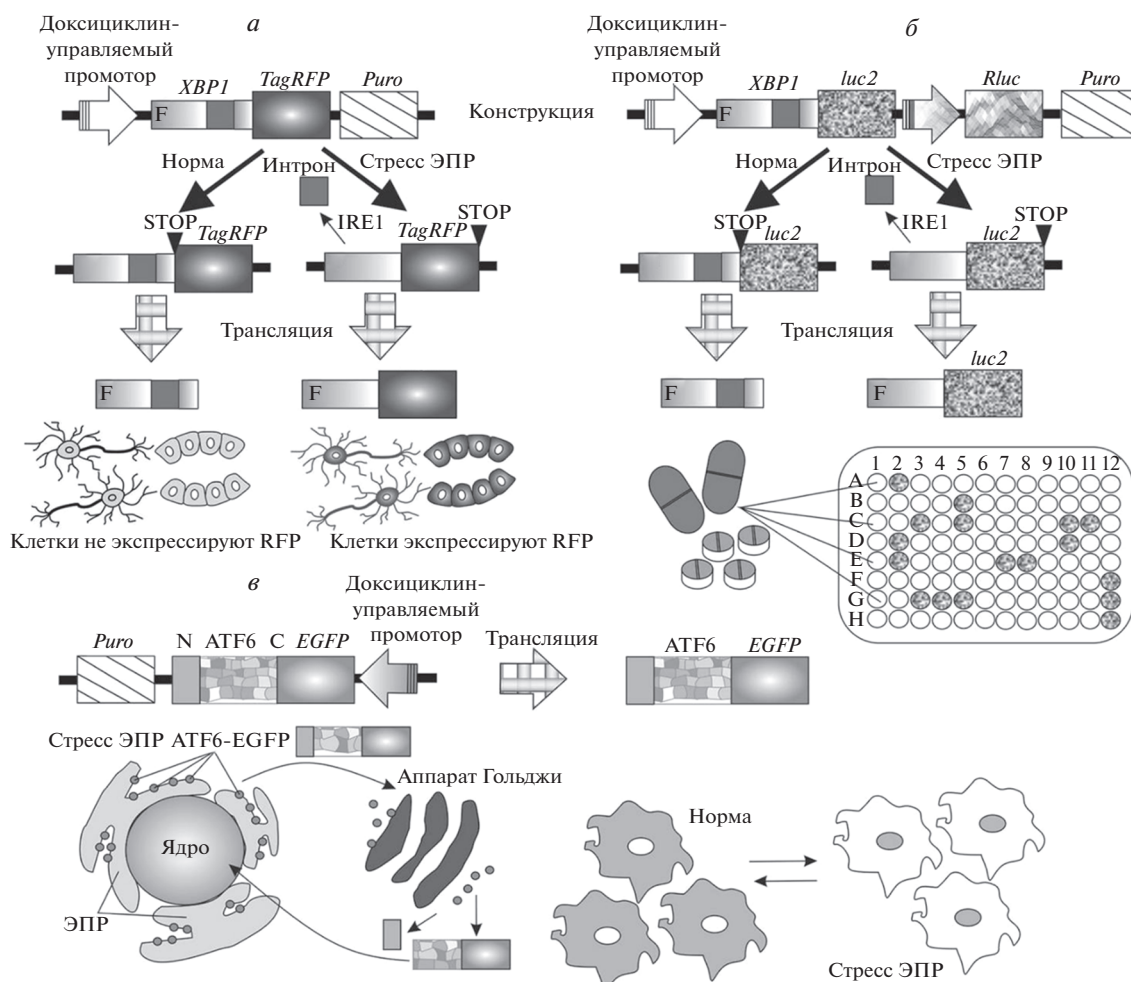


Рис. 1. Схема функционирования генетически кодируемых биосенсоров стресса эндоплазматического ретикула. Схема работы биосенсора XBP1-TagRFP (а). Схема работы биосенсора XBP1-luc2-hRluc (б). Схема работы биосенсора EGFP-ATF6 (в). *XBP1* – фрагмент гена *XBP1*, содержащий стресс-чувствительный интрон размером 26 п.н., *TagRFP* – ген красного флуоресцентного белка, *EGFP* – ген зеленого флуоресцентного белка, *luc2* – ген люциферазы светлячка *Photinus pyralis*, *Rluc* – ген люциферазы кораллового полипа *Renilla reniformis*, *Puro* – ген устойчивости к пуромицину, STOP – стоп-кодон, F – FLAG-эпитоп.

тивации транскрипционного фактора ATF6 (Activating transcription factor 6) [43]. В норме данный белок заякорен в мембране ЭПР. В ответ на стресс он перемещается в аппарат Гольджи, где подвергается протеолизу, активируется и перемещается в ядро клетки. Принцип действия сенсора основан на том, что к белку ATF6 с N-конца присоединен флуоресцентный белок EGFP, который не мешает протеолизу, активации и перемещению ATF6. При этом мы можем наблюдать распространение флуоресцентного сигнала в ядро клеток. Подсчитывая ядра с сигналами на микроизображениях и статистически обрабатывая эту информацию, можно судить о степени выраженности стресса ЭПР (рис. 1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поиск новых, эффективных и безопасных средств терапии нейродегенеративных заболеваний является одним из вызовов современной медицины и фармакологии. Последние достижения клеточной и молекулярной биологии позволяют по-новому взглянуть на создание модельных систем для исследований *in vitro*. Эти системы, на основе трансгенных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, позволяют производить широкий спектр исследований, выявлять тонкие молекулярные механизмы патогенеза, искать и находить мишени для терапевтического воздействия и тестировать потенциальные лекарственные препараты.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана РФФИ в рамках проекта № 19-29-04011 МК.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tralau T., Luch A. // Trends Pharmacol. Sci. 2012. V. 33. P. 353–364.
2. Niu N., Wang L. // Pharmacogenomics. 2015. V. 16. P. 273–285.
3. Feany M.B., Bender W.W. // Nature. 2000. V. 404. P. 394–398.
4. Liu Z., Wang X., Yu Y., Li X., Wang T., Jiang H., Ren Q., Jiao Y., Sawa A., Moran T., Ross C.A., Montell C., Smith W.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. P. 2693–2698.
5. Li T., Yang D., Sushchky S., Liu Z., Smith W.W. // Parkinsons Dis. 2011. V. 2011. P. 942412.
6. Yao C., El Khoury R., Wang W., Byrd T.A., Pehek E.A., Thacker C., Zhu X., Smith M.A., Wilson-Delfosse A.L., Chen S.G. // Neurobiol. Dis. 2010. V. 40. P. 73–81.
7. McGurk L., Berson A., Bonini N.M. // Genetics. 2015. V. 201. P. 377–402.
8. Rosen D.R., Martin-Morris L., Luo L.Q., White K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 2478–2482.
9. Bungeoth M., Appenzeller S., Regulin A., Volker W., Lorenzen I., Grotzinger J., Pendzjwiat M., Kuhlenbaumer G. // Neurobiol. Aging. 2014. V. 35. P. 1913–1919.
10. Dansithong W., Paul S., Scoles D.R., Pulst S.M., Huynh D.P. // PLoS One. 2015. V. 10. P. e0136930.
11. Eckermann K., Kugler S., Bahr M. // Biochim. Biophys. Acta. 2015. V. 1852. P. 1658–1664.
12. Ebert A.D., Svendsen C.N. // Nat. Rev. Drug Discov. 2010. V. 9. P. 367–372.
13. Takahashi K., Yamanaka S. // Cell. 2006. V. 126. P. 663–676.
14. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. // Cell. 2007. V. 131. P. 861–872.
15. Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin, II, Thomson J.A. // Science. 2007. V. 318. P. 1917–1920.
16. Lowry W.E., Richter L., Yachechko R., Pyle A.D., Tehieu J., Sridharan R., Clark A.T., Plath K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. P. 2883–2888.
17. Dimos J.T., Rodolfa K.T., Niakan K.K., Weisenthal L.M., Mitumoto H., Chung W., Croft G.F., Saphier G., Leibel R., Golland R., Wichterle H., Henderson C.E., Eggan K. // Science. 2008. V. 321. P. 1218–1221.
18. Aasen T., Raya A., Barrero M.J., Garreta E., Consiglio A., Gonzalez F., Vassena R., Bilic J., Pekarik V., Tiscornia G., Edel M., Boue S., Izpisua Belmonte J.C. // Nat. Biotechnol. 2008. V. 26. P. 1276–1284.
19. Loh Y.H., Hartung O., Li H., Guo C.G., Sahalie J.M., Manos P.D., Urbach A., Heffner G.C., Grskovic M., Vigneault F., Lensch M.W., Park I.H., Agarwal S., Church G.M., Collins J.J., Irion S., Daley G.Q. // Cell Stem Cell. 2010. V. 7. P. 15–19.
20. Medvedev S.P., Grigor'eva E.V., Shevchenko A.I., Malakhova A.A., Dementyeva E.V., Shilov A.A., Pokushalov E.A., Zaidman A.M., Aleksandrova M.A., Plotnikov E.Y., Sukhikh G.T., Zakian S.M. // Stem Cells Dev. 2011. V. 20. P. 1099–1112.
21. Elitt M.S., Barbar L., Tesar P.J. // Hum Mol Genet. 2018. V. 27. P. R89–R98.
22. Soldner F., Hockemeyer D., Beard C., Gao Q., Bell G.W., Cook E.G., Hargus G., Blak A., Cooper O., Mitalipova M., Isacson O., Jaenisch R. // Cell. 2009. V. 136. P. 964–977.
23. Sanchez-Danes A., Richaud-Patin Y., Carballo-Carbajal I., Jimenez-Delgado S., Caig C., Mora S., Di Guglielmo C., Ezquerro M., Patel B., Giral A., Canals J.M., Memo M., Alberch J., Lopez-Barneo J., Vila M., Cuervo A.M., Tola E., Consiglio A., Raya A. // EMBO Mol. Med. 2012. V. 4. P. 380–395.
24. Sareen D., O'Rourke J.G., Meera P., Muhammad A.K., Grant S., Simpkinson M., Bell S., Carmona S., Ornelas L., Sahabian A., Gendron T., Petrucelli L., Baughn M., Ravits J., Harms M.B., Rigo F., Bennett C.F., Otis T.S., Svendsen C.N., Baloh R.H. // Sci. Transl. Med. 2013. V. 5. P. 208ra149.
25. Juopperi T.A., Kim W.R., Chiang C.H., Yu H., Margolis R.L., Ross C.A., Ming G.L., Song H. // Mol. Brain. 2012. V. 5. P. 17.
26. Malankhanova T., Suldina L., Grigor'eva E., Medvedev S., Minina J., Morozova K., Kiseleva E., Zakian S., Malakhova A. // J. Pers. Med. 2020. V. 10.
27. Soldner F., Laganier J., Cheng A.W., Hockemeyer D., Gao Q., Alagappan R., Khurana V., Golbe L.I., Myers R.H., Lindquist S., Zhang L., Guschin D., Fong L.K., Vu B.J., Meng X., Urmov F.D., Rebar E.J., Gregory P.D., Zhang H.S., Jaenisch R. // Cell. 2011. V. 146. P. 318–331.
28. Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. // Science. 2013. V. 339. P. 819–823.
29. Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. // Science. 2013. V. 339. P. 823–826.
30. Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Slaymaker I.M., Makarova K.S., Essletzbichler P., Volz S.E., Joung J., van der Oost J., Regev A., Koonin E.V., Zhang F. // Cell. 2015. V. 163. P. 759–771.
31. Kleinstiver B.P., Pattanayak V., Prew M.S., Tsai S.Q., Nguyen N.T., Zheng Z., Joung J.K. // Nature. 2016. V. 529. P. 490–495.
32. Schmid-Burgk J.L., Gao L., Li D., Gardner Z., Strecker J., Lash B., Zhang F. // Mol. Cell. 2020. V. 78. P. 794–800. e798.
33. Rehbach K., Fernando M.B., Brennand K.J. // J. Neurosci. 2020. V. 40. P. 1176–1185.
34. Schuster S., Saravanakumar S., Schols L., Hauser S. // Stem Cell Res. 2019. V. 34. P. 101378.
35. Malankhanova T., Sorokin M., Medvedev S., Zakian S., Malakhova A. // Curr. Protoc. Hum. Genet. 2020. V. 106. P. e100.

36. Nagel M., Mussig S., Hoflinger P., Schols L., Hauser S., Schule R. // *Stem Cell Res.* 2020. V. 49. P. 102059.
37. Calatayud C., Carola G., Fernandez-Carasa I., Valtorta M., Jimenez-Delgado S., Diaz M., Soriano-Fradera J., Capelletti G., Garcia-Sancho J., Raya A., Consiglio A. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 6811.
38. Ustyantseva E.I., Medvedev S.P., Vetchinova A.S., Minina J.M., Illarioshkin S.N., Zakian S.M. // *Biochemistry (Mosc.)*. 2019. V. 84. P. 299–309.
39. Sadelain M., Papapetrou E.P., Bushman F.D. // *Nat. Rev. Cancer*. 2011. V. 12. P. 51–58.
40. Kim H., Ju J., Lee H.N., Chun H., Seong J. // *Sensors (Basel)*. 2021. V. 21.
41. Bi X., Beck C., Gong Y. // *Biosensors (Basel)*. 2021. V. 11.
42. Schulz J.B., Lindenau J., Seyfried J., Dichgans J. // *Eur. J. Biochem.* 2000. V. 267. P. 4904–4911.
43. Samali A., Fitzgerald U., Deegan S., Gupta S. // *Int. J. Cell Biol.* 2010. V. 2010. P. 830307.
44. Lee J.H., Han J.H., Kim H., Park S.M., Joe E.H., Jou I. // *Acta Neuropathol. Commun.* 2019. V. 7. P. 68.
45. Colla E. // *Front. Neurosci.* 2019. V. 13. P. 560.
46. Dafinca R., Barbagallo P., Talbot K. // *Front. Cell. Neurosci.* 2021. V. 15. P. 653688.
47. Bella E.D., Bersano E., Antonini G., Borghero G., Capasso M., Caponnetto C., Chio A., Corbo M., Filosto M., Giannini F., Spataro R., Lunetta C., Mandrioli J., Messina S., Monsurro M.R., Mora G., Riva N., Rizzi R., Siciliano G., Silani V., Simone I., Soraru G., Tugnoli V., Verriello L., Volanti P., Furlan R., Nolan J.M., Abgueguen E., Tramacere I., Lauria G. // *Brain*. 2021. <https://doi.org/10.1093/brain/awab167>
48. Shacham T., Patel C., Lederkremer G.Z. // *Biomolecules*. 2021. V. 11.
49. Ghemrawi R., Khair M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21.
50. Iwawaki T., Akai R., Kohno K., Miura M. // *Nat Med.* 2004. V. 10. P. 98–102.

Creation and Research of Hereditary Neurodegenerative Diseases Cell Models Using Directed Genome Editing

S. P. Medvedev^{a, b, c}, T. B. Malankhanova^{a, b, c}, K. R. Valetdinova^{a, c}, and S. M. Zakian^{a, b, c}

^a*Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

^b*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

^c*Meshalkin National Medical Research Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia*

Neurodegenerative diseases occupy a significant share in the structure of morbidity around the world. In particular, due to the increase in the average age of the population in most developed countries, the proportion of patients with diagnoses such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease is sharply increasing. Numerous studies have not yet led to the emergence of drugs that can be effectively and safely used in the treatment of these and many other neurodegenerative diseases. To a large extent, these problems are associated with an insufficient understanding of the molecular genetic mechanisms that underlie pathogenesis, as well as with the lack of models that allow obtaining not only qualitative, but also quantitative data on the processes occurring in the neurons of patients. The development of technologies for induced pluripotency, directed differentiation of pluripotent cells, as well as gene editing using programmed nucleases, makes it possible to significantly expand the arsenal of research tools, especially in the search for new targets for drug and gene therapy.

Keywords: induced pluripotent stem cells, cell models, CRISPR–Cas9

УДК 616.8

РЕДАКТИРОВАНИЕ ЭПИГЕНОМА ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

© 2021 г. А. С. Ветчинова¹, *, Е. Ю. Федотова¹, С. Н. Иллариошкин¹

¹ФГБНУ “Научный центр неврологии”, Москва, Россия

Поступила в редакцию 22.03.2021 г.

После доработки 21.04.2021 г.

Принята к публикации 23.04.2021 г.

Направленное геномное редактирование с помощью системы CRISPR/Cas9, внедренное в практику в последние годы и ставшее одним из наиболее впечатляющих достижений современной молекулярной биологии, позволяет эффективно корректировать генетическую информацию на уровне клеток. Для терапевтических целей важно вносить быстрые и точные изменения в нуклеотидную последовательность генома в условиях *in vivo*. И если редактирование генов включает в себя изменение самой нуклеотидной последовательности ДНК и непосредственную коррекцию генетической информации, то эпигенетическое редактирование направлено на контроль экспрессии определенных генов, в первую очередь, за счет изменения статуса метилирования заданных сайтов в геноме. Редактируя, таким образом, эпигеномные признаки, исследователи могут определить точную биологическую роль эпигенетической модификации в развитии той или иной патологии. В обзоре представлены фундаментальные и технологические основы эпигеномного редактирования, а также современные возможности данной передовой технологии в изучении нейродегенеративных заболеваний.

Ключевые слова: эпигенетика, регуляция активности генов, метилирование, CRISPR/Cas9, нейродегенеративные заболевания

DOI: 10.31857/S1027813321040154

ВВЕДЕНИЕ

Направленное геномное редактирование позволяет эффективно корректировать генетическую информацию на уровне клеток. С помощью искусственных нуклеазных систем (ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9) можно осуществлять все виды таргетных модификаций генома: вносить точечные мутации, встраивать в определенные места новые гены либо, наоборот, удалять крупные участки нуклеотидных последовательностей, исправлять или заменять отдельные генетические элементы и фрагменты генов [1, 2]. После появления первых сведений о редактировании генома млекопитающих системой CRISPR/Cas9, открытой в 2012 г. [3], было разработано множество методов, предлагающих те или иные модификации белков семейства Cas или направляющих РНК. Целый ряд работ посвящен использованию технологий, основанных на системе CRISPR/Cas, не только для редактирования геномов, но и для контроля экспрессии определенных генов, локализации и визуализации отдельных локусов ДНК в пространстве ядра, изменения статуса метилирования заданных сайтов в геноме млекопитающих [4].

В основу регуляции генной активности эукариот положено многоуровневое взаимодействие определенных участков ДНК с белками, которые называются транскрипционными факторами [5]. Взаимодействие регуляторных элементов, химические модификации ДНК, посттрансляционные модификации белков гистонов и строго контролируемое расположение этих гистонов, определяющее расположение хроматина влияют на экспрессию генов в различных типах клеток и стадиях клеточного цикла. Процесс, приводящий к изменению активности гена без изменения его нуклеотидной последовательности, называется эпигенетической регуляцией. Метилирование ДНК представляет собой особый механизм контроля активности генов, который получил максимальное развитие у высших эукариот и является эпигенетической модификацией, играющей решающую роль во многих регуляторных процессах. Он участвует в регуляции экспрессии транскрипционных генов, геномного импринтинга, инактивации X-хромосомы, сайленсинге подвижных элементов и поддержании целостности генома [6]. Метилирование ДНК характерно для широкого круга эукариот и чаще всего происходит в палиндромных CpG-динуклеотидах. Для центромерных, околицентромерных и повторяющихся элементов ха-

* Адресат для корреспонденции: 125367 Россия, Москва, Волоколамское шоссе, д. 80, e-mail: annvet@mail.ru.

рактерно гиперметилирование CpG-островков. Высокое метилирование CpG-островков также обнаружено внутри активно транскрибирующихся участков генома, в то время как CpG-динуклеотиды, связанные с промоторами генов, остаются в гипометилированном состоянии, что указывает на локальный контекст CpG метилирования и его связь с регуляторным потенциалом. Целенаправленное изменение метилирования ДНК представляет собой многообещающий метод для искусственной регуляции активности генов. И если ранее применение глобальных метилирующих и деметилирующих агентов не позволяло вносить конкретные изменения, и, следовательно, исследовать взаимосвязь конкретного эпигенетического статуса и развития заболевания, то редактирование эпигеномов на основе системы искусственных нуклеаз особенно полезно для исследования экспрессии генов в процессе развития, при целом ряде заболеваний, включая нейродегенеративные. Новые точные инструменты для редактирования эпигенома позволяют добавлять и удалять даже единичные эпигенетические метки. Это обеспечивает возможность выявления причинно-следственных связей и идентификации наиболее важных эпигенетических модификаций при определенном состоянии.

СУЩЕСТВУЮЩИЕ ВАРИАНТЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ЭПИГЕНОМА

Для редактирования эпигенома используют “синтетические” белковые конструкции, состоящие из ДНК-связывающего домена, направленно узнающего специфическую последовательность, и эффекторного домена, вносящего определенную модификацию. Первыми инструментами для редактирования эпигенома являлись нуклеазы цинковых пальцев (ZFN) [7], которые оставались популярными благодаря своим компактным размерам и сайт-специфическому связыванию с последовательностью мишени [8], а также системы на основе TALEN [9, 10] благодаря более простой сборке и нацеливанию по сравнению с ZFN. Однако эффективность обеих систем проигрывает системе CRISPR/Cas9 с точки зрения редактирования как генома, так и эпигенома ввиду легкости нацеливания направляющими РНК даже на несколько сайтов и нечувствительности к метилированию CpG [11, 12].

Одновременная инактивация доменов HNH и Ruv C нуклеазы SpCas 9 (*Streptococcus pyogenes*) превращает Cas9 в направляемый РНК/ДНК-связывающий белок, не разрезающий мишень. В результате каталитически мертвая Cas9 (dCas9), направляемая гид-РНК (gRNA), связывается с мишенью, но не расщепляет ее [13]. Таким образом, каталитически неактивный dCas9 был создан и сконструирован в качестве модуля нацеливания

ДНК для доставки эффекторных белков. Например, форма dCas9, сшитая с четырьмя тандемными копиями белка вируса простого герпеса VP16 (VP64), может активировать транскрипцию гена-мишени [14], а слияние фрагмента KRAB с системой gRNA/dCas9 оказалось наиболее эффективным в репрессии транскрипции гена-мишени [15] (табл. 1).

Помимо регулирования транскрипции, редактирование эпигенома может включать изменение посттрансляционных модификаций гистонов и метилирование участков ДНК. Новые высокоточные методики позволяют исследователям добавлять и удалять эпигенетические метки гистонов на определенных генах-мишенях. Действие этих модифицирующих ферментов приводит либо к активации гена через ацетилирование гистона или триметилирование лизина 4 гистона H3, либо к инактивации гена через метилирование промотора ДНК, деацетилирование гистона или деметилирование лизина 4 гистона H3. Метилирование ДНК может исполнять роль метки-закладки, информирующей белковые комплексы, как им себя вести относительно этого участка ДНК. Например, если метильные метки расположены на промоторе гена, то это обычно приводит к ингибированию экспрессии данного гена. Деметилирование промотора приводит к активации работы такого гена. Слияние dCas9 с ферментативным доменом TET1 или DNMT3A позволяет целенаправленно удалять или устанавливать метилирование ДНК, соответственно (табл. 2).

Для повышения эффективности редактирования эпигенома эффекторные домены могут быть связаны с dCas9 посредством системы SunTag, представляющей собой повторяющийся полипептидный массив, который способен рекрутировать несколько копий антител [26, 27]. Изменения экспрессии генов, индуцированные dCas9-SunTag-VP64, были в 25 раз выше по сравнению с обычной активацией, опосредованной dCas9-VP64 в том же локусе [14]. Используя комплекс dCas9-SunTag-DNMT3A, исследователи метилировали крупную область генома, определяя чувствительность к метилированию CTCF-фактора с довольно низким соотношением нецелевого метилирования [28]. Аналогично dCas9-SunTag-стратегии, система CRISPR-SAM также может быть использована для повышения эффективности редактирования эпигенома. В системе dCas9-SAM модифицированная gRNA содержит две копии шпильки РНК из бактериофага, которые взаимодействуют с РНК-связывающим белком оболочки MS2. Поскольку шпильки модифицированной gRNA находятся за пределами комплекса gRNA/dCas9, другие факторы транскрипции могут связываться с комплексом через MS2, не мешая сборке комплекса. Слитый белок MS2-P65-HSF1, взаимодействующий с dCas9-VP64, привлекает большое

Таблица 1. Применение эпизэффекторов для регулирования работы генов

Эпизэффектор	Эпигенетическая модификация	Особенность	Недостатки	Ссылки
Трансактиваторный домен VP64	Привлечение активаторов транскрипции, увеличивается уровень H3K27ac, H3K4me	Увеличение активации транскрипции	“Первое поколение” активаторов транскрипции	14
VPR (VP64, p65, Rta)	Привлечение активаторов транскрипции, увеличивается уровень H3K27ac, H3K4me	Использование трех факторов транскрипции приводит к повышенной экспрессии гена-мишени	При нецелевом связывании способен репрессировать транскрипцию	16
SAM-активатор (VP64, p65, HSF1)	Привлечение активаторов транскрипции, увеличивается уровень H3K27ac, H3K4me	Достижение устойчивой транскрипционной активации сайтов-мишени осуществляется за счет синергетических взаимодействий между активационными доменами VP64, p65 и HSF1.	Необходима одновременная экспрессия MS2/P65/HSF1 и dCas9/VP64 с gRNA/MS2 векторов	17
LACE (CRY2/CIB1-VP64)	Привлечение активаторов транскрипции, увеличивается уровень H3K27ac, H3K4me	Под действием света молекула CRY2 изменяет свою форму и связывается с CIB1, обеспечивая доставку активаторов транскрипции к гену-мишени благодаря слиянию с dCas-VP64	Процедуры конструирования векторов технически сложны и требуют много времени	18
Репрессорный домен KRAB	Привлечение корепрессорных белков	Высокоспецифическая репрессии целевых участков ДНК с минимальными эффектами вне мишени. Исторически “первый” репрессор транскрипции, принятый для точных эпигенетических модификаций	Степень репрессии транскрипции варьирует в зависимости от эндогенного состояния хроматина	15
Домен KRAB-MeCP2	Привлечение корепрессорных белков, метилтрансфераз, гистоновых деацетилаз	Более высокая активность репрессора транскрипции, чем одна система KRAB	Доставка с помощью лентивирусных векторов технически сложнее по сравнению с обычной плазмидной трансфекцией	19

количество транскрипционных факторов на промотор гена мишени и увеличивает транскрипцию гена [17]. Использование белка оболочки MS2 для димеризации каталитических доменов в составе конструкции gRNA-dCas9-CDTET позволило осуществлять эффективное и специфическое деметилирование генов-мишеней. При этом деметилирование наблюдалось на расстоянии 100–300 п.н. от сайтов посадки gRNA [29]. С помощью производ-

ной конструкции dCas9-SunTag-p65-HSF1 (SPH), в которой домен VP64 заменен на p65-HSF1 (компонент dCas9-SAM), удалось одновременно активировать несколько генов и длинных некодирующих РНК, принадлежащих к группе некодирующих РНК эпигенетических модификаторов в мозге мышей. Нацеленная активация трех эндогенных нейрогенных факторов транскрипции привела к эффективному превращению астроцитов в функ-

Таблица 2. Применение эпизффекторов для редактирования эпигенома

Эпизффектор	Эпигенетическая модификация	Особенность	Недостатки	Ссылки
Коровый домен гистон ацетил-трансфераза P300	Ацетилирование гистонов	Возможность активировать экспрессию гена от дистальных энхансеров	Необходим пул gRNA для успешного восстановления экспрессии генов	20
Домены гистон метилтрансфераз PRDM9, G9A, DOT1L	Увеличение метилирования гистона H3K4me3	Эффективность активации экспрессии зависит от контекста хроматина в сайтах связывания gRNA	Высокая чувствительность к CpG-сайтам внутри мишени	21
Домен ДНК-деметилаза TET 1	Деметилирование ДНК	Длительная реактивация работы гена возможна даже при временной экспрессии конструкции	Важно знать критичные CpG-сайты внутри мишени	22
Деметилаза гистонов LSD1	Уменьшение уровня H3K27ac, H3K4me	Позволяет исследовать энхансеры, регулирующие экспрессию генов критически важных для поддержания эмбрионального состояния	Активность ограничена энхансерами	23
Метилтрансфераза гистонов Ezh2	Увеличение H3K27me3	Высокая эффективность в метилировании гистонов для подавления экспрессии	Временно влияет на работу гена	24
Метилтрансфераза DNMT3A-DNMT3L	Увеличение метилирования в CpG-островках	Существенно подавляется экспрессия гена при одновременном использовании нескольких gRNA	Глобальные нецелевые эффекты, независимые от gRNA и способов доставки	25, 53

циональные нейроны *in vivo*. [30] Исследования, сравнивающие активаторы dCas9, показали, что активаторы VPR, SunTag, SAM лучше всего активируют работу генов в различных типах и видах клеток и предоставляют множество возможностей для транскрипционных и эпигенетических манипуляций [31, 32].

Благодаря возможности образования комплекса dCas9-sgRNA с функциональными активаторами (VP64, VPR, SAM) или репрессирующими доменами (KRAB, KRAB-MeCP2), система dCas9-sgRNA может быть использована для регулирования экспрессии генов на уровне транскрипции, либо для активации генов (CRISPRa), либо для репрессии генов (CRISPRi). Системы CRISPRi/a относительно универсальны и включают следующие шаги: создание стабильной клеточной линии, экспрессирующей dCas9-эпизффектор;

доставка пула gRNA, нацеленных на связывание с мишенями в непосредственной близости от промоторной области гена или сайтов начала транскрипции; анализ изменений уровней мРНК и белка, а также анализ функциональных последствий этих изменений. [15, 33]. Данный метод на основе CRISPRi/a все чаще используются в фундаментальных исследованиях. Например, клетки, конститутивно экспрессирующие репрессор dCas9-KRAB или активатор dCas9-p300 соответственно, трансдуцировали библиотеками gRNA для скрининга предполагаемых дистальных регуляторных элементов и энхансеров, связанных с транскрипционными факторами [34]. Разработка gRNA для многих приложений CRISPR упрощена благодаря различным онлайн-ресурсам. Например, библиотека Brunello, состоящая из 77441 gRNA, в среднем 4 gRNA на ген и 1000 некодирующих

контрольных gRNA, была разработана для улучшения целевой активности при одновременном снижении нецелевых эффектов в геномах человека [35]. Одним из основных преимуществ CRISPRi/a является возможность объединения направляющих РНК для изучения работы отдельного гена, в то время как мультиплексирование направляющих РНК на разные гены позволяет одновременно репрессировать/активировать несколько генов для изучения сложных клеточных путей и сетей взаимодействия. Эти подходы могут оказаться чрезвычайно эффективными для разработки потенциальных лекарств [31], изучения некодирующих участков [36], анализа механизмов заболеваний человека в моделях ИПСК и их производных [37, 38].

Благодаря сочетанию передовых методов масштабных скринингов на основе CRISPR/Cas и высокопроизводительного секвенирования транскриптомов единичных клеток (scRNA-seq) возможно проводить анализ дифференциальной экспрессии генов и сравнивать транскриптомы из двух и более образцов [39]. Выполнение секвенирования на клетках с репрессией/ активацией гена-мишени на основе CRISPRi/a предоставляет информацию для подробного анализа транскриптомных последствий каждого изменения. Кроме того, с помощью инженерии эпигенома был разработан подход к систематическому измерению функции энхансера. Для этого линию клеток трансдуцировали лентивирусным вектором dCas9-KRAB-blast, содержащим мощный репрессор функции энхансера KRAB. После отбора селективным антибиотиком бластицидином клетки повторно трансдуцировали библиотекой gRNA на основе лентивирусного вектора, несущего штрих-код и пурамицин для второго раунда отбора. Выжившие клетки представляли собой эпигенетическую и транскриптомную мозаику: они экспрессировали различные sgRNA, способствуя направленным эпигенетическим изменениям и изменениям в экспрессии генов. Используя высокопроизводительную микрофлюидную платформу для секвенирования РНК одной клетки, каждый из полученных одноклеточных транскриптомов был упорядочен с определенным набором sgRNA с использованием последовательностей штрих-кода [40]. Главными параметрами данных исследований являются: количество целевых генов, выделение единичных клеток из гетерогенных тканей или культивируемых клеток, количество отсекаемых клеток и глубина секвенирования. Прежде чем начинать эксперимент по секвенированию транскриптомов единичных клеток, необходимо иметь референсный геном и транскриптом, на который будет происходить картирование данных scRNA-seq [41, 42].

Интеграция функциональной геномики на основе CRISPR и технологии стволовых клеток обеспечивает возможность масштабируемого исследо-

вания функции генов в дифференцированных клетках человека. В мире уже есть уникальные работы, посвященные полногеномному скринингу интерференции CRISPR и активации CRISPR в нейронах человека. В лаборатории Кампманна исследователи применили метод CRISPRi, чтобы изменять активность генов в нейронах человека, полученных из ИПСК. Анализ обнаружил гены, которые увеличивают количество отростков у нейрона, и гены, выключение которых повышает продолжительность жизни нейронов. Нокдаун определенных генов может оказывать разное влияние на выживаемость клеток и экспрессию генов в различных изогенных типах клеток человека, включая стволовые клетки и нейроны [43]. Нейроны, как один из наиболее долгоживущих типов клеток в организме человека, сталкиваются с различными стрессами при старении и болезнях. Из-за своей природы нейроны не обладают способностью “самообновляться” путем деления клеток. Следовательно, для поддержания здоровья нейронов в долгосрочной перспективе необходимы надежные механизмы реакции на стресс. Впервые были проведены первые полногеномные скрининги CRISPRi/a, нацеленные на 184 гена и 100 генов, соответственно, с использованием 2 gRNA на ген в человеческих нейронах. Значительный нокдаун или сверхэкспрессия гена были обнаружены для большинства мишеней в библиотеках. Эти скрининги выявили неожиданную роль лизосомального протеина просапозина (PSAP), нокдаун которого вызвал образование липофусцина, который улавливает железо, генерирует активные формы кислорода и запускает ферроптоз в нейронах. Интересно, что дефицит PSAP запускается только в нейронах, но не в ИПСК или клетках HEK293. Таким образом, что ингибирование образования липофусцина и последующего ферроптоза может служить новой терапевтической стратегией для лечения нейродегенеративных заболеваний. Исследователями была создана база данных под названием CRISPRbrain (<https://crisprbrain.org/>), объединяющая результаты генетических скринингов на различные фенотипы в разных типах клеток человека, проведенные разными исследовательскими группами. Это чрезвычайно ценный ресурс для сопоставления фенотипических данных, влияющих на нейродегенерацию [44].

ОГРАНИЧЕНИЯ СУЩЕСТВУЮЩИХ СИСТЕМ РЕДАКТИРОВАНИЯ ЭПИГЕНОМА

Стремительный прогресс в области редактирования эпигенома с помощью CRISPR/Cas9 и привлекательность применения этой системы в терапевтических целях требуют разработки эффективных способов доставки эпиредакторов в различные популяции клеток и обеспечения высокоспецифичной активности импортированных

инструментов в области локуса-мишени. Выбранная система доставки в идеале должна обеспечивать тканеспецифичность и способность проникать в клетки-мишени, а также иметь низкую иммуногенность. На сегодняшний день конструкции для редактирования доставляются преимущественно с помощью электропорации, вирусных векторов и в виде рибонуклеарных комплексов. Первоначально многие конструкции на основе dCas9 доставлялись посредством электропорации плазмидной ДНК, но данная процедура токсична, поскольку она может повредить клеточную мембрану. Системы доставки генов на основе вирусных векторов уже широко используются в генной терапии [45]. Наиболее используемыми для доставки терапевтических конструкций являются лентивирусные векторы и векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV). Лентивирусный вектор обладает большой упаковочной способностью (до 8500 п.о.) и характеризуется длительной экспрессией трансгена, он способен трансдуцировать неделящиеся клетки. Однако лентивирусный вектор является онкогенным и может вызывать вставку трансгена в геном хозяина, что в значительной степени ограничивает его использование [46]. Векторы на основе AAV могут доставляться в большое число самых разных тканей-мишеней, обладают низкой иммуногенностью, но имеют низкую емкость упаковки, что делает невозможным доставку большой конструкции эпиредактора [47]. Альтернативой векторам являются липидно-бислойные везикулы, полученные из аутологичных клеток, и, следовательно, имеющие низкую иммуногенность при доставке в клетку-мишень. Недостатком этих частиц является короткое время жизни по сравнению с вирусными конструкциями [48].

Значимым ограничением для применения в терапевтических целях редакторов эпигенома является потенциальная иммуногенность генно-инженерных белков. Иммуногенность конструкций, сшитых с TALE и dCas9 от низших организмов, еще не до конца исследована. Добавление эффекторных доменов, которые также получены от не млекопитающих (как, например, вирусного домена VP64), может усиливать потенциальную иммуногенность всей конструкции.

Внедрение усеченных gRNA, разработка более строгих требований к взаимодействиям РАМ мотивов с сайтом мишени потенциально снизили вероятность нецелевых событий связывания dCas9, но ввиду того, что отследить нежелательное редактирование на уровне всего эпигенома крайне затруднительно, необходимо продолжить научные исследования [49].

По сравнению с традиционным методом РНК-интерференции (RNAi), репрессия генов на основе dCas9, слитых с KRAB, LSD1, может сни-

жаться до 99%, что эффективно используется в клеточной терапии *ex vivo*. Однако некоторые исследования показали, что эпигенетическое редактирование является только временным и обратимым, не приводя к стабильной “памяти” на это воздействие после удаления системы редактирования эпигенома [50, 51].

Полногеномный скрининг с последующим высокопроизводительным секвенированием транскриптомов единичных клеток является передовым методом, но тоже имеет свои ограничения. Поскольку транскриптом очень лабилен, а метод высокочувствителен, при сборе образцов следует помнить о влиянии различных факторов, включая стадию клеточного цикла. Другой проблемой, связанной с этим протоколом, является создание крупномасштабных библиотек CRISPR и необходимость культивирования огромного числа клеток для успешного скрининга многих нарушений экспрессии клеток. Важным условием является также отработка протоколов трансдукции лентивирусными векторами с библиотеками gRNA с высокой множественностью заражения. Высокопроизводительное разделение клеток при проведении скринингов с последующим секвенированием с применением флуоресцентных красителей может отрицательно влиять на жизнеспособность клеток. Селекция антибиотиками ограничивает применение метода только в пролиферирующих клетках. Необходимо также дорабатывать биоинформатические алгоритмы для верной интерпретации полученного массива данных [39].

РЕДАКТИРОВАНИЕ ЭПИГЕНОМА ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Сайт-специфическое редактирование эпигенома предоставляет возможность изучить вклад нарушения генной регуляции в развитии того или иного заболевания, что позволит предложить новые терапевтические стратегии. Целевая активация “молчащих” генов или, наоборот, репрессия патологически активных генов могут смягчить симптомы, остановить прогрессирование или предотвратить развитие болезни. Такие подходы сегодня активно разрабатываются при нейродегенеративных заболеваниях.

При синдроме Ангельмана, ассоциированном с тяжелой умственной и физической отсталостью, активный материнский аллель гена нефункционален из-за мутации, тогда как отцовский аллель инактивирован. В 25% случаев заболевание ассоциировано с мутациями гена *UBE3A* в локусе 15q11–13. Белок *UBE3A* важен для всех клеток, особенно для нейронов головного мозга. Коррекция эпигенетического статуса одного или нескольких генов в районе 15q11–13 на хромосоме, полученной от матери, возможна с помощью направляющей гид-РНК и dCas9-DNMT3A. Было

доказано, что метилирование DNMT3A в клеточных линиях стабильно и сохраняется в процессе митозов [52]. В случае крупной делеции гена *UBE3A* на материнском аллеле возможный терапевтический подход заключается в удалении эпигенетических меток с отцовского аллеля.

Болезнь Паркинсона (БП) — распространенное дегенеративное заболевание, в развитии которого велика роль генетических факторов [53]. Основные двигательные проявления БП связаны с гибелью дофаминергических нейронов в области чёрной субстанции среднего мозга, и направленная активация компенсаторных генов может смягчить симптомы заболевания. Например, активация экспрессии эндогенного глиального фактора роста нервов (GDNF) с помощью конструкции AAV-ZFN-p65 в “паркинсонической” клеточной линии крыс RIN-m5F показала многообещающие результаты с позиций нейропротекции, что дает новые возможности лечения нейродегенерации, связанной с БП [54].

Мутация гена *SNCA*, расположенного на хромосоме 4q21–22 и кодирующего белок альфа-синуклеин, обуславливает развитие моногенной формы БП с аутосомно-доминантным типом наследования. Повышение экспрессии и нарушение процессинга данного белка являются центральным звеном молекулярного патогенетического каскада, ведущего к накоплению в клетке нерастворимых белковых комплексов и прогрессирующей дегенерации дофаминергических нейронов. Используя технологию редактирования эпигенома с применением дезактивированного Cas9 (dCas9), слитого с каталитическим доменом ДНК-метилтрансферазы 3A (DNMT3A), в дофаминергических нейронах из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) пациента с трипликацией *SNCA*, удалось целенаправленно метилировать CpG-динуклеотиды в первом интроне и уменьшить уровень экспрессии мутантного гена. Kantor et al. [55] предположили, что редактирование эпигенома при помощи технологией CRISPR-dCas9 можно рассматривать в качестве нового перспективного терапевтического подхода для лечения БП.

Синдром ломкой X-хромосомы характеризуется умственной отсталостью разной степени выраженности и встречается у обоих полов, но мужчины-гемизиготы страдают этим заболеванием чаще и значительно тяжелее. Генетической основой данного заболевания является увеличение числа CGG-повторов в 5'-нетранслируемой области гена *FMR1* с последующим метилированием промотора и инактивацией экспрессии белка FMRP [56]. FMRP является РНК-связывающим белком, который играет первичную роль в качестве репрессора трансляции различных мРНК, многие из которых участвуют в формировании и поддержании нейрональной синаптической функции и пластичности.

В ИПСК пациента с синдромом ломкой X-хромосомы с помощью конструкции gRNA dCas9-TET1 сняли метилирование в повторах и восстановили постоянную экспрессию *FMR1* в клетках. В нейронах, полученных из отредактированных ИПСК, был успешно восстановлен здоровый фенотип [56].

Болезнь Гентингтона (БГ) — тяжелое наследственное нейродегенеративное заболевание, которое характеризуется нарастающим хореическим гиперкинезом, деменцией, психопатологическими расстройствами. Мутация в первом экзоне гена *HTT*, обусловленная экспансией тринуклеотидных цитозин-аденин-гуаниновых (CAG) повторов, приводит к синтезу мутантного белка гентингтина, который оказывает многофакторное цитотоксичное действие на нейроны полосатого тела [57]. Доставка с помощью аденовирусных векторов химерного белка ZFN-KRAB, используемого для подавления экспрессии гена *HTT*, приводила к значительному снижению уровня экспрессии мутантной РНК и белка гентингтина в мозге мышей линии R6/2, служащих моделью БГ [58].

Репрессоры на основе программируемых редакторов, способные подавлять экспрессию мутантных генов, могут являться перспективным инструментом в отношении и других мишеней при различных нейродегенеративных заболеваниях из группы церебральных протеинопатий, сопровождающихся гиперпродукцией аномально конформированных клеточных белков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Открытие системы CRISPR/Cas9 ознаменовало революцию в области генетического и эпигенетического редактирования. Создание нуклеазодефектных Cas9 привело к разработке различных производных CRISPR/dCas9, которые могут быть использованы для выполнения различных функций, таких как отслеживание, активация и репрессия транскрипции и редактирование. До недавнего времени эпигенетические исследования основывались только на корреляциях между некоторыми эпигенетическими модификациями и регуляцией функции генов (то есть активацией или молчанием). Редактирование эпигенома сейчас позволяет непосредственно изучить функциональную значимость определенной эпигенетической модификации в определенном локусе или области генома. Использование редактирования эпигенома и управление эпигенетическими метками с помощью света, являются перспективным для геномной и эпигеномной терапии. Однако чтобы сделать редактирование эпигенома безопасным для терапевтических целей, необходимо дальнейшее усовершенствование эффективной и неиммунотоксичной доставки редактора с последующей устойчивой активностью. И хотя “tag-off” эффект от действия эпиредкторов может показаться менее

вредным по сравнению с редактированием генов системой CRISPR/Cas9, важно сделать редактирование эпигенома как можно более точным из-за отсутствия полных знаний о регулировании эпигенома. Исследование редакторов эпигеномов на настоящий момент направлено на преодоление этих проблем и, возможно, откроет новые возможности для лечения нейродегенеративных и других заболеваний человека.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Внешнее финансирование отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильева Е.А., Мелино Д., Барлев Н.А. // Цитология. 2015. Т. 57. № 1. С. 19–30.
2. Ветчинова А.С., Коновалова Е.В., Лунев Е.А., Иллариошкин С.Н. // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2015. Т. 9. № 4. С. 59–64.
3. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. // Science. 2012. V. 337. P. 816–821.
4. Thakore P., Black J., Hilton I., Gersbach P. // Nat. Methods. 2016. V. 13. P. 127–137.
5. Maston G.A., Evans S.K., Green M.R. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2006. V. 7. P. 29–59.
6. Грин И.Р., Петрова Д.В., Жарков Д.О. // Гены и клетки. 2016. № 2. С. 53–60.
7. Urnov F.D., Rebar E.J., Holmes M.C. // Nat. Rev. Genet. 2010. V. 11. P. 636–646.
8. Beerli R.R., Segal D.J., Dreier B., Barbas C.F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 14628–14633.
9. Zhang F., Cong L., Lodato S., Kosuri S., Church G.M., Arlotta P. // Nat. Biotechnol. 2011. V. 29. P. 149–153.
10. Schmid-Burgk J.L., Schmidt T., Kaiser V., Höning K., Hornung V. // Nat. Biotechnol. 2013. P. 31. P. 76–81.
11. Maeder M.L., Angstman J.F., Richardson M.E., Linder S.J., Cascio V.M., Tsai S.Q., Ho Q.H., Sander J.D., Reyon D., Bernstein B.E., Costello J.F., Wilkinson M.F., Joung J.K. // Nat. Biotechnol. 2013. V. 31. P. 1137–1142.
12. Chen H., Kazemier H.G., de Groote M.L., Ruiters M.H., Xu G.L., Rots M.G. // Nucleic Acids Res. 2014. V. 42. P. 1563–1574.
13. Jinek M., Jiang F., Taylor D., Sternberg S., Kaya E., Ma E., Anders C., Hauer M., Zhou K., Lin S., Kaplan M., Iavarone A., Charpentier E., Nogales E., Doudna J. // Science. 2014. V. 343. P. 1247997.
14. Konermann S., Brigham M.D., Trevino A.E., Hsu P.D., Heidenreich M., Cong L., Platt R.J., Scott D.A., Church G.M., Zhang F. // Nature. 2013. V. 500(7463). P. 472–476.
15. Gilbert L.A., Horlbeck M.A., Adamson B., Villalta J., Yuen Chen Y., Evan H., Whitehead E., Guimaraes C., Panning B., Ploegh H., Bassik M., Qi L., Kampmann M., Jonathan S., Weissman J. // Cell. 2014. V. 159. P. 647–661.
16. Chavez A., Scheiman J., Vora S., Pruitt B., Tuttle M., Iyer E., Shuailiang Lin S., Kiani S., Guzman C., Daniel J., Wiegand D., Ter-Ovanesyan D., Braff J., Davidsohn N., Housden B., Perrimon N., Ron Weiss R., John Aach J., Collins J., Church G. // Nat. Methods. 2015. V. 12. P. 326–328.
17. Zhang Y., Yin C., Zhang T., Li F., Yang W., Kaminski R., Fagan P.R., Putatunda R., Young W.-B., Khalili K. // Sci. Rep. 2015. V. 5. P. 16277–16291.
18. Polstein L.R., Gersbach C.A. // Nat. Chem. Biol. 2015. V. 11. P. 198–200.
19. Yeo N., Chavez A., Lance-Byrne A., Chan Y., Menn D., Milanova D., Kuo C., Guo X., Sharma S., Tung A. // Nat. Methods. 2018. V. 15. P. 611–617.
20. Hilton I.B., D'Ippolito A.M., Vockley C.M., Thakore P.I., Crawford G.E., Reddy T.E., Gersbach C.A. // Nat. Biotechnol. 2015. V. 33. P. 510–517.
21. Moreno A.M., Fu X., Zhu J., Katrekar D., Shih Y.V., Marlett J., Cabotaje J., Tat J., Naughton J., Lisowski L. // Mol. Ther. 2018. V. 26. P. 1818–1827.
22. Xu X., Hulshoff M., Tan X., Zeisberg M., Zeisberg E.M. // Int. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 3038–3048.
23. Kearns N.A., Pham H., Tabak B., Genga R.M., Silverstein N.J., Garber M., Maehr R. // Nat. Methods. 2015. V. 12. P. 401–403.
24. O'Geen H., Bates S.L., Carter S.S., Nisson K.A., Halmaj J., Fink K.D., Rhie S.K., Farnham P.J., Segal D.J. // Epigenetics Chromatin. 2019. V. 12. P. 26–46.
25. Vojta A., Dobrinic P., Tadic V., Bočkor L., Korać P., Julg B., Klasić M., Zoldoš V. // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. P. 5615–5628.
26. Ran F.A., Hsu P.D., Lin C.Y., Gootenberg J.S., Konermann S., Trevino A.E., Scott D.A., Inoue A., Matoba S., Zhang Y. // Cell. 2013. V. 154. P. 1380–1389.
27. Fu Y., Rocha P.P., Luo V.M., Raviram R., Deng Y., Mazzone E.O., Skok J.A. // Nat. Commun. 2016. V. 7. P. 11707–11715.
28. Pflueger C., Tan D., Swain T., Nguyen T., Pflueger J., Nefzger C., Polo J., Ford E., Lister R. // Genome Res. 2018. V. 28. P. 1193–1206.
29. Choudhury S., Cui Yi., Lubecka K., Stefanka B., Irudayaraj J. // Oncotarget. 2016. V. 7. P. 46545–46556.
30. Zhou H., Liu J., Zhou C., Gao N., Rao Z., Li H., Hu X., Li C., Yao X., Shen X. // Nat. Neurosci. 2018. V. 21. P. 440–446.
31. Brezgin S., Kostyusheva A., Kostyushev D., Chulanov V. // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 6041–6067.
32. Chavez A., Tuttle M., Pruitt B.W., Ewen-Campen B., Chari R., Ter-Ovanesyan D., Haque S.J., Cecchi R.J., Kowal E.J.K., Buchthal J. // Nat. Methods. 2016. V. 13. P. 563–567.
33. Russa M., Qi L. // Mol. Cell Biol. 2015. V. 35. P. 3800–3809.
34. Klann T., Black J., Chellappan M., Safi A., Song Hilton I., Crawford G., Reddy T., Gersbach C. // Nat. Biotechnol. 2017. V. 35. P. 561–568.
35. Doench J., Fusi N., Sullender M., Hegde M., Vaimberg E., Donovan K., Smith I., Tothova Z., Craig Wilen C., Or-

- chard R., Virgin H., Listgarten J., Root D. // Nat. Biotechnol. 2016. V. 34. № 2. P. 184–191.
36. Joungh J., Konermann S., Gootenberg J., Abudayyeh O., Randall J., Platt R., Mark D., Brigham M., Sanjana N., Zhang F. // Nat. Protoc. 2017. V. 12. P. 828–863.
 37. Black J., Gersbach C.A. // Curr. Opin. Genet. 2018. V. 52. P. 13–21.
 38. Ho S., Hartley B., Flaherty E., Rajarajan. P., Abdelaal R., Obiorah I., Barretto N., Muhammad H., Phatnani H., Akbarian S., Brennand K. // Stem Cell Reports. 2017. V. 9. P. 615–628.
 39. Datlinger P., I, André F., Rendeiro A., Schmidl C., Krausgruber K., Traxler P., Klughammer J., Schuster L., Kuchler A., Alpar D., Bock D. // Nat. Methods. 2017. V. 14. P. 297–301.
 40. Xie S., Duan J., Li B., Zhou P., Hon G. // Mol. Cell. 2017. V. 66. P. 285–299.
 41. Pei W., Hill A., McFaline-Figueroa J., Starita L., Gasperini, M., Matreyek K., Packer J., Jackson D., Shendure J., Trapnell C. // Nat. Methods, 2018. V. 15. P. 271–274.
 42. Adamson B., Norman T.M., Jost M., Cho M., Nuñez D., Chen Y., I, Villalta J., Gilbert L., Horlbeck M., Hein M., Pak R., Gray A., Gross C., Parnas O., Regev A., Weissman J. // Cell. 2016. V. 167. P. 1867–1882.
 43. Tian R., Gachechiladze M., Ludwig C., Laurie M., Hong J., Nathaniel D., Prabhu A., Fernandopulle M., Patel R., Abshari M., Ward M., Kampmann M. // Neuron. 2019. V. 104. P. 239–255.
 44. Tian R., Abarientos A., Hong J., Hashemi S.H., Yan R., Dräger N., Leng K., Nalls M.A., Singleton A.B., Xu K., Faghri F., Kampmann M. // 2020 preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.06.27.175679>
 45. Naso M.F., Tomkowicz B., Perry W.L., Strohl W.R. // BioDrugs. 2017. V. 31. P. 317–334.
 46. Vogt S., Stadlmayr G., Grillari J., Rüker F., Wozniak-Knopp G. // Current Topics Biochem. Eng. 2019. V. 29. P. 83537–83581.
 47. Moreno A.M., Fu X., Zhu J., Katrekar D., Shih Y.V., Marlett J., Cabotaje J., Tat J., Naughton J., Lisowski L. // Mol. Ther. 2018. V. 26. P. 1818–1827.
 48. Tadie V., Josipovic G., Zoldos Z., Vojta V. // Methods. 2019. V. 164. P. 109–119.
 49. Kishino T., Lalande M., Wagstaff J. // Nat. Genet. 1997. V. 15. P. 70–73.
 50. Braun C.J., Bruno P.M., Horlbeck M.A., Gilbert L.A., Weissman J.S., Hemann M.T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. E3892–E3900.
 51. Syding L., Nickl P., Kasperek P., Sedlacek R. // Cell. 2020. V. 9. P. 993–1018
 52. Liao J.R., Karnik H., Gu M., Ziller M., Clement K., Tsankov A., Akopian V. // Nature. 2015. V. 5. P. 469–478.
 53. Wang S.E., Jiang Y. // Trends Pharmacol. Sci. 2019. V. 40. P. 605–608.
 54. Иллариошкин С.Н., Загоровская Т.Б., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д. // Неврологический журн. 2002. № 5. С. 47–51.
 55. Laganier J., Kells A., Jeffrey T., Guschin D., Paschon P., Meng X., Fong L., Yu Qi., Rebar E., Gregory P., Bankiewicz K., Forsayeth J., Zhang H.S. // J. Neurosci. 2010. V. 30. P. 16469–16474.
 56. Kantor B., Tagliafierro L., Gu J., Madison E., Zamora M., Ilich E., Grenier C., Huang Z., Murphy S., Chiba-Falek O. // Mol. Ther. 2018. V. 26. P. 2638–2649.
 57. Liu X., Wu H., Ji X., Stelzer Y., Wu X., Czauderna S., Shu J., Dadon D., Young R., Jaenisch R. // Cell. 2018. V. 167. P. 233–247.
 58. Bates G.P., Mangiarini L., Mahal A., Davies S.W. // Hum. Mol. Genet. 1997. V. 6. P. 1633–1637.
 59. Garriga-Canut M., Agustin-Pavon C., Herrmann F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 3136–3145.
 60. Tahiliani M., Koh K., Shen Y., Pastor W., Bandukwala H., Brudno H., Agarwal S., Iyer L., Liu D., Aravind L., Rao A. // Science. 2009. V. 324. P. 930–935.

Editing the Epigenome in Neurodegenerative Diseases

A. S. Vetchinova^a, E. Yu. Fedotova^a, and S. N. Illarioshkin^a

^aResearch Center of Neurology, Moscow, Russia

Directed genomic editing using the CRISPR/Cas9 system, introduced into practice in recent years and becoming one of the most impressive achievements of modern molecular biology, makes it possible to efficiently correct genetic information at the cell level. For therapeutic purposes, it is important to make rapid and precise changes in the nucleotide sequence of the genome *in vivo*. And if editing genes includes changing the DNA nucleotide sequence itself and direct correction of genetic information, then epigenetic editing is aimed at controlling the expression of certain genes, primarily by changing the methylation status of specified sites in the genome. By editing epigenomic traits in this way, researchers can determine the exact biological role of epigenetic modification in the development of a particular pathology. The review presents the fundamental and technological foundations of epigenomic editing, as well as the current capabilities of this advanced technology in the study of neurodegenerative diseases.

Keywords: epigenetics, regulation of gene activity, methylation, CRISPR/Cas9, neurodegenerative diseases

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ДЛЯ ТЕРАПИИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА: ОТ ЭКСПЕРИМЕНТА К КЛИНИКЕ

© 2021 г. М. Ю. Степанicheв*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

Поступила в редакцию 13.05.2021 г.

После доработки 22.06.2021 г.

Принята к публикации 23.06.2021 г.

В представленном обзоре рассмотрены современные достижения в области использования методов геномного редактирования для экспериментальной терапии нейродегенеративных заболеваний, в первую очередь болезни Альцгеймера. Кратко рассмотрены основные подходы, используемые для геномного редактирования, и системы редактирования, рассмотрены их преимущества и недостатки. Приведены конкретные примеры использования геномного редактирования для коррекции мутаций в генах, ассоциированных с болезнью Альцгеймера. Проанализированы имеющиеся проблемы, которые необходимо решить для внедрения геномного редактирования в практику лечения нейродегенеративных заболеваний.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, геномное редактирование, CRISPR–Cas9, TALEN, ZFN, бек-лок-предшественник β -амилоида, пресенилины, белок τ , аполипопротеин E

DOI: 10.31857/S1027813321040130

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (БА) — одна из наиболее распространенных причин возникновения деменции у пациентов старшей возрастной группы — представляет собой серьезную проблему для медицины и современного общества в целом. По данным клинко-эпидемиологического исследования репрезентативных групп населения г. Москвы, БА страдает около 4.5% населения в возрасте 60 лет и старше. Экстраполяция этих показателей на половозрастную структуру населения страны в целом показывает, что от этого заболевания страдает около 1% всего населения России [1]. Патогенез БА остается достаточно слабо изученным, несмотря на предпринимаемые усилия. Вероятно, это связано с его комплексностью и манифестацией симптомов после продолжительного латентного периода с момента старта заболевания. Риск развития БА обусловлен действием как моногенных, так и полигенных факторов, а также воздействием факторов окружающей среды. Менее 5% случаев БА, которые связаны с наличием мутаций в генах пресенилинов *PSEN1* и *PSEN2* и белка-предшественника β -амилоида (*APP*), проявляются достаточно рано, в возрасте до 60 лет. Мутация в гене, кодирующем аполипопротеин E (*APOE*),

считается фактором риска развития БА с поздним началом.

Проведенные в последние годы полногеномные исследования позволили связать функции более чем 25 генов с патогенезом БА. Установлена явная связь семейных форм БА с ранним проявлением симптоматики с мутациями в генах *APP*, *PSEN1* и *PSEN2*, по крайней мере, в 10% случаев. Кроме того, около 25% пациентов с поздней манифестацией БА являются носителями мутантного аллеля *APOE* $\epsilon 4$. Наряду с этим была продемонстрирована ассоциация с генами, кодирующими белки, вовлеченные в разные патофизиологические процессы патогенеза БА (табл. 1). Все это указывает на существенную роль генетического компонента в патогенезе этого нейродегенеративного заболевания.

Системы геномного редактирования на основе дизайнерских нуклеаз (нуклеазы цинковых пальцев (zinc finger nucleases, ZFN), подобные транскрипционному активатору эндонуклеазы (transcription activator-like endonuclease, TALEN), CRISPR–Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats-(CRISPR)-associated protein (Cas9)) и другие представляют собой мощный инструмент для манипуляций с генами. Эти системы позволяют осуществлять не только канонические манипуляции с ДНК, такие как делеции или инсерции участков генов (рис. 1а–в), но и нека-

* Адресат для корреспонденции: 117485 Россия, Москва, ул. Бутлерова, 5а; тел.: +7(495)952–40–07; e-mail: m_stepanichev@ihna.ru.

Таблица 1. Возможные гены-мишени для терапевтического воздействия с использованием методов геномного редактирования

Патофизиологические процессы	Гены
Метаболизм APP/ β -амилоида	<i>APP, PSEN1, PSEN2, ApoEϵ4, Clusterin, BACE</i>
Метаболизм/фосфорилирование τ -белка	<i>GSK-3β, P25/Cdk5, Bin-1</i>
Холинергическая трансмиссия	<i>ChAT, nAChR, mAChR</i>
Убиквитинирование	<i>USP7, USP47</i>
Нейровоспаление/иммунитет	<i>CX3CR1, CD33, TREM2, GMF, NLRP3</i>

Примечание: при составлении таблицы использованы данные работ [61–63].

нонические, а именно: репрессия или активация транскрипции и замена отдельных оснований (рис. 1*г–е*). Это дает возможность необратимо инактивировать гены, корректировать их последовательность, модулировать их активность. Разработка методов геномного редактирования для терапии таких моногенных заболеваний, как серповидноклеточная анемия или мышечная дистрофия, является удачным примером использования технологии для лечения моногенных заболеваний. Результаты этой работы с высокой вероятностью будут внедрены в клинику [2]. Успешность применения систем редактирования для модификации генома в нейронах в культуре и в мозге дает надежду на возможность их использования и для терапии заболеваний нервной системы. В этом обзоре мы рассмотрим существующие экспериментальные подходы к коррекции патогенетических механизмов БА, созданные на основе геномного редактирования. В заключении будут кратко проанализированы возможные проблемы, связанные с использованием этих методов, как возможного средства для лечения БА и других нейродегенеративных патологий.

ПОДХОДЫ К РЕДАКТИРОВАНИЮ ГЕНОМА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ

При разработке терапевтических подходов наиболее часто рассматривают три основных типа манипуляций, а именно: инактивация гена, внедрение нового гена и редактирование или модификация гена [3]. Методы геномного редактирования, которые активно разрабатываются в последние десятилетия, способны обеспечить изменение генома в определенном (целевом) участке за счет использования активности направленных нуклеаз. Технически, необходимо обеспечить разрыв двухцепочечной ДНК в участке, где расположен целевой ген, после чего происходит репарация поврежденного участка. В качестве ферментов, осуществляющих разрезание ДНК, выступают эндонуклеазы, которые катализируют расщепление фосфодиэфирных связей внутри полинуклеотидных цепей. В настоящее время наиболее

распространенными как в экспериментальных, так и в клинических исследованиях являются три типа нуклеаз (рис. 1*а–в*): ZFN [4], TALEN [5] и CRISPR/Cas9 [6].

Основными характеристиками каждого из этих инструментов являются наличие эндонуклеазы и ДНК-связывающего домена, который обеспечивает связывание нуклеазы с ДНК и определяет специфичность положения, в котором это связывание происходит [3]. В случае ZFN (рис. 1*а*) точность связывания с целевым участком ДНК определяется наличием минимум трех белков цинковых пальцев, а увеличение числа ДНК-связывающих цинковых пальцев в составе комплекса повышает аффинность связывания, хотя это в свою очередь снижает активность конструкции в целом [7]. Для точного разрезания двух цепей ДНК необходимо, чтобы нуклеаза образовала димер. Поэтому для редактирования определенного участка нужно использовать пару белков, отличающихся по составу цинковых пальцев.

Другой тип конструкций, применяемый для редактирования, использует для связывания с ДНК белки TALE (рис. 1*б*). В отличие от ZFN, в которой каждый домен взаимодействует с тремя нуклеотидами, один домен белка TALE связывается с одним нуклеотидом. Поэтому для обеспечения специфичности связывания TALEN с целевыми участками ДНК необходимо создать достаточно крупный белок, имеющий множество доменов [8]. Разрезание двух цепочек ДНК происходит после образования димера, что так же, как и в случае ZFN, обуславливает использование одновременно двух белков для редактирования одного гена. Обе упомянутые системы редактирования генома обладают сходной эффективностью, но при этом цитотоксичность и сложность получения конструкций ниже в случае использования TALEN [3].

CRISPR–Cas9 является, пожалуй, наиболее распространенным инструментом редактирования генома, основанным на использовании механизма адаптивного иммунитета прокариот. Эта система представлена CRISPR-кассетой и геном, кодирующим белок Cas9. CRISPR–Cas система способна обеспечивать устойчивость клеток прока-

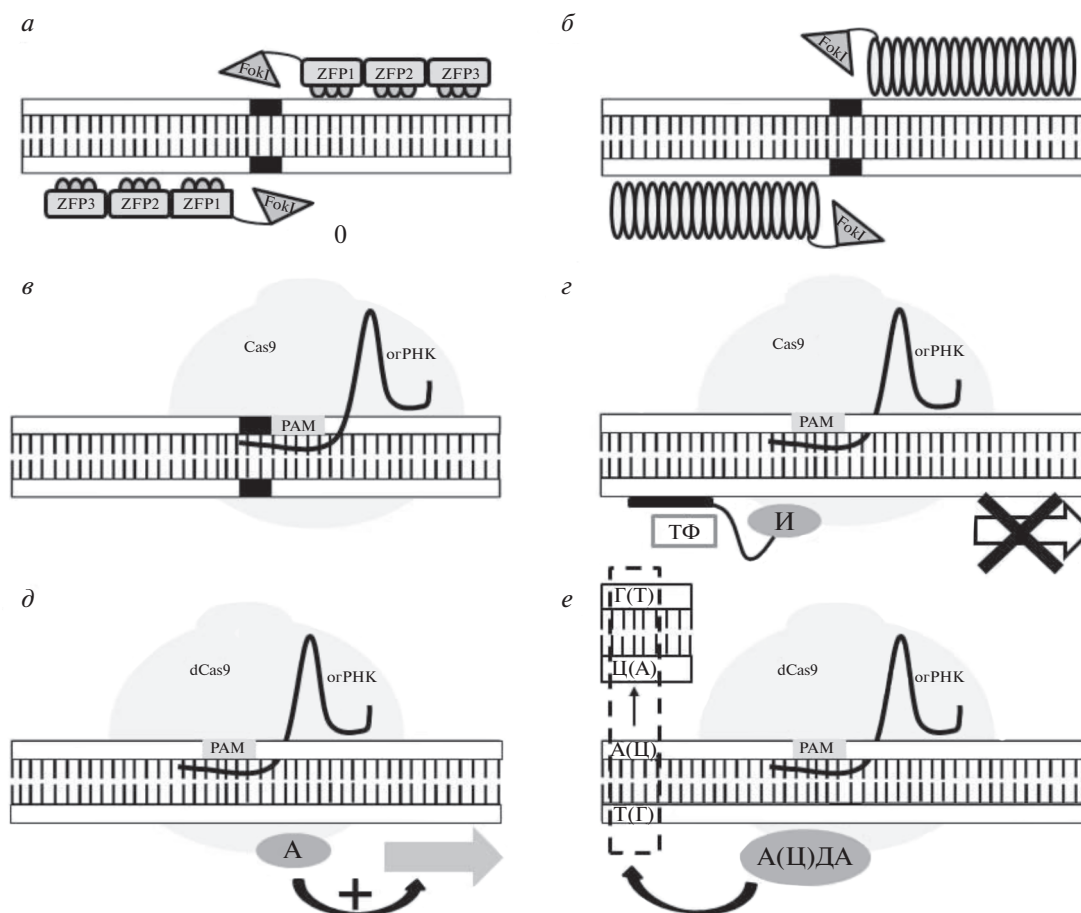


Рис. 1. Канонические и неканонические подходы к использованию дизайнерских нуклеаз. (а–в), использование ZFN, TALEN и CRISPR–Cas9 для получения двухцепочечных разрывов ДНК; (г), применение CRISPR–dCas9 интерференции для репрессии гена; (д), применение CRISPR–dCas9 для активации транскрипции; (е), применение CRISPR–nCas9 для редактирования отдельных оснований. ZFP, белок цинкового пальца; FokI, эндонуклеаза; PAM, protospacer adjacent motif; И, ингибитор транскрипции; ТФ, транскрипционный фактор; А, активатор транскрипции; А(Ц)ДА, аденин(цитозин)дезаминаза.

приот к бактериофагам и плазмидам, которые содержат протоспейсеры, последовательности, комплементарные спейсерам CRISPR-кассеты [9, 10]. В этой системе нуклеаза Cas9 обеспечивает образование двухцепочечного разрыва ДНК, а место этого разрыва определяется последовательностью одноцепочечной направляющей (гидовой) РНК (огРНК). Преимуществом CRISPR–Cas9 является относительная простота конструкции, высокая эффективность редактирования, низкая цитотоксичность, что способствует ее широкому внедрению в исследовательскую практику, а в ближайшем будущем и в терапию ряда обусловленных наследственностью заболеваний [2, 11].

В отличие от описанных выше нуклеаз ZFN и TALEN, белок Cas9 для взаимодействия с ДНК использует CRISPR-кассету, состоящую из CRISPR-ассоциированной РНК и транскриптивирующей РНК (рис. 1а) [12]. Эти две РНК обычно объединены в одну химерную молекулу огРНК. Помимо

двух функциональных доменов огРНК должна содержать последовательность из 20 нуклеотидов, комплементарную целевому участку ДНК. Для обеспечения связывания CRISPR–Cas9 в ДНК должны содержаться последовательности из трех нуклеотидов вида NGG (protospacer adjacent motif, PAM), непосредственно прилегающие к целевому участку со стороны 3'-конца. После взаимодействия с комплементарным огРНК участком ДНК нуклеаза Cas9 разрезает обе цепи, образуя разрыв на расстоянии в три нуклеотида от PAM. Образовавшийся разрыв репарируется путем негомологического соединения концов (non-homologous end joining, NHEJ), при котором свободные концы ДНК сшиваются друг с другом с образованием делеции или вставкой одного или нескольких нуклеотидов. При гомологичной репарации (homologous dependent repair, HDR) разрыв репарируется с использованием дополнительной матрицы, с которой происходит копирование участка вокруг об-

разованного разрыва. В качестве матрицы может служить последовательность нуклеотидов неповрежденной парной хромосомы или последовательность нуклеотидов, внесенная извне с плазмидой или олигонуклеотидом.

Все три типа нуклеаз были апробированы в исследованиях для модификации генома в нейронах и клетках глии [13–16], включая нокаут гена, встраивание нового гена в геном или редактирование имеющихся модификаций гена, препятствующих его нормальной работе. Однако, наряду с этими “каноническими” возможностями, перспективным представляется использование систем редактирования для изменения уровня транскрипции за счет модуляции активности регуляторов транскрипции, изменения уровня метилирования промоторных участков или репрессии транскрипции [17]. В частности, при использовании CRISPR-интерференции деактивированная нуклеаза Cas9 (dCas9) в комплексе с ингибитором транскрипции может быть применена для репрессии гена (рис. 1г). Такой подход может быть перспективен для ингибирования избыточной экспрессии, например, α -синуклеина при болезни Паркинсона или APP при БА. Аналогично этому комплекс CRISPR–dCas9 с активаторами транскрипции может быть использован для реализации альтернативной стратегии (рис. 1д), т.е. CRISPR-активации.

Еще одним важным подходом к использованию возможностей CRISPR–Cas является редактирование однонуклеотидных замен [18]. Присоединение к CRISPR–nCas9 (nickase Cas9) аденин- или цитозин-дезаминазы предоставляет возможность замены А:Т на Г:Ц и Ц:Г на Т:А соответственно (рис. 1е). Такой подход максимально подходит в тех ситуациях, когда PAM расположен вблизи нуклеотида, который необходимо отредактировать, но при этом изменение соседних нуклеотидов нежелательно.

К неканоническим подходам относится и редактирование РНК, которое позволяет изменить экспрессию гена на уровне транскрипта. Несмотря на то, что антисмысловые нуклеотиды известны давно и уже применяются, например, для лечения спинальной мышечной атрофии [19, 20], их использование имеет ряд ограничений. Поэтому использование Cas13d, фермента, который связывается с РНК в клетках и расщепляет ее, может служить альтернативой с большей спецификой в отношении мишени по сравнению с антисмысловыми олигонуклеотидами [21].

В следующих разделах мы рассмотрим применение этих технологий для экспериментальной терапии БА.

КОРРЕКЦИЯ APP/ β -АМИЛОИДНОГО КАСКАДА

Увеличение продукции и секреции β -амилоидного пептида (А β) и образование внеклеточных амилоидных бляшек является характерной чертой БА. Начальным шагом для отложения бляшек является расщепление трансмембранного белка APP с образованием А β , который при определенных условиях агрегирует, способствуя проявлению его нейротоксичных свойств. В патологических условиях агрегаты А β вызывают гибель нейронов и активацию микроглиального ответа, что приводит к дальнейшему прогрессированию заболевания. Образование А β происходит в результате протеолиза APP по амилоидогенному пути, который инициируется расщеплением APP β -секретазой BACE-1 с освобождением растворимого N-терминального фрагмента sAPP β . Оставшийся в мембране C-терминальный фрагмент подвергается дальнейшему расщеплению γ -секретазным ферментативным комплексом с образованием А β 40/42 и пептидом AICD, причем оба пептида способны вызывать гибель нейронов [22].

В настоящее время известно более 60 мутаций гена APP, из которых 27 являются патогенными, и лишь одна защищает от БА (<https://www.alzforum.org/mutations>). Практически все мутации сопровождаются нарушением метаболизма APP, который приводит к сдвигу соотношения образования А β 40/42 в сторону преобладания более склонного к агрегации и токсичного А β 42 [22, 23]. Интересно, что большинство патогенных мутаций расположены возле мест расщепления APP β - или γ -секретазами [24]. Центральными белками мембранного γ -секретазного комплекса являются PSEN1 и PSEN2. Известно 309 мутаций гена PSEN1 и 59 мутаций гена PSEN2, из которых 300 и 15, соответственно, являются патогенными. Мутации этих трех генов приводят к ранней манифестации БА.

Наличие мутаций в этих генах предоставляет возможность применения генно-инженерных технологий для их коррекции. Так, Gyorgy et al. [25] использовали CRISPR–Cas9 для коррекции шведской мутации APP в фибробластах, полученных от пациентов с БА. Трансфекция клеток плазмидами CRISPR и огРНК, нацеленными на мутантный аллель, приводила к его разрушению и 60%-му снижению секреции А β . Трансдукция первичной культуры нейронов, полученных от трансгенных мышей линии Tg2576, с помощью AAV векторов, несущих соответствующие мутации APP(SWE), огРНК и CRISPR–Cas9, также приводила к значимому снижению продукции А β [26]. В этой же работе авторы вводили конструкции в гиппокамп, но единственным результатом, который был опубликован является то, что в ДНК

имелись индел мутации в 1.3% мутантных *APP(SWE)* аллелей.

Активность β -секретазы *BACE1* определяет продукцию $A\beta$ при БА. Стратегия, основанная на CRISPR–Cas9, была применена в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (ИПСК) человека и в мозге мыши для редактирования участка гена *APP*, близкого к С-концу, кодирующему сайт расщепления β -секретазой *BACE-1*. Это позволило модифицировать механизм расщепления *APP* по амилоидогенному пути, ослабляя продукцию $A\beta$ и, в то же время, повышая образование *APP- α* , обладающего нейропротекторными свойствами [27]. При этом не наблюдалось видимого влияния на нейрофизиологию клеток *in vitro*. По всей видимости, использование такой стратегии препятствует сближению *APP* и *BACE-1*, которое необходимо для ферментативной реакции. Несмотря на то, что в настоящее время нет данных о связи мутаций гена, кодирующего этого фермент, с БА, недавно была обнаружена ассоциация полиморфизма *BACE1 C786G* с диабетом второго типа и умеренным когнитивным снижением [28]. Park et al. [29] изучили, могут ли наноконплексы, загруженные CRISPR–Cas9, эффективно нацеливаться на *Bace1* в постмитотических нейронах мозга взрослых мышей линии 5XFAD. Для этого Cas9 и оГРНК были загружены в амфифильный наноконплекс, что позволило получить эффективное нацеливание генов в постмитотических нейронах *in vivo*. Результатом этого было снижение уровня $A\beta$ и когнитивного дефицита как у мышей 5XFAD, так и у мышей с повышенной экспрессией *APP*.

Интересно, что в исландской популяции наличие мутации A673T в гене *APP* снижает расщепление белка *APP* β -секретазой на 40%. Введение этой мутации в ген в клетках линии HEK293T и нейробластомы SH-SY5Y с помощью pCas9-дез-аминазного комплекса приводило к замене остатка аланина на треонин в последовательности белка, которая сопровождалась уменьшением накопления $A\beta$ [30]. Этот механизм может рассматриваться как потенциальный подход к лечению БА.

Наряду с активностью β -секретазы патологическая активность γ -секретазы, возникающая в результате мутаций генов *PSEN1* и *PSEN2*, также способствует продукции токсичного $A\beta_{42}$. Может ли коррекция этих мутаций приводить к нормализации функции клеток? Возможность этого была продемонстрирована в культуре холинергических нейронов, полученных из ИПСК здоровых субъектов и больных БА. Для этого ИПСК направлены дифференцировали в холинергические нейроны и, используя CRISPR–Cas9, исправляли мутацию *PSEN2-N141I*, связанную с семейной формой БА [31]. Это приводило к нормализации соотношения $A\beta_{40}/A\beta_{42}$, а также улучшало электро-

физиологические характеристики нейронов [31] и Ca^{2+} гомеостаз [32].

КОРРЕКЦИЯ ПРОЦЕССОВ, СВЯЗАННЫХ С МЕТАБОЛИЗМОМ БЕЛКА τ

Участие фосфорилирования белка τ в образовании парных спиральных филаментов — основного компонента нейрофибриллярных клубков, не вызывает сомнения, хотя генетические данные не указывают на наличие каких-либо мутаций в гене *MAPT*, кодирующем этот белок, которые приводили бы к развитию БА. В то же время некоторые из 15 известных мутаций (<https://www.alzforum.org/mutations>) могут повышать риск или вызвать развитие фронто-темпоральной деменции. Несмотря на это, было предпринято несколько попыток исправить ряд известных мутаций в гене *MAPT* и изучить последствия этого в ИПСК человека. В частности, Fong et al. [33] использовали ZFN для коррекции мутации A152T. После дифференцировки ИПСК в нейроны наблюдали снижение иммунореактивности гиперфосфорилированного белка τ и улучшение фенотипических характеристик нейронов. Другая группа авторов с помощью плазмидных векторов трансфицировала ИПСК CRISPR–Cas9 и олигонуклеотидной матрицей для коррекции мутации N279K гена *MAPT* [34], но не смогла увидеть существенных изменений в транскриптом исходных и исправленных клеток. В отличие от этой работы авторы исследования [35] использовали CRISPR–Cas9 для коррекции мутации R406W в ИПСК, полученных от больного фронто-темпоральной деменцией с паркинсонизмом. Авторы успешно репарировали мутантный аллель без внесения дополнительных индел мутаций, а клетки при этом сохранили свою плюрипотентность.

Гиперфосфорилирование белка τ зависит от активности целого ряда протеинкиназ, воздействуя на которые можно регулировать этот процесс. Так, повышенная активность циклин-зависимой киназы Cdk5 может приводить к развитию таупатии [36]. Это становится следствием накопления активатора Cdk5 белка p25, который образуется в результате расщепления более крупного регуляторного белка p35 цистеиновой протеазой кальпаином. В условиях патологии, в том числе и при БА, накопление p25 ведет к избыточной активации Cdk5 и способствует гиперфосфорилированию белка τ . Валидность этого механизма подтвердили Seo et al. [37], которые модифицировали ИПСК, полученные от пациента с фронто-темпоральной деменцией, воспользовавшись системой CRISPR–Cas9 для введения в геном этих клеток гена, кодирующего укороченный фрагмент $\Delta p35KI$, неспособный образовывать активатор Cdk5 белок p25. В органоидах, которые получили авторы этой работы отсутствовали признаки

гиперфосфорилирования белка τ . Таким образом, замена гена, кодирующего p35, может быть новым подходом к лечению таупатии. Следует отметить, что попытки изучить влияние других генов, ассоциированных с БА, на метаболизм белка τ не увенчались существенным успехом. Так, CRISPR–Cas9-опосредованный нокаут 22 генов в клетках НЕК293Т не влиял на агрегацию белка τ или захват его агрегатов [38]. Несмотря на недостатки использованной экспериментальной модели, можно предположить, что гены, ассоциированные с развитием БА и вовлеченные в работу сигнальных каскадов, прежде всего связанных с иммунным ответом и липидным метаболизмом, слабо влияют на состояние белка τ .

КОРРЕКЦИЯ МУТАНТНОГО АЛЛЕЛЯ АПОЛИПОПРОТЕИНА *APOE4*

Ранее были приведены примеры коррекции мутаций, которые приводят к развитию ранних форм БА. Основным фактором, который связывают с предрасположенностью к развитию БА в позднем возрасте, является генотип *APOE4*. В мозге ApoE экспрессируется в астроцитах, олигодендроцитах, перicyтах, клетках сосудистого сплетения и, в меньшей степени, в нейронах и участвует в транспорте холестерина и фосфолипидов (см. [39]). В отличие от аллелей $\epsilon 2$ и $\epsilon 3$ мутантный аллель $\epsilon 4$ кодирует последовательность белка ApoE4, который связывается с A β , но не способен полностью освободить мозг от этого патогенного пептида. Это приводит к усиленному образованию сенильных бляшек. В связи с этим возможность модификации мутантного аллеля *APOE4* в нормальный *APOE3* может рассматриваться как подход к лечению БА. Принципиально это можно реализовать с использованием редактора оснований, как это было сделано в работе [40]. Авторы этой работы использовали нуклеофекцию ДНК, кодирующей цитозиндезамину, для замены Ц $\rightarrow$ Г в кодоне 158 и соответствующей оРНК в культуре астроцитов. В результате до 75% ридов содержали исправленную последовательность ДНК. В другой работе [41] были использованы ИПСК пациентов с генотипом *APOE4/E3*, которые при культивировании демонстрировали повышенный протеолиз APP, фосфорилирование белка τ , нарушение Ca²⁺ гомеостаза, по сравнению с клетками, полученными от добровольцев с генотипом *APOE3/E3*. После CRISPR–Cas9-опосредованного редактирования мутантного аллеля были получены изогенные линии клеток E4/E3 и E3/E3. Дифференцировка клеток E3/E3 в нейроны сопровождалась более выраженным отрастанием нейритов. Нейроны E3/E3 были более устойчивы к действию нейротоксинов и имели более низкий уровень фосфорилирования белка τ , но процессинг APP не нормализовался. Тем не менее, модификация

мутантного аллеля *APOE4* имеет терапевтический потенциал для лечения БА.

НЕТРАДИЦИОННЫЕ МИШЕНИ ДЛЯ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Гены, кодирующие функциональные элементы холинергической системы. Холинергический дефицит лежит в основе мнестических нарушений, являющихся отличительной чертой БА, по крайней мере, на ранних этапах патогенеза. Несмотря на это, данные о возможной связи мутаций в генах, кодирующих ферменты синтеза ацетилхолина, или его рецепторы, практически отсутствуют. В опубликованной недавно статье из Чехии [42] говорится о полиморфизме A120T в гене *CHAT*, который при моделировании *in silico* показал ассоциацию с риском развития БА в исследованной популяции. Не исключено, что более глубокое изучение различных компонентов холинергической системы позволит выявить новые мутации и продемонстрировать их связь с БА. В этом случае можно будет рассматривать ген *CHAT*, а возможно и другие гены, как потенциальную мишень для применения геномного редактирования.

Гены, связанные с воспалением/фагоцитозом. В последние годы уделяется большое внимание участию микроглии в патогенезе БА. Микроглия отвечает за удаление A β из мозга и, в значительной степени, за протекание иммунных и воспалительных процессов. Поэтому мутации генов, определяющих активность микроглии, могут оказывать влияние на механизмы развития БА. Одним из таких генов является *TREM2*, кодирующий триггерный рецептор типа 2, экспрессирующийся на миелоидных клетках (Triggering receptor expressed on myeloid cells 2). Трансмембранный белок Trem2 модулирует активность микроглияцитов, связанную с поддержанием энергетического и липидного гомеостаза микроглияцитов в процессе развития и старения мозга [43, 44]. Trem2 рецептор обеспечивает реакцию микроглии на повреждение и концентрацию клеток вблизи амилоидных бляшек [44]. Усиливая активность микроглии в отношении гиперфосфорилированного белка τ в присутствии A β , Trem2 способствует нейропротекции [45]. Мутации в гене *TREM2*, а их насчитывается 48 (<https://www.alzforum.org/mutations>), снижают функциональную активность рецептора и тем самым повышают риск развития БА и других нейродегенеративных заболеваний [45]. Хотя до настоящего времени не было предпринято попыток коррекции известных патогенных мутаций *TREM2* в клетках микроглии, эта мишень представляется интересной с точки зрения разработки подхода к нормализации микроглияльного ответа в условиях БА.

Поверхностный рецептор CD33, экспрессируется фагоцитирующими клетками, включая мик-

роглию [46]. Функции этого рецептора до конца не известны, но считают, что он участвует в фагоцитозе, секреции цитокинов, апоптозе. Полногеномные исследования установили, что экспрессия гена, кодирующего укороченную форму этого белка в клетках микроглии, может иметь протекторный эффект при БА, усиливая фагоцитоз Аβ [47]. Можно ли использовать эту мишень для проведения генной терапии еще необходимо исследовать.

Недавно был открыт редкий вариант гена *PLCG2* (p.P522R), кодирующий фосфолипазу С-гамма-2. Этот фермент экспрессируется в миелоидных клетках и снижает риск развития БА [48]. Введение этого гена в геном мыши при помощи CRISPR–Cas9 повышало острый воспалительный ответ макрофагов, полученных от этих животных, но не приводило к увеличению числа микроглиальных клеток или изменению их морфологии в коре больших полушарий мозга [49]. Вместе с тем функциональная активность такой модифицированной микроглии возрастала, что указывает на возможность использования этого подхода для улучшения устойчивости мозга к развитию БА.

Для других генов, ассоциация функции или дисфункции которых с патогенезом БА была выявлена в недавних полногеномных исследованиях, роль в развитии этого заболевания только выясняется. Поэтому представляется преждевременным говорить о значении их модификации для терапии БА даже в эксперименте.

ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Достижения функциональной геномики существенно продвинули понимание работы мозга на клеточном уровне в норме и при патологии, предоставив целый ряд инструментов, которые позволяют исследовать роль отдельных генов в моделях на клетках и живых организмах. Так, генетические факторы, связанные с развитием целого ряда неврологических заболеваний, включая БА, болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона и другие, были введены в геном животных и исследованы (см. например [50–52]). CRISPR–Cas9, по-видимому, существенно упрощает и облегчает модификацию генов по сравнению с другими имеющимися средствами и может быть использована для разработки подходов к терапии как наследуемой, так и ненаследуемой БА (рис. 2). Однако имеющиеся в теории возможности ставят перед исследователями и врачами целый ряд вопросов, которые необходимо уточнить до принятия решения об их практическом использовании. Условно их можно разделить на вопросы безопасности, доставки и этические проблемы.

Одним из важнейших вопросов остается безопасность использования инструментов редактирования, в первую очередь на основе CRISPR–Cas9. Это обусловлено небольшим размером огРНК, которая направляет нуклеазу к целевому участку гена. Известно, что генетически детерминированные формы БА наследуются по аутосомно-доминантному типу, проявляясь при наличии даже одного мутантного аллеля [53]. Поэтому редактирование должно затрагивать только мутантный аллель, оставляя здоровый аллель или гомологичные участки генома интактными, что не всегда удается на практике. Например, использование упоминавшегося ранее конъюгированного с CRISPR–Cas9 редактора оснований для внесения патогенной мутации в ген *PSEN1* вызывало изменения и в структуре гена *PSEN2* [54]. В то же время авторы большинства рассмотренных работ, которые проводили секвенирование генома клеток после их модификации, сообщают об отсутствии существенных изменений за пределами целевого участка редактирования.

Введение в мозг конструкций, несущих элементы систем редактирования, представляет собой существенную проблему. Хотя имеющиеся в распоряжении исследователей плазмиды способны доставлять генетический материал огРНК и Cas9 в клетки разных тканей, их использование для трансфекции зрелого мозга затруднено. Наиболее вероятным средством доставки систем редактирования в мозг являются векторы на основе рекомбинантных лентивирусов (rLV) или аденоассоциированных вирусов (rAAV). Размеры плазмиды, несущей ген, кодирующий наиболее используемую нуклеазу Cas9 из *Streptococcus pyogenes*, составляют более 10 kb. Поэтому упаковать одновременно огРНК и CRISPR–Cas9 можно только в вектор на основе rLV. Однако такие вирусы интегрируются в ДНК хозяина, что может приводить к нежелательным последствиям. Перспективным представляется использование интеграз-дефицитных LV (IDLV), которые лишены способности встраиваться в геном хозяина и экспрессируются временно [55]. Использование отдельных rAAV вирусов для огРНК и CRISPR–Cas9 требует заражения одних и тех же клеток двумя векторами одновременно, что влияет на конечную эффективность трансдукции и редактирования. Вместе с тем в успешных экспериментах уровень коэкспрессии таких конструкций в мозге достигает 60% [56]. Следует отметить, что разрабатываются и другие, не содержащие вирусов, векторные системы, такие как наночастицы, наноструктурные ДНК ячеики с полиэтиленгликолем, микровезикулы [57].

Помимо проблемы побочных эффектов воздействия и доставки необходимо решить задачу выбора стратегии применения методов геномного редактирования. В известных клинических испытаниях по восполнению синтеза фактора роста

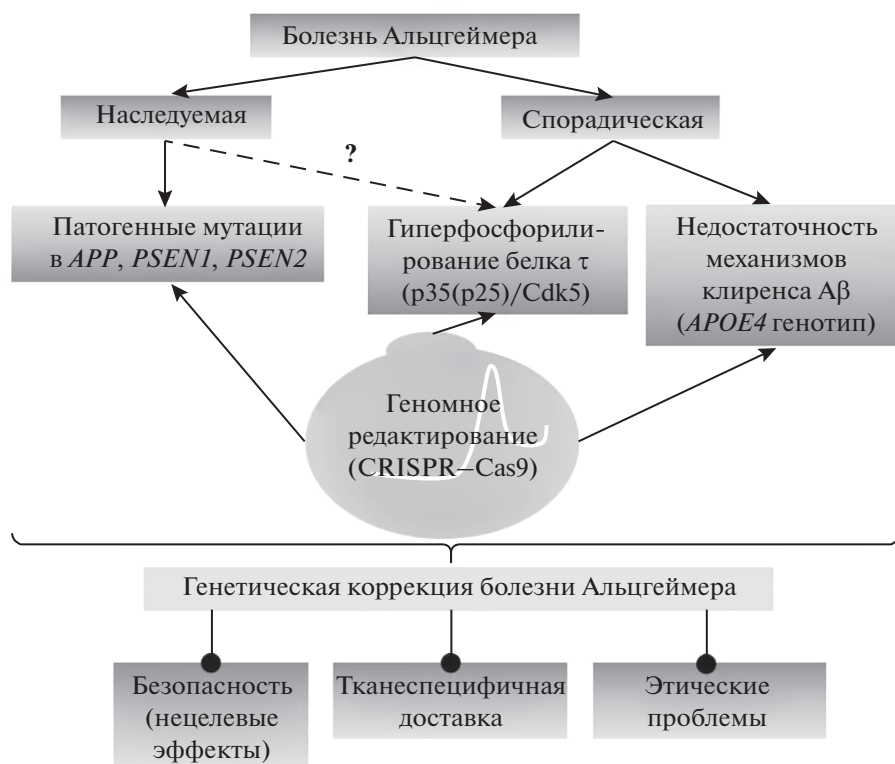


Рис. 2. Возможности использования редактирования генома для терапии наследуемой и ненаследуемой БА и проблемы, которые нуждаются в решении. Расшифровку аббревиатур см. в тексте.

нервов в мозге пациентов с БА использовали либо аутологичные клетки, которые после *ex vivo* трансдукции AAV вектором, несущим ген *NGF*, трансплантировали в мозг, либо прямые инъекции вектора [58, 59]. В идущих клинических испытаниях генной терапии векторные конструкции вводят внутривенно, внутрицистернально или внутритетально (см. [60]). Методы геномного редактирования, которые апробируются для лечения серповидноклеточной анемии, предполагают *ex vivo* редактирование аутологичных гематопоэтических или прекурсорных клеток. В случае, когда аутологичные клетки определенных тканей проблематично получить для *ex vivo* редактирования как, например, при мышечной дистрофии, предлагается проводить терапию *in vivo* [2]. Ткань мозга скорее относится ко второму типу, который требует непосредственного введения конструкций, необходимых для редактирования. Такой тип воздействия будет лимитирован способностью вектора распространяться в паренхиме мозга и редактированием генома в ограниченном количестве клеток. Будет ли этого достаточно для восстановления нарушенных функций нужно выяснить в будущих исследованиях. Наконец, для применения геномного редактирования с целью терапии БА необходимо решить, когда и/или на какой стадии

развития патологического процесса будет возможно применять такой подход.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Генная инженерия начиналась в 1970-е с манипуляций с нуклеиновыми кислотами, а сегодня находится на переднем крае науки, позволяя редактировать отдельные гены. По-видимому, наиболее перспективным со многих точек зрения средством редактирования будет в ближайшие годы система CRISPR–Cas9. Использование методов геномного редактирования на основе этой системы для коррекции некоторых моногенных заболеваний уже является реальностью. Нейродегенеративные заболевания, в том числе и БА, с их прогрессирующим течением, поздней манифестацией и в большинстве случаев полигенной природой представляют серьезный вызов для нейробиологии и медицины. В то же время налицо определенные успехи использования геномного редактирования для исправления на молекулярном уровне нарушений, обусловленных мутациями в генах *APP*, *PSEN1*, *PSEN2*, *MAPT* и *APOE4*, в экспериментальных условиях. Несмотря на то, что предстоит преодолеть еще множество проблем, развитие систем редактирования и векторной доставки, оценки рисков вместе с прозрачностью

исследований и кооперацией исследователей без-условно позволит начать новую эру в лечении бо-лезни Альцгеймера.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-015-00226).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Калын Я.Б., Гаврилова С.И. // Современная терапия в психиатрии и неврологии. 2014. № 2. С. 10–15.
2. Doudna J.A. // Nature. 2020. V. 578. P. 229–236.
3. Chugunova A.A., Dontsova O.A., Sergiev P.V. // Biochemistry (Mosc.). 2016. V. 81. P. 662–677.
4. Kim Y.G., Cha J., Chandrasegaran S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 1156–1160.
5. Miller J.C., Tan S., Qiao G., Barlow K.A., Wang J., Xia D.F., Meng X., Paschon D.E., Leung E., Hinkley S.J., Dulay G.P., Hua K.L., Ankoudinova I., Cost G.J., Urmov F.D., Zhang H.S., Holmes M.C., Zhang L., Gregory P.D., Rebar E.J. // Nat. Biotechnol. 2011. V. 29. P. 143–150.
6. Doudna J.A., Charpentier E. // Science. 2014. V. 346. P. 1258096.
7. Shimizu Y., Şöllü C., Meckler J.F., Adriaenssens A., Zykovich A., Cathomen T., Segal D.J. // Biochemistry. 2011. V. 50. P. 5033–5041.
8. Cermak T., Doyle E.L., Christian M., Wang L., Zhang Y., Schmidt C., Baller J.A., Somia N.V., Bogdanove A.J., Voytas D.F. // Nucleic Acids Res. 2011. V. 39. P. e82.
9. Smirnov A.V., Yunusova A.M., Lukyanchikova V.A., Batulin N.R. // Vavilov J. Genet. Breed. 2016. V. 20. P. 493–510.
10. Savitskaya E.E., Musharova O.S., Severinov K.V. // Biochemistry (Mosc.). 2016. V. 81. P. 653–661.
11. Bannikov A.V., Lavrov A.V. // Mol. Biol. (Mosc.). 2017. V. 51. P. 582–594.
12. Wright A.V., Nuñez J.K., Doudna J.A. // Cell. 2016. V. 164. P. 29–44.
13. Hsu P.D., Zhang F. // ACS Chem. Neurosci. 2012. V. 3. P. 603–610.
14. Powell S.K., Gregory J., Akbarian S., Brennand K.J. // Mol. Cell. Neurosci. 2017. V. 82. P. 157–166.
15. Savell K.E., Bach S.V., Zipperly M.E., Revanna J.S., Goska N.A., Tuscher J.J., Duke C.G., Sultan F.A., Burke J.N., Williams D., Ianov L., Day J.J. // eNeuro. 2019. V. 6. P. ENEURO.0495-18.2019.
16. Feng W., Liu H.K., Kawauchi D. // Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry. 2018. V. 81. P. 459–467.
17. Savell K.E., Day J.J. // Yale J. Biol. Med. 2017. V. 90. P. 567–581.
18. Gaudelli N.M., Komor A.C., Rees H.A., Packer M.S., Badran A.H., Bryson D.I., Liu D.R. // Nature. 2017. V. 551. P. 464–471.
19. Talbot K., Wood M.J.A. // Sci. Transl. Med. 2019. V. 11. P. eaay2069.
20. Rinaldi C., Wood M.J.A. // Nat. Rev. Neurol. 2018. V. 14. P. 9–22.
21. Abudayyeh O.O., Gootenberg J.S., Franklin B., Koob J., Kellner M.J., Ladha A., Joung J., Kirchgatterer P., Cox D.B.T., Zhang F. // Science. 2019. V. 365. P. 382–386.
22. Nhan H.S., Chiang K., Koo E.H. // Acta Neuropathol. 2015. V. 129. P. 1–19.
23. Tcw J., Goate A.M. // Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2017. V. 7. P. a024539.
24. Dai M.H., Zheng H., Zeng L.D., Zhang Y. // Oncotarget. 2018. V. 9. P. 15132–15143.
25. Gyorgy B., Ingelsson M., Lööv C., Takeda S., Lannfelt L., Hyman B.T., Breakefield X.O. // Mol. Ther. 2016. V. 24. P. S226–S227.
26. György B., Lööv C., Zaborowski M.P., Takeda S., Kleinstiver B.P., Commins C., Kastanenka K., Mu D., Volak A., Giedraitis V., Lannfelt L., Maguire C.A., Joung J.K., Hyman B.T., Breakefield X.O., Ingelsson M. // Mol. Ther. Nucleic Acids. 2018. V. 11. P. 429–440.
27. Sun J., Carlson-Stevermer J., Das U., Shen M., Delenclos M., Snead A.M., Koo S.Y., Wang L., Qiao D., Loi J., Petersen A.J., Stockton M., Bhattacharyya A., Jones M.V., Zhao X., McLean P.J., Sproul A.A., Saha K., Roy S. // Nat. Commun. 2019. V. 10. P. 53.
28. Tian S., Huang R., Guo D., Lin H., Wang J., An K., Wang S. // Curr. Alzheimer Res. 2020. V. 17. P. 355–364.
29. Park H., Oh J., Shim G., Cho B., Chang Y., Kim S., Baek S., Kim H., Shin J., Choi H., Yoo J., Kim J., Jun W., Lee M., Lengner C.J., Oh Y.K., Kim J. // Nat. Neurosci. 2019. V. 22. P. 524–528.
30. Guyon A., Rousseau J., Bégin F.G., Bertin T., Lamothe G., Tremblay J.P. // Mol. Ther. Nucleic Acids. 2021. V. 24. P. 253–263.
31. Ortiz-Virumbrales M., Moreno C.L., Kruglikov I., Marazuela P., Sproul A., Jacob S., Zimmer M., Paull D., Zhang B., Schadt E.E., Ehrlich M.E., Tanzi R.E., Arancio O., Noggle S., Gandy S. // Acta Neuropathol. Commun. 2017. V. 5. P. 77.
32. Moreno C.L., Della Guardia L., Shnyder V., Ortiz-Virumbrales M., Kruglikov I., Zhang B., Schadt E.E., Tanzi R.E., Noggle S., Buettner C., Gandy S. // Mol. Neurodegener. 2018. V. 13. P. 33.
33. Fong H., Wang C., Knoferle J., Walker D., Balestra M.E., Tong L.M., Leung L., Ring K.L., Seeley W.W., Karydas A., Kshirsagar M.A., Boxer A.L., Kosik K.S., Miller B.L., Huang Y. // Stem Cell Reports. 2013. V. 1. P. 226–234.
34. Hallmann A.L., Araújo-Bravo M.J., Mavrommatis L., Ehrlich M., Röpke A., Brockhaus J., Missler M., Sternneckert J., Schöler H.R., Kuhlmann T., Zaehres H., Hargus G. // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 42991.
35. Nimsanor N., Kitiyanant N., Poulsen U., Rasmussen M.A., Clausen C., Mau-Holzmann U.A., Nielsen J.E., Nielsen T.T., Hyttel P., Holst B., Schmid B. // Stem Cell Res. 2016. V. 17. P. 556–559.

36. Patrick G.N., Zukerberg L., Nikolic M., de la Monte S., Dikkes P., Tsai L.H. // *Nature*. 1999. V. 402. P. 615–622.
37. Seo J., Kritskiy O., Ashley Watson L., Barker S.J., Dey D., Raja W.K., Lin Y.T., Ko T., Cho S., Penney J., Silva M.C., Sheridan S.D., Lucente D., Gusella J.F., Dickerson B.C., Haggarty S.J., Tsai L.H. // *J. Neurosci*. 2017. V. 37. P. 9917–9924.
38. Kolay S., Diamond M.I. // *FEBS Open Bio*. 2020. V. 10. P. 1912–1920.
39. Husain M.A., Laurent B., Plourde M. // *Front. Neurosci*. 2021. V. 15. P. 630502.
40. Komor A.C., Kim Y.B., Packer M.S., Zuris J.A., Liu D.R. // *Nature*. 2016. V. 533. P. 420–424.
41. Wadhvani A.R., Affaneh A., Van Gulden S., Kessler J.A. // *Ann. Neurol*. 2019. V. 85. P. 726–739.
42. Hálová A., Janoutová J., Ewerlingová L., Janout V., Bonczek O., Zeman T., Gerguri T., Balcar V.J., Šerý O. // *J. Biomed. Sci*. 2018. V. 25. P. 41.
43. Konishi H., Kiyama H. // *Neurochem. Int*. 2020. V. 141. P. 104878.
44. Rueda-Carrasco J., Hong S. // *Trends Neurosci*. 2020. V. 43. P. 739–740.
45. Haass C. // *Neuron*. 2021. V. 109. P. 1243–1245.
46. Zhao L. // *Gerontology*. 2019. V. 65. P. 323–331.
47. Bhattacharjee A., Jung J., Zia S., Ho M., Eskandari-Sedighi G., St Laurent C.D., McCord K.A., Bains A., Sidhu G., Sarkar S., Plemel J.R., Macauley M.S. // *Mol. Neurodegener*. 2021. V. 16. P. 19.
48. Magno L., Lessard C.B., Martins M., Lang V., Cruz P., Asi Y., Katan M., Bilsland J., Lashley T., Chakrabarty P., Golde T.E., Whiting P.J. // *Alzheimer's Res. Ther*. 2019. V. 11. P. 16.
49. Takalo M., Wittrahm R., Wefers B., Parhizkar S., Jokivarsi K., Kuulasmaa T., Mäkinen P., Martiskainen H., Wurst W., Xiang X., Martinen M., Poutiainen P., Haapasalo A., Hiltunen M., Haass C. // *Mol. Neurodegener*. 2020. V. 15. P. 52.
50. Stepanichev M.Y. // *Adv. Gerontol*. 2019. V. 9. P. 154–163.
51. Stepanichev M. // *Front. Genome Ed*. 2020. V. 2. P. 4.
52. van Giau V., Lee H., Shim K.H., Bagyinszky E., An S.S.A. // *Clin. Interv. Aging*. 2018. V. 13. P. 221–233.
53. Van Cauwenberghe C., Van Broeckhoven C., Sleegers K. // *Genet. Med*. 2016. V. 18. P. 421–430.
54. Sasaguri H., Nagata K., Sekiguchi M., Fujioka R., Matsuba Y., Hashimoto S., Sato K., Kurup D., Yokota T., Saido T.C. // *Nat. Commun*. 2018. V. 9. P. 2892.
55. Wang X., Wang Y., Wu X., Wang J., Wang Y., Qiu Z., Chang T., Huang H., Lin R.J., Yee J.K. // *Nat. Biotechnol*. 2015. V. 33. P. 175–179.
56. Swiech L., Heidenreich M., Banerjee A., Habib N., Li Y., Trombetta J., Sur M., Zhang F. // *Nat. Biotechnol*. 2015. V. 33. P. 102–106.
57. Hanafy A.S., Schoch S., Lamprecht A. // *Pharmaceutics*. 2020. V. 12. P. 1–14.
58. Tuszyński M.H., Yang J.H., Barba D., U.H.S., Bakay R.A., Pay M.M., Masliah E., Conner J.M., Kobalka P., Roy S., Nagahara A.H. // *JAMA Neurol*. 2015. V. 72. P. 1139–1147.
59. Tuszyński M.H., Thal L., Pay M., Salmon D.P., U.H.S., Bakay R., Patel P., Blesch A., Vahlsing H.L., Ho G., Tong G., Potkin S.G., Fallon J., Hansen L., Mufson E.J., Kordower J.H., Gall C., Conner J. // *Nat. Med*. 2005. V. 11. P. 551–555.
60. Sun J., Roy S. // *Nat. Neurosci*. 2021. V. 24. P. 297–311.
61. Robinson M., Lee B.Y., Hane F.T. // *J. Alzheimers. Dis*. 2017. V. 57. P. 317–330.
62. Raikwar S.P., Kikkeri N.S., Sakuru R., Saeed D., Zahoor H., Premkumar K., Mentor S., Thangavel R., Dubova I., Ahmed M.E., Selvakumar G.P., Kempuraj D., Zaheer S., Iyer S.S., Zaheer A. // *J. Neuroimmune Pharmacol*. 2019. V. 14. P. 608–641.
63. Sims R., Hill M., Williams J. // *Nat. Neurosci*. 2020. V. 23. P. 311–322.

Using Genome Editing for Alzheimer's Disease Therapy: From Experiment to Clinic

M. Yu. Stepanichev

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Here we review the current achievements in the use of genome editing methods for experimental therapy of neurodegenerative diseases, primarily Alzheimer's disease. The main approaches used for genome editing and editing systems as well as their advantages and disadvantages are considered. Specific examples of the use of genome editing to correct mutations in genes associated with Alzheimer's disease are presented. The existing problems that need to be solved for the introduction of genome editing in the practice of treating neurodegenerative diseases are analyzed.

Keywords: Alzheimer's disease, genome editing, CRISPR–Cas9, TALEN, ZFN, amyloid precursor protein, presenilins, τ protein, apolipoprotein E

ГЕН *SLC6A1* И ПСИХОНЕВРОЛОГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ: РОЛЬ МУТАЦИЙ, ПЕРСПЕКТИВЫ ЛЕЧЕНИЯ ПРИ ПОМОЩИ СИСТЕМ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА

© 2021 г. Е. С. Букина^{1, 2, *}, Н. В. Кондратьев³, С. В. Козин¹, В. Е. Голимбет³,
А. С. Артюхов², Э. Б. Дашиинимаев^{2, 4}

¹ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

²Центр высокоточного геномного редактирования и генетических технологий для биомедицины,
РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

³ФГБНУ Научный центр психического здоровья, Москва, Россия

⁴ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

Поступила в редакцию 21.05.2021 г.

После доработки 08.06.2021 г.

Принята к публикации 11.06.2021 г.

SLC6A1 (solute carrier family 6 member 1) — ген, кодирующий белок-транспортёр гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) GAT1. GAT1 отвечает за обратный захват ГАМК из синаптической щели и межклеточного пространства. Мутации в гене *SLC6A1* могут приводить к нарушению ГАМК-регуляции и связаны с эпилепсией и рядом психических заболеваний. В этом обзоре мы рассматриваем роль белка GAT1 в ГАМКергической регуляции и связь мутаций в гене *SLC6A1* с эпилепсией, расстройствами аутистического спектра, умственной отсталостью и шизофренией, а также перспективы их лечения при помощи систем редактирования генома.

Ключевые слова: *SLC6A1*, GAT1, ГАМКергическая система, мутации *de novo*, РАС, умственная отсталость, эпилепсия, шизофрения

DOI: 10.31857/S102781332104004X

ВВЕДЕНИЕ

SLC6A1 (The Solute Carrier Family 6 Member 1) — ген, кодирующий белок-транспортёр GAT1 (GABA transporter 1). Функция белка GAT1 состоит в удалении избытка гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) из синаптической щели и прекращении ГАМК-нейротрансмиссии [1]. ГАМК является главным тормозным нейромедиатором в центральной нервной системе (ЦНС). В свою очередь транспортёр GAT1 играет важную роль в контроле вне-синаптической концентрации ГАМК, модулируя как фазовое, так и тоническое торможение [2–5]. Кроме того, ГАМК является нейротрофическим фактором и играет важную роль на ранних этапах развития мозга и пролиферации нейрональных стволовых клеток [6, 7].

Клинические проявления мутаций в *SLC6A1* включают в себя широкий спектр заболеваний [8, 9]. Основным заболеванием, для которого характерны мутации в гене *SLC6A1*, является эпилепсия. Эти мутации имеют тенденцию встречаться в

более тяжелых случаях эпилепсии [10, 11]. Эпилепсия часто сопровождается расстройствами аутистического спектра (РАС), умственной отсталости (УО) и различных неврологических симптомов (атаксия или неустойчивая походка, тремор и нарушения мелкой моторики) [10]. Поиск редких и *de novo* мутаций у больных с РАС показал связь мутаций в гене *SLC6A1* с аутизмом [12, 13]. Непосредственную связь мутаций с РАС пока сложно оценить, поскольку аутизм коморбиден с эпилепсией [14] и для этой болезни также характерны нарушения в работе ГАМКергической системы [15]. Мутации в гене *SLC6A1* оказались основным результатом исследования, посвященного поиску *de novo* мутаций у больных шизофренией, причем все носители мутаций не имели симптомов, связанных с эпилепсией и РАС, что говорит о независимой роли *SLC6A1* в патогенезе шизофрении [16]. Было показано, что для больных шизофренией характерно нарушение функционирования белка GAT1 в ряде областей головного мозга (в префронтальной коре [17], лимбической системе [18] и мозжечке [19]). Согласно базе “GWAS Catalog” (www.ebi.ac.uk/gwas/genes/SLC6A1) на момент написания этого обзора, в гене *SLC6A1* были

* Адресат для корреспонденции: 119991 Россия, Москва, ул. Большая Пироговская, д. 2, стр. 4, e-mail: zhenya.bukina97@gmail.com.

найжены полиморфизмы, ассоциированные с рядом заболеваний, среди которых миопия [20], рак матки [21], алкоголизм [22]. В исследовании генетической предрасположенности к алкогольной зависимости полиморфизмы в гене *SLC6A1* были обнаружены как второй по значимости сигнал среди полученных результатов, что неудивительно, учитывая, что этанол действует на организм в том числе через рецепторы ГАМК. Кроме того, ассоциации гена *SLC6A1* с синдромом дефицита внимания/гиперактивности (СДВГ) были найдены в крупном кандидатном исследовании [23] и раннем GWAS [24], однако, в более поздних GWAS эти ассоциации не были реплицированы [25].

Таким образом, изучение роли генетических особенностей, связанных с мутациями в гене *SLC6A1*, в патогенезе различных заболеваний может позволить глубже понять механизмы их развития и разработать новые подходы к их диагностике и, возможно, генной терапии.

ГЕН *SLC6A1*

Ген *SLC6A1* принадлежит к семейству, включающему 19 паралогичных генов, кодирующих переносчики простых химических веществ. У человека он локализован на 3 хромосоме (3p25.3) и согласно геномному браузеру Ensembl (<http://www.ensembl.org>, v103) его размер составляет 47061 п.н. Ген *SLC6A1* содержит 18 экзонов, имеет несколько аннотированных альтернативных промоторов, с которых может экспрессироваться 41 альтернативный транскрипт. Экспрессия различных вариантов гена *SLC6A1* изучена недостаточно. Есть исследования, связывающие различные альтернативные транскрипты с эпилепсией [26] и развитием СДВГ [27]. На момент написания обзора для *SLC6A1* было известно 277 ортологов. Значительный объем генетических исследований GAT1 сделан на генах-ортологах у лабораторных животных.

SLC6A1 в основном экспрессируется центральной нервной системе. В головном мозге GAT1 локализован преимущественно на пресинаптической мембране аксонов ГАМКергических нейронов [28]. В исследованиях на модельных животных также показано присутствие транспортера на мембранах астроцитов [29], олигодендроцитов [30] и клетках микроглии [31]. Вне мозга заметная экспрессия *SLC6A1* наблюдается в тканях печени, однако, согласно базе Human Protein Atlas (www.proteinatlas.org), самого белка GAT1 в печени почти нет [32]. Кроме того, GAT1 обнаруживается в мужской половой системе, где белок, по-видимому, необходим для нормального сперматогенеза [33].

РОЛЬ БЕЛКА GAT1 В ГАМКЕРГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ

GAT1 осуществляет перенос ГАМК вместе с ионами натрия и хлора из синаптической щели в терминали пресинаптических нейронов и близлежащие глиальные клетки, тем самым способствуя прекращению ГАМК-сигналикации (рис. 1) [34].

Транспорт ГАМК — это активный процесс, требующий наличия электрохимического градиента для Na^+ , создаваемого Na^+/K^+ АТФазой. ГАМК-транспортеры осуществляют совместный перенос ГАМК, Na^+ и Cl^- в соотношении 1 ГАМК : 2Na^+ : 1Cl^- по градиенту концентрации ионов Na^+ и Cl^- [35, 36]. Обратный захват нейромедиатора происходит в течение миллисекунд после его высвобождения и, таким образом, не позволяет ГАМК активировать соседние синапсы [37]. Однако GAT1, являясь ионным каналом, участвует в генерации еще как минимум двух токов, которые стехиометрически не связаны с переносом ГАМК, Na^+ и Cl^- через мембрану: (1) ГАМК-опосредованный ток ионов Na^+ во внутриклеточное пространство [38]; (2) ГАМК-независимый катионный ток утечки [39]. Благодаря этим токам активация GAT1 может создавать локальные изменения мембранного потенциала [37].

Основная функция ГАМКергической системы состоит в модуляции текущей активности нейронных сетей. Воздействуя на ионотропные и метаботропные рецепторы, ГАМК контролирует генерацию потенциалов действия и временную структуру паттернов активности, создаваемых целыми популяциями нейронов [40–43]. Это требует тонкого контроля времени активации ГАМК-рецепторов, что, в свою очередь, зависит от точного времени высвобождения ГАМК из пресинаптических терминалей и клиренса ГАМК из внеклеточного пространства. Для нормальной работы ГАМК-рецепторов, обеспечивающих высокое отношение сигнала к шуму, концентрация нейромедиатора в окружающей внеклеточной жидкости должна поддерживаться на низком уровне. Это может быть достигнуто только путем обратного захвата, поскольку метаболизм ГАМК осуществляется внутриклеточно в нейронах и глиальных клетках (рис. 2) [44–46]. Кроме того, работа ГАМК-транспортеров ограничивает выход ГАМК из активных синапсов (т.е. перелив) и, следовательно, контролирует пространственную специфичность ГАМКергической передачи [47–49].

В ряде экспериментов с нокаутированием *SLC6A1* у мышей были выявлены такие проявления, как снижение агрессивности [50], тревоги, депрессии [51], гипалгезия [52] и снижение поведенческих реакций по отношению к этанолу [53]. Данные результаты могут быть ассоциированы с повышенным внеклеточным уровнем ГАМК в связи с дисфункцией GAT1 и, соответственно,

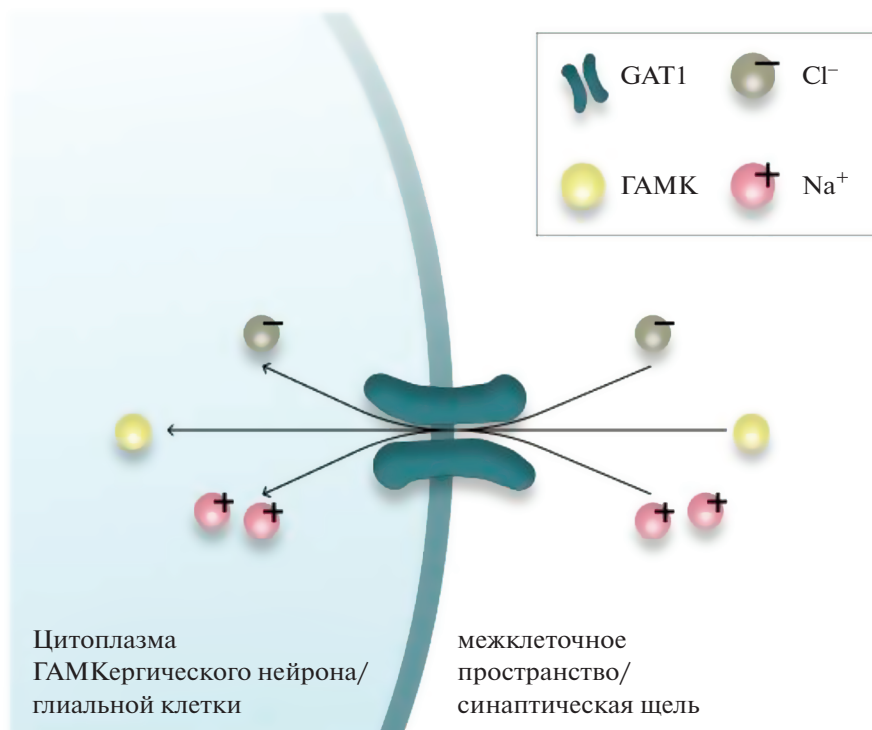


Рис. 1. Функция ГАМК-транспортера GAT1. Транспорт ГАМК за счет ко-транспорта ионов Na^+ и Cl^- .

усилением торможения, поскольку GAT1 считается основным транспортером ГАМК в ЦНС. Однако в работах Chiu и др. у нокаутированных по гену *SLC6A1* мышей наблюдались тремор, атаксия, нервозность и повышенное ГАМК-индуцированное возбуждение в мозжечке [54, 55]. Этот фенотип напоминает побочные эффекты лечения высокоселективным ингибитором GAT1 – тиагабином (противоэпилептический препарат) [56].

Для понимания подобных фенотипических проявлений рассмотрим возможные последствия дисфункции GAT1 в контексте строения ГАМКергической системы.

Семейство ГАМК-транспортеров. Транспортеры гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК-транспортеры) относятся к семейству переносчиков SLC6 (solute carrier 6 transporter family). Семейство SLC6 состоит из 19 белков и, в зависимости от характера переносимых веществ, подразделяется на четыре группы: ГАМК-транспортеры, транспортеры аминокислот, транспортеры моноаминов и транспортеры незаменимых аминокислот (рис. 3) [57]. Эти транспортеры поддерживают внеклеточный уровень ГАМК и возбуждающих аминокислот на низком уровне и регулируют таким образом их функциональную активность и внутриклеточный метаболизм. Транспортеры обладают различными свойствами как в отношении их транспортных функций (обратного захвата ней-

ромедиаторов), так и в отношении их способности действовать в качестве ионных каналов [58].

Группа ГАМК-транспортеров состоит из шести белков: A1/GAT1, A13/GAT2, A11/GAT3, A12/BGT1, A8/CT1 и A6/TauT, каждый из которых способен транспортировать ГАМК и другие молекулы: β -аланин (GAT2 и GAT3), таурин (TauT), креатин (CT1) и бетаин (BGT1) [59]. Среди указанных транспортеров наибольшую роль в процессах обратного захвата ГАМК играют белки GAT1, GAT2 и GAT3 (в особенности GAT1) [8, 45, 59, 60]. GAT1 принадлежит к высокоселективным, натрий- и хлорид-зависимым ГАМК-транспортерам и локализуется преимущественно на пресинаптической мембране ГАМКергических нейронов и в меньшей степени на мембранах астроцитов, окружающих синапс [36, 45, 58].

Результаты иммуногистохимических анализов у крыс отражают слабую экспрессию GAT2 в ЦНС по сравнению с периферическими органами, и наоборот, широкое распространение GAT1 и GAT3 по всему мозгу [61]. Самые высокие уровни экспрессии GAT1 наблюдаются в гиппокампе, обонятельных луковицах, молекулярном слое коры больших полушарий (L1), пириформной (грушевидной) коре, верхних холмиках четверохолмия, межножковом ядре и ядре спинномозгового пути тройничного нерва. Самые высокие уровни экспрессии GAT3 наблюдаются в обонятельных луковицах, таламусе, гипоталамусе, варолиевом

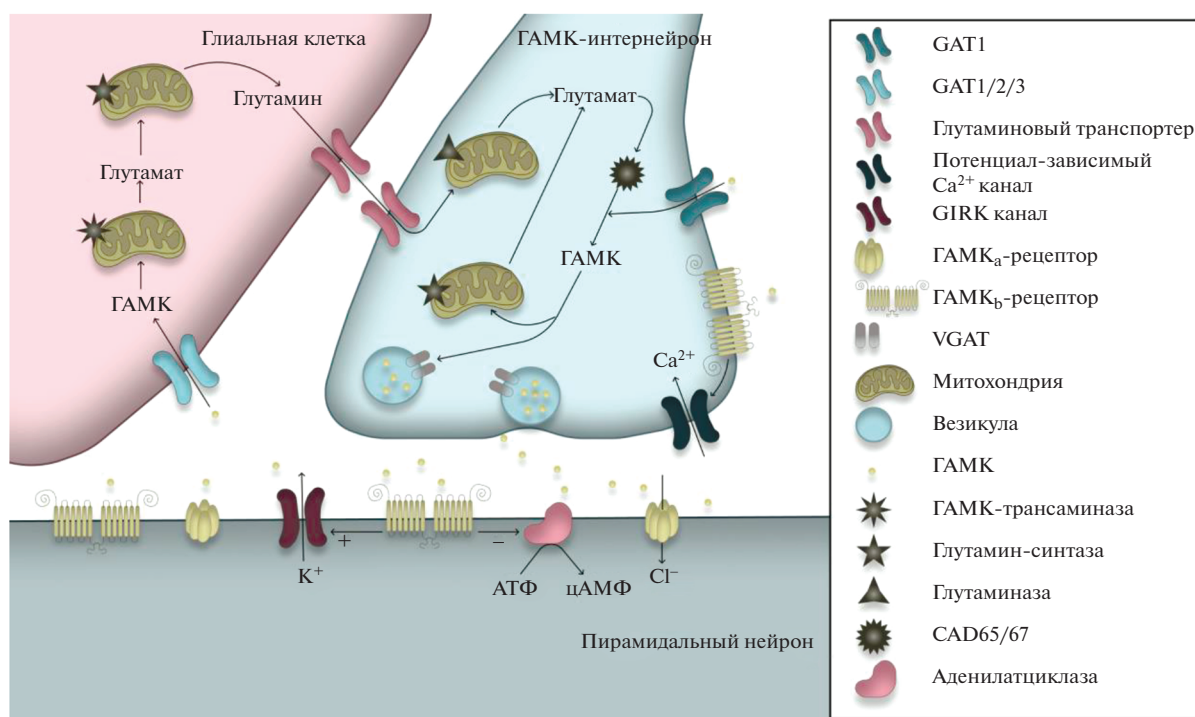


Рис. 2. Метаболизм ГАМК. ГАМКергические нейроны осуществляют высвобождение ГАМК, которая воздействует на постсинаптические рецепторы ГАМК_A и ГАМК_B. Избыток нейромедиатора транспортируется в клетки глии преимущественно обратным транспортером GAT2 и в пресинаптическую терминаль преимущественно транспортером GAT1. Метаболизм ГАМК происходит внутриклеточно с участием митохондрий. В клетках глии ГАМК превращается в глутамат, затем в глутамин, который далее переносится глутаматными транспортерами в ГАМКергический синапс. Там глутамин претерпевает обратное превращение через глутамат в ГАМК и упаковывается в везикулы. При возбуждении ГАМКергического нейрона вновь происходит релиз ГАМК. Таким образом, цикл замыкается. Внеклеточные ГАМК-рецепторы активируются ГАМК, постоянно присутствующей в межклеточном пространстве в малых концентрациях.

мосту и продолговатом мозге, бледном шаре, базальных ганглиях, черной субстанции, ядрах мозжечка и ядре спинномозгового пути тройничного нерва [61]. Уровень экспрессии GAT1-3 в коре больших полушарий меняется в зависимости от слоев. GAT1 экспрессируется в основном в L2–L4 слоях (наружном зернистом, наружном пирамидном и внутреннем зернистом), GAT2 обнаруживается преимущественно в молекулярном слое, а GAT3 — в L3 слое (наружном пирамидном) и верхней части L5 слоя (внутреннего пирамидного) [61, 62].

Если сравнивать экспрессию ГАМК-транспортеров в ЦНС на клеточном и субклеточном уровнях, то экспрессия GAT1 наиболее выражена в пресинаптических мембранах ГАМКергических нейронов и менее выражена в глиальных клетках [62]. Степень экспрессии GAT3 в ЦНС в целом ниже, чем GAT1, и наблюдается преимущественно в клетках глии [28]. Экспрессия GAT2 в ЦНС также ниже по сравнению с GAT1, и он, как и GAT1, по большей части экспрессируется за пределами ЦНС: в печени и почках [45, 63]. Та-

ким образом, GAT1 является главным транспортером ГАМК в ЦНС.

Структура белка GAT1. ГАМК-переносчики семейства SLC6 имеют общую структуру, представляющую собой 12 трансмембранных доменов (рис. 4). Каждый транспортер имеет различное сродство к ГАМК, различную локализацию в тканях и различную субструктурную специфичность [45]. Белок GAT1, молекулярная масса которого составляет 67074 Да, состоит из 599 аминокислот [64]. Среди всех ГАМК-транспортеров, экспрессия GAT1 в ЦНС выражена наиболее сильно [45]. Перечисленные особенности GAT1 сделали его мишенью для разработки селективных противоэpileптических лекарственных средств [65].

Для понимания процессов, происходящих при нарушении обратного захвата ГАМК, рассмотрим типы ГАМКергических нейронов, строение ГАМК-рецепторов и формы торможения в центральной нервной системе.

ГАМКергические интернейроны (типы, локализация, участие в поддержании баланса между возбуждением и торможением). Гамма-аминомасляная

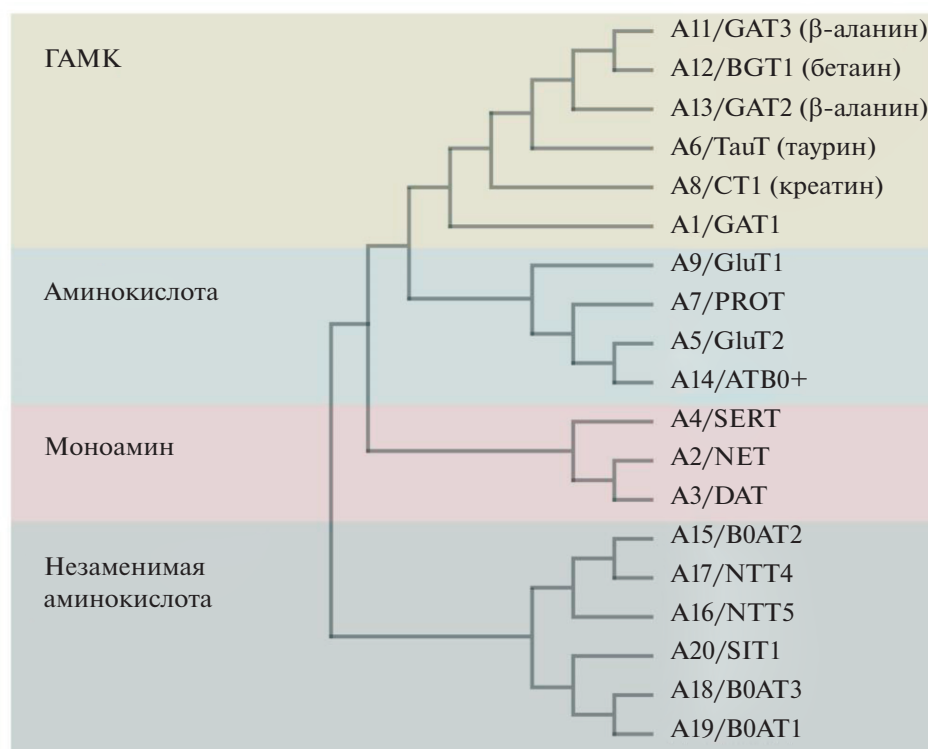


Рис. 3. Молекулярно-филогенетический анализ семейства обратных транспортеров SLC6. Семейство SLC6 делится на четыре группы: переносчики ГАМК (зеленый), аминокислот (голубой), моноаминов (розовый) и незаменимых аминокислот (серый). В скобках указаны вещества, которые также могут транспортироваться переносчиками ГАМК.

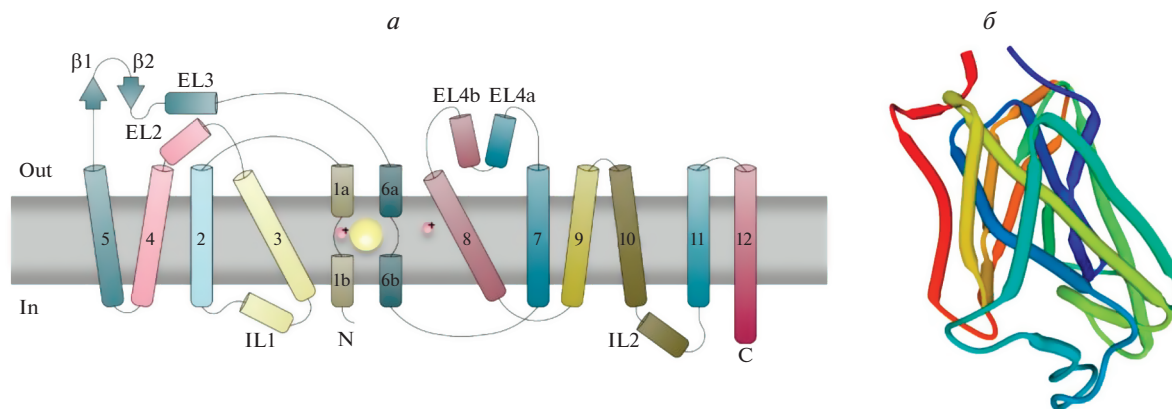


Рис. 4. Строение белка GAT1. (а) Схематичное строение белка GAT1 *Aquifex aeolicus* LeuTaa. Транспортер состоит из 12 трансмембранных доменов. N- и C-концевые участки белка располагаются в цитоплазме. В структуре GAT1 имеются две внеклеточные β-цепи (серо-зеленые стрелки), четыре внеклеточные (EL2, EL3, EL4a, EL4b) и две внутриклеточные спирали (IL1, IL2). Ионы Na⁺ изображены в виде двух розовых сфер. Молекула субстрата (Leu) изображена в виде большой желтой сферы. Модифицировано из [59]. (б) Модель 3D-структуры белка GAT1 на основе транспортера 4хр9.1.А. Рентгеновская структура дофаминового транспортера дрозофилы [66].

кислота (ГАМК) осуществляет функцию главного тормозного нейромедиатора в центральной нервной системе. В префронтальной коре ГАМКергические интернейроны оказывают тормозные влияния на пирамидные нейроны контролируя таким образом входящее возбуждение от афферентных

структур и генерацию потенциалов действия [41, 67]. ГАМКергические интернейроны можно классифицировать по их морфологии, электрофизиологическим свойствам или гистологическим маркерам [68, 69]. Согласно наиболее распространенной классификации выделяют сле-

дующие типы интернейронов по экспрессии характерных маркеров: парвальбуминовые (экспрессирующие Ca^{2+} -связывающий белок парвальбумин, PV) и интернейроны, экспрессирующие ионотропный серотониновый рецептор 5HT_{3a} (5HT_{3aR}) [70]. PV интернейроны (наиболее распространенный тип ГАМКергических интернейронов) могут, в свою очередь, быть разделены на два подтипа: корзинчатые клетки (иннервируют сомu и проксимальные дендриты) и клетки-канделябры (образуют синаптические контакты с начальным сегментом аксона) [71, 72].

В ряде работ было показано, что корзинчатые интернейроны участвуют в генерации гамма-колебаний (30–80 Гц), связанных с когнитивными функциями и обработкой информации у разных видов [73–75]. Наличие значительных изменений в гамма-колебаниях было обнаружено при заболеваниях, связанных с когнитивными нарушениями, таких как шизофрения и расстройства аутистического спектра (РАС) [76, 77]. Для того чтобы данные процессы протекали эффективно, уровни торможения и возбуждения должны поддерживаться в определенном соотношении, которое для префронтальной коры составляет примерно 20/80% (возбуждение/торможение) [78, 79]. Баланс между процессами возбуждения и торможения начинает формироваться на начальных этапах развития нервной системы и продолжает активно поддерживаться гомеостатическими механизмами на протяжении всей жизни [80, 81]. Накопленные данные свидетельствуют о том, что дисбаланс возбуждения и торможения вносит вклад в этиологию и симптоматику целого ряда заболеваний, связанных с нейрональным развитием, включая шизофрению, расстройства аутистического спектра (РАС) и эпилепсию [82].

У больных шизофренией нарушения рабочей памяти связаны с дисфункцией дорсолатеральной префронтальной коры [83]. Для шизофрении характерен дефицит декарбоксилазы глутаминовой кислоты (GAD67), фермента, синтезирующего ГАМК [84–86]. Хотя у пациентов большинство ГАМК-интернейронов префронтальной коры экспрессируют нормальный уровень мРНК GAD67, приблизительно 25–35% ГАМК-интернейронов (преимущественно PV-нейроны [87]) не имеют обнаруживаемого уровня этого транскрипта. Однако нарушения только в PV-нейронах не могут полностью объяснить дефицит экспрессии мРНК GAD67 поскольку такие изменения также наблюдались в I, II и V слоях коры, где количество PV-нейронов невелико [88, 89]. Таким образом, эта дисфункция, по крайней мере частично, связана с нарушениями процессов фазового (синаптического) и тонического (внесинаптического) торможения входных сигналов пирамидальных клеток SST-содержащими и CCK-содержащими типами ГАМК-интернейронов [83].

ГАМК-рецепторы. До настоящего времени было описано три типа ГАМК-рецепторов, два из которых, ГАМК_A и ГАМК_C, являются лиганд-зависимыми ионными каналами, а ГАМК_B – метаботропным рецептором, связанным с G-белком [90].

Ионотропные рецепторы состоят из 5 субъединиц. В структуру ГАМК_C-рецепторов входят $\rho 1$ –3 субъединицы [91]. Данный тип рецепторов первоначально относили к подтипу ГАМК_A. Их функции связаны со зрительной обработкой информации, регуляцией ритмов сна–бодрствования, восприятием боли, памятью, обучением, гормональной регуляцией и желудочно-кишечной секрецией. Эти рецепторы локализованы в сетчатке, таламусе, гиппокампе, гипофизе и желудочно-кишечном тракте [92]. ГАМК_A-рецепторы представляют больший интерес в контексте развития психических и неврологических заболеваний. Они образуют множество изоформ из различной комбинации 16-ти типов субъединиц ($\alpha 1$ –6, $\beta 1$ –3, $\gamma 1$ –3, δ , ϵ , π , и θ) [93, 94]. От субъединичного состава зависят различные свойства ГАМК_A-рецепторов: кинетика активации (влияет на их десенситизацию [95]), локализация (рецепторы ГАМК, содержащие субъединицы $\alpha 1$ и $\gamma 2$, сосредоточены в постсинаптических участках, где они опосредуют фазное торможение [96, 97]), в то время как ГАМК-рецепторы, содержащие субъединицы $\alpha 4$ и δ , в переднем мозге избирательно локализованы в внесинаптических участках [96–98]. Внесинаптические рецепторы обладают высокой чувствительностью к ГАМК и опосредуют тоническое торможение [83]). Активация пресинаптических ГАМК_A-рецепторов подавляет высвобождение нейромедиатора путем ингибирования потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов. В свою очередь, постсинаптические ГАМК_A-рецепторы отвечают за генерацию тормозного постсинаптического потенциала (ТПСП) и развитие быстрой гиперполяризации постсинаптической мембраны [99]. Однако, было показано, что длительная активация постсинаптических ГАМК_A-рецепторов способна приводить к развитию длительного деполяризационного постсинаптического потенциала [100]. Субъединичный состав ГАМК_A-рецепторов может иметь значение в патогенезе заболеваний, например, композиция субъединиц ГАМК_A-рецепторов в нейронах может меняться во время эпилептогенеза; эти изменения отражаются в фармакодинамике лекарственных препаратов [101, 102].

Метаботропные ГАМК_B-рецепторы состоят из двух субъединиц (GBR1 и GBR2) [103] и могут располагаться как на пре-, так и на постсинаптической мембране [104, 105]. При взаимодействии ГАМК_B-рецептора с лигандом (ГАМК) запускается каскад реакций, приводящий к открытию

связанных с G-белком калиевых каналов и, как следствие, развитию медленного ТПСР, длящегося сотни миллисекунд [106–108]. В результате развивается длительная гиперполяризация, наступающая после быстрой гиперполяризации, вызванной активацией ионотропных рецепторов [99]. Внесинаптические ГАМК_B-рецепторы способны активироваться постоянно присутствующими в межклеточном пространстве малыми концентрациями ГАМК, а также ГАМК, вышедшей за пределы синаптической щели в результате перелива ГАМК [106]. В результате активации пресинаптических ГАМК_B-рецепторов снижается ГАМК-нейротрансмиссия тормозных интернейронов [105].

Разнообразие форм ГАМКергического торможения. Выделяют разные формы ГАМКергического торможения. В зависимости от того, какой тип нейрона подвергается торможению, различают торможение ГАМКергических интернейронов (приводит к увеличению возбуждения) и торможение возбуждающих нейронов (приводит к снижению возбуждения) [109]. По локализации тормозных синаптических окончаний: торможение, развивающееся в аксо-дендритных синапсах (контроль входных токов, распространяющихся от дендритов к соме), торможение в аксо-соматических контактах и торможение начального сегмента аксона (контроль выходных токов - генерации потенциалов действия) [110]. В контексте патологий, связанных с нарушением обратного захвата ГАМК, подробнее остановимся на классификации торможения по типу синаптической передачи. Фазное торможение опосредуется воздействием высокой концентрации ГАМК на постсинаптические ГАМК-рецепторы в результате дискретного выброса нейромедиатора из пресинаптического окончания. Однако в межклеточном пространстве постоянно присутствует небольшое количество ГАМК, которое поступает туда в результате выхода нейротрансмиттера за пределы синаптической щели, а также в результате обратного функционирования ГАМК-транспортеров [111–113]. Малые концентрации ГАМК воздействуют на внесинаптические ГАМК-рецепторы, активация которых вызывает тоническое торможение [114, 115]. Данный вид торможения поддерживает определенное значение потенциала мембраны и модулирует возбудимость клеток путем снижения порога генерации потенциалов действия [114]. В ряде работ было показано, что длительная стимуляция внесинаптических ГАМК-рецепторов способна приводить к изменению их работы и развитию деполяризации в результате их активации (а не гиперполяризации) [116–118], что теоретически может происходить при нарушении обратного захвата ГАМК.

У мышей с дефицитом GAT1 усиливается тоническое торможение и удлиняется время затухания фазного торможения, опосредованного постсинаптическими ГАМК-рецепторами, тогда как частота, амплитуда и кинетика ГАМК-индуцированных постсинаптических токов не изменяются [55, 119]. Однако в других работах на GAT1-дефицитных мышцах показано снижение частоты ТПСР, что может быть связано с увеличением экспрессии ферментов (GAD65/67), участвующих в синтезе ГАМК в пресинаптических терминалах тормозных нейронов [120, 121].

В совокупности эти результаты свидетельствуют о многочисленных молекулярных и клеточных функциях GAT1. Нарушение работы ГАМК-транспортера обуславливает сложный патогенез заболеваний у пациентов с мутациями в гене *SLC6A1*.

ГАМК и нейрогенез. Дифференцировка, миграция и интеграция нейронов регулируются рядом молекулярных процессов.

ГАМК является нейротрофическим фактором [122]. В эмбриональном периоде ГАМК является возбуждающим нейромедиатором [123, 124]. Тоническое возбуждение, опосредованное активацией ГАМК-рецепторов, стимулирует и направляет миграцию проекционных нейронов [122]. Стимуляция ГАМК_B и ГАМК_C-рецепторов способствует миграции нейронов через кортикальную пластинку [125], тогда как активация ГАМК_A-рецепторов данный процесс прекращает [126].

Нарушение ГАМК-сигналикации на ранних стадиях развития изменяет клеточную миграцию и архитектуру коры [127–132].

Кроме того, ГАМК участвует в нейрогенезе и во взрослом возрасте. Хотя остальные нейромедиаторы также регулируют различные процессы созревания нейронов из нейрональных стволовых клеток, среди них ГАМК является наиболее важным. Так, развитие и функции клеток-зерен во взрослом мозге контролируются ГАМКергической системой [133].

Нейротрофический фактор мозга (BDNF) и другие нейротрофины способствуют миграции клеток, синаптогенезу, росту дендритов и поддержанию функционирования синапсов на протяжении всей жизни [125, 134–136]. Изменение уровня BDNF в развивающемся мозге может нарушить миграцию ГАМКергических интернейронов [137–139]. Кроме того функции BDNF остаются критическими и на более поздних этапах развития мозга (в подростковом возрасте), когда синаптические контакты укрепляются или подвергаются прунингу [140, 141]. В данный период предрасположенность к развитию психических заболеваний является наиболее высокой [142].

Фактор роста BDNF, рецепторы к которому присутствуют в различных типах ГАМК-интер-

нейронов, синтезируется и секретируется пирамидальными нейронами [143]. ГАМК регулирует активность BDNF путем переключения активации на ингибирование гена BDNF во время изменения ГАМК-сигналикации с возбуждающей на тормозную [144]. В процессе развития ГАМК-индуцированная мембранная деполяризация приводит к открытию кальциевых каналов L-типа и высвобождению BDNF, что, в свою очередь, способствует дифференцировке нейронов [145]. Увеличение экспрессии хлорид-калиевого котранспортера 2-го типа (KCC2) примерно во время рождения изменяет градиент ионов хлора, и результат активации ГАМК рецепторов с деполяризующего на гиперполяризующий [146, 147]. По мере развития гиперполяризации [148] кальциевые каналы L-типа перестают активироваться и индуцировать синтез и высвобождение BDNF [144].

Таким образом, BDNF и ГАМК тесно взаимодействуют, и нарушения обратного захвата ГАМК могут привести к снижению нейротрофических процессов как на начальных этапах развития, так и в зрелом мозге и, следовательно, к развитию ряда неврологических заболеваний.

ГЕНЕТИКА *SLC6A1* И ПСИХОНЕВРОЛОГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Мутации в белок-кодирующих генах являются существенным генетическим фактором риска развития психических и психоневрологических заболеваний. Рассмотрим некоторые фенотипические проявления мутаций в гене *SLC6A1*.

Эпилепсия. Эпилепсия — хроническое неврологическое заболевание, характеризующееся наличием судорожных приступов [149]. Мутации в гене *SLC6A1* изначально были найдены у пациентов с миоклоническими-атоническими судорогами [10]. Однако спектр фенотипических проявлений мутаций в этом гене оказался шире. В работе Johannesen et al. были проанализированы 34 случая (24 пробанда, 6 членов их семей и клинические данные от 4 ранее описанных испытуемых) с мутациями в гене *SLC6A1* [8]. В 31 из 34 случаев у испытуемых диагностирована эпилепсия, представленная в следующих формах: абсансы, атипичные абсансы, атонические судороги и миоклонические или миоклонические-атонические судороги, реже (5/31) — генерализованные тонико-клонические судороги. Важно отметить, что общим для всех пациентов стало наличие в разной степени выраженной умственной отсталости (от легкой до средней) с нарушением речевой функции. Притом, у 3 из 34 испытуемых, даже в отсутствие эпилепсии, наблюдалась умственная отсталость в легкой форме. Также, у половины пациентов имелись поведенческие расстройства (гиперак-

тивность, агрессивное поведение, синдром дефицита внимания и аутизм в различных комбинациях). Подобные проявления наблюдались ранее на животных моделях: у мышей с мутациями в *slc6a1* [150].

Как обсуждалось ранее, дисфункция GAT1 может влиять на динамику процессов возбуждения и торможения через множество механизмов. Нарушения процессов обратного захвата, приводят к повышению концентрации ГАМК как в синаптической щели, так и вне синапса [119]. Это может привести к гиперстимуляции внесинаптических ГАМК_A и ГАМК_B-рецепторов, которые отвечают за развитие тонического торможения [151]. В работе Соре и др. было показано усиление ГАМК_A-опосредованного тонического торможения в таламо-кортикальных нейронах у мышей с нокаутом GAT1, приводящее к гиперполяризации таламо-кортикальных нейронов и нарушению генерации потенциалов действия [151]. Кроме того, длительная активация ГАМК_B-рецепторов, индуцирующая открытие потенциал-зависимых Ca²⁺ каналов T-типа, способна вызвать циркулирующее возбуждение в таламо-кортикальной системе через генерацию последовательных потенциалов действия [152, 153]. Предыдущие исследования показали, что активация ГАМК_B-рецепторов вызывает судороги у мышей и крыс и что предварительное введение антагониста ГАМК_B-рецепторов может уменьшить их продолжительность или привести к их отсутствию [154, 155]. Снижение функции GAT1 может также привести к снижению концентрации ГАМК в синаптических терминалах, и, следовательно, к нарушению высвобождения ГАМК и нарушению фазного торможения. Кроме того, фазное торможение, опосредованное ГАМК_A-рецепторами, может быть нарушено вследствие изменения их субъединичного состава [156]. Результаты *in vivo* исследований на нокаутированных по GAT1 мышах показали значительное увеличение тонического торможения в гиппокампе, при неизменной или сниженной амплитуде ТПСР на постсинаптических мембранах [119, 157]. Таким образом, снижение функции GAT1 может привести к развитию эпилепсии как через чрезмерную активацию внесинаптических ГАМК_A- и ГАМК_B-рецепторов, так и через снижение синаптической ГАМК_A-опосредованной сигнализации [158].

GAT1 является одной из основных мишеней для лечения эпилепсии [26]. Например, препарат тиагабин (селективный ингибитор GAT1) широко используется при фокальной эпилепсии [26]. Встает закономерный вопрос: если мутации в гене *SLC6A1* и нарушение функционирования белка GAT1 могут являться одной из причин эпилепсии, почему для лечения эпилепсии используют ингибиторы GAT1? Объяснение этому может быть в том, что мутации в GAT1, которые приво-

дят к эпилепсии, не обязательно проявляются в снижении его концентрации, а также тем, что на GAT1 нокаутных моделях нет части проявлений эпилепсии (например, нет судорог).

Таким образом, крайне важно выяснить, как мутации в гене *SLC6A1* влияют на ГАМКергическую сигнализацию и развитие мозга, а также последствия терапии ингибиторами GAT1.

Расстройства аутистического спектра. Аутизм или, шире, расстройства аутистического спектра (РАС) — генетически обусловленные заболевания, характеризующиеся нарушением нервно-психического развития, манифестирующие, как правило, в детском возрасте. Генетическая архитектура РАС включает редкие вариации в сотнях генов (возникшие *de novo* или унаследованные от родителей) и полиморфизмы в тысячах локусов. Генетические исследования как редкой, так и распространенной изменчивости, связанной с РАС, показывают, что в основном мутации, вовлеченные в развитие аутизма, влияют на начальные этапы развития мозга, в том числе на процессы дифференцировки клеток коры больших полушарий [159–161]. Нарушения в работе ГАМКергической системы связаны с РАС, что хорошо видно в физиологических исследованиях и в исследованиях на животных моделях аутизма [162]. Часто гены, мутации в которых связаны с развитием РАС и эпилепсии, играют роль в функционировании ГАМКергической системы [163, 164]. Важно отметить, что РАС и эпилепсия нередко сопутствуют друг другу, что свидетельствует об общности патогенеза данных заболеваний [165]. Имеется ряд исследований, в которых изучались мутации в гене *SLC6A1* в контексте развития аутизма [8, 9, 166–168]. Дисбаланс процессов возбуждения и торможения, одной из причин которого является нарушение функции переносчика GAT1, также является одной из гипотез развития РАС [169]; [15, 82]. Кроме того, ГАМК является нейротрофическим фактором и играет важную роль в пролиферации нейронных стволовых клеток на ранних этапах развития мозга [6, 7]. Нарушение этого процесса может являться одной из причин развития РАС.

Умственная отсталость. Умственная отсталость (УО) — заболевание, характеризующееся задержкой умственного развития, при котором наблюдается нарушение познавательных способностей, речи и моторики, что приводит к потере социальной дееспособности [170]. У большинства пациентов с мутациями в гене *SLC6A1* наблюдается развитие умственной отсталости, которая может развиваться как сама по себе, так и на фоне другого психического или физического нарушения [8]. В более ранних работах упоминалось о том, что одним из самых характерных проявлений мутации в *SLC6A1* является предшествующая эпилеп-

сии умственная отсталость в легкой или умеренной форме, как правило с нарушениями речи [10]. В исследовании Gong и др. проводились поведенческие тесты на нокаутированных по гену *SLC6A1* мышах [5]. В результате была обнаружена взаимосвязь между изменением ГАМКергической регуляции в гиппокампе и нарушениями процессов обучения, запоминания и синаптической пластичности. Кроме того, поскольку ГАМК играет ключевую роль в процессах эмбрионального развития нервной ткани [7], нарушение этого процесса из-за дисфункции белка GAT1 также может являться одной из причин умственной отсталости.

Шизофрения. Шизофрения — это полигенное полиморфное психическое расстройство, характеризующееся утратой целостности психических процессов [171]. Под диагнозом “шизофрения” объединен ряд отдельных синдромов, отличающихся генетическим бэкграундом и выраженностью позитивных, негативных и когнитивных симптомов [169, 171]. На данный момент наиболее успешным подходом к лечению шизофрении является медикаментозная терапия антипсихотиками, которая не всегда дает желаемый эффект в связи с клинической гетерогенностью заболевания. Когнитивные симптомы (снижение концентрации, ухудшение кратковременной памяти, нарушение ассоциативных связей, отсутствие цельного и последовательного мышления) плохо поддаются лечению антипсихотическими препаратами [172–174]. Они возникают при всех формах шизофрении и обнаруживаются до появления позитивных (галлюцинации, бред, неорганизованная речь и поведение) и негативных (эмоциональное обеднение, социальная аутизация, угасание желаний, ангедония, скудность речи) симптомов [175].

Вероятно, клиническая гетерогенность данного заболевания обусловлена генетической гетерогенностью. Генетическая архитектура шизофрении чрезвычайно сложна [176, 177]. Большую роль в развитии данного заболевания играет наследственная предрасположенность. Она может быть обусловлена определенным набором однонуклеотидных полиморфизмов (single-nucleotide polymorphism, SNP), обнаруживаемых методом полногеномного анализа ассоциаций (Genome-Wide Association Studies, GWAS) и отражающим уровень полигенного риска (polygenic risk score, PRS) развития заболевания [98, 178–185]. Наследственная предрасположенность может также быть обусловлена наличием редких мутаций, унаследованных от родителей и выявляемых различными методами секвенирования [16, 186–188]. Особый интерес представляют мутации *de novo*, поскольку их наличие в генах, ассоциированных с развитием шизофрении, может быть обнаружено у пациентов с низкой наследственной предрасположенностью, вычисляемой по показателям полигенного риска [16, 189]. В недавнем исследовании

Rees и др. были проанализированы данные экзомного секвенирования для поиска мутаций *de novo* в 613 тройках (больные шизофренией пациенты и их родители) и объединены с уже опубликованными данными (в общей сложности 3444 тройки). Это исследование дает дополнительные доказательства того, что определенные классы мутаций *de novo* (в том числе в гене *SLC6A1*) могут быть причиной повышенного риска развития шизофрении. В результате объединения данных экзомного секвенирования и GWAS было показано, что носители мутаций *de novo*, ассоциированных с развитием шизофрении, имеют меньший полигенный риск развития заболевания, чем пациенты, не являющиеся носителями. Эти статистически независимые результаты доказывают возможность развития заболевания при отсутствии наследственной предрасположенности [16]. Кроме того, связь *de novo* мутаций в гене *SLC6A1* с развитием шизофрении была независимо обнаружена в исследовании Schizophrenia exome meta-analysis consortium (SCHEMA) [190].

Как обсуждалось ранее, мутации в гене *SLC6A1* способны приводить к дисфункции белка GAT1 и, следовательно, к нарушению регуляции количества ГАМК в синаптической щели [8]. Избыток медиатора, воздействующего на ГАМК_A-рецепторы, может привести к гиперполяризации мембраны постсинаптического нейрона и его рефрактерности [157]. В свою очередь активация избытком ГАМК ГАМК_B-рецепторов опосредуется открытием медленных вольтаж-зависимых кальциевых каналов Т-типа, и, соответственно, циклическими возбуждениями в таламо-кортикальной системе [191]. Таламо-кортикальная система участвует в регуляции когнитивных процессов и кратковременной памяти [192]. Кроме того, поскольку префронтальная кора посылает прямые и косвенные возбуждающие проекции на дофаминергические нейроны среднего мозга, нарушение ГАМКергической регуляции в префронтальной коре может привести к гипердофаминергии и, в свою очередь, к развитию психоза [174].

В работе [175] был проведен систематический анализ экспрессии связанных с ГАМК транскриптомов префронтальной коры больных шизофренией и контрольной группы. У субъектов с шизофренией наблюдался дефицит экспрессии GAT1 в PV нейронах, иннервирующих начальные сегменты аксонов пирамидальных нейронов. Наряду с этим, на постсинаптических мембранах начальных сегментов аксонов пирамидальных клеток в ГАМК_A-рецепторах было зафиксировано увеличение количества субъединицы $\alpha 2$, в то время как увеличения количества самих рецепторов выявлено не было. Данные результаты свидетельствуют об изменении субъединичного состава

ГАМК_A-рецепторов при увеличении количества нейромедиатора в синаптической щели. В норме субъединица $\alpha 2$ входит только в состав ГАМК_A-рецепторов, располагающихся в сомато-дендритных синаптических контактах [193]. ГАМК-опосредованная регуляция дендритной области пирамидальных нейронов важна для фильтрации входных возбуждающих токов из различных областей коры и подкорки, в то время как ГАМК-регуляция в перисоматической области (начальный сегмент аксона и тело клетки) критически важна для контроля генерации потенциалов действия во времени и синхронизации пирамидальных нейронов [68, 194]. Изменение субъединичного состава может быть причиной нарушений фильтрации выходных сигналов [156]. Также в данном исследовании были обнаружены изменения в ГАМК-нейротрансмиссии, опосредованной нарушениями в работе SST-содержащих и CCK-содержащих корзинчатых ГАМК-интернейронов, которые образуют синаптические окончания преимущественно с дистальными дендритами и телами пирамидальных нейронов соответственно. В данных областях также было выявлено изменение субъединичного состава ГАМК_A-рецепторов (снижение количества субъединиц $\alpha 1$ и $\gamma 2$, присутствующих в постсинаптических рецепторах, опосредующих фазное торможение, и субъединиц $\alpha 4$ и δ , присутствующие во внесинаптических рецепторах, опосредующих тоническое торможение), и как следствие, изменение фазного и тонического торможения в дендритах пирамидальных нейронов.

Таким образом, в данной работе у пациентов с шизофренией были обнаружены изменения ГАМК-регуляции как входных, так и выходных участков пирамидальных нейронов префронтальной коры, что подтверждает результаты *in vivo* исследований, показавших, что в развитие когнитивной симптоматики при шизофрении вовлечены нарушения ГАМКергической сигнализации в ПФК [195] и дисбаланс процессов возбуждения и торможения [196]. Данные изменения влияют на обработку информации в префронтальной коре и, таким образом, вносят вклад в нарушение когнитивных функций у больных шизофренией [169].

В работе [157] у мышей с нокаутом GAT1 наблюдались многочисленные аномалии поведения, связанные с позитивными, негативными и когнитивными симптомами. Дефицит GAT1 не изменял уровень дофамина в стриатуме, но значительно усиливал тоническое торможение в префронтальной коре.

У пациентов с шизофренией наблюдаются значительные изменения в гамма-колебаниях, связанных с когнитивными функциями и обработкой информации, что коррелирует с уровнем

функциональных нарушений в рабочей памяти [197].

Поскольку на ранних этапах развития мозга ГАМК является возбуждающим нейромедиатором и наряду с BDNF участвует в процессах нейрогенеза [122], дисфункция GAT1 и нарушение регуляции внесинаптической концентрации ГАМК также могут быть причинами когнитивных нарушений при шизофрении.

Таким образом, нарушение обратного захвата ГАМК способно приводить к различным нарушениям (изменения субъединичного состава ГАМК_A-рецепторов, нарушения процессов фазового и тонического торможения, нейрогенеза), которые в совокупности способны приводить к развитию таких заболеваний, как эпилепсия, РАС, УО и шизофрения.

Перспективы лечения психоневрологических заболеваний, связанных с мутациями *SLC6A1*, при помощи систем редактирования генома. Поскольку мы предполагаем что мутации *de novo* в гене *SLC6A1* напрямую связаны с целым спектром психоневрологических нарушений, встает вопрос — может ли человечество на данной стадии своего развития предложить методы коррекции данных патологий, причем желательно устраняя источник проблемы, а не применяя симптоматическое лечение?

Одним из подходов является генная терапия при помощи доставки в нейроны головного мозга целой “правильной” копии гена *SLC6A1*, что позволило бы вернуть утраченные функции белка-транспортера GAT1. В настоящий момент широкое распространение получил ряд технологий по доставке генов в целевые клетки при помощи в т.ч. AAV-векторов на основе адено-ассоциированных вирусов [198]. С применением данного метода был разработан ряд лекарственных средств для лечения спинально-мышечной атрофии [199], мукополисахаридоза [200], болезни Паркинсона [201] и т.д. AAV-векторы зарекомендовали себя как эффективное средство доставки, при этом достаточно безопасное в плане иммуногенности и онкогенности [202]. Значимым преимуществом AAV-векторов является то, что ДНК вектора не встраивается в геном клетки и персистирует в виде эписом, что позволяет обойти риск инсерционного мутагенеза, как, например, при использовании векторов на основе лент- и ретро-вирусов. Однако есть вероятность, что данный подход будет неэффективен в терапии заболеваний связанных с мутациями в *SLC6A1*. Во-первых, большинство описанных мутаций в *SLC6A1* существуют в гетерозиготном варианте [9]. То есть, в генотипе носителей изначально имеется немутантная аллель гена, что может обуславливать отсутствие недостатка в его экспрессии. Но несмотря на это, у больных все равно наблюдается развитие характерной симптоматики.

Во-вторых, большинство описанных высокопентрантных мутаций в *SLC6A1* не являются нокаутными, поэтому не ясно, по какому механизму мутантный белок GAT1 нарушает работу нервной системы, и соответственно нет понимания, чем может помочь доставка здоровой копии гена в данных случаях.

Второй подход основан на использовании современных методов редактирования генома, в т.ч. методов на основе системы CRISPR/Cas9. За последние 8 лет с момента первых публикаций применения на клетках млекопитающих данная система активно развивалась получила широкое распространение [203] и международное признание в виде Нобелевской премии по химии в 2020 году. В настоящий момент несколько десятков генотерапевтических препаратов на основе CRISPR/Cas9 системы проходят клинические испытания [204]. Теоретически, с помощью данного метода можно вернуть последовательность дефектного гена *SLC6A1* к природному дикому типу, что с большой вероятностью должно нормализовать работу нервной системы. Само доказательство принципа работы системы CRISPR/Cas9 в нейронах головного мозга было подтверждено несколькими исследованиями [205, 206]. Однако существует несколько проблем, которые ставят под сомнение использование CRISPR/Cas9, равно как и более ранних систем, таких как ZFN или TALEN. Во-первых, низкая эффективность точечного направленного редактирования последовательности ДНК в клетках. Основное действие белка Cas9 — это двухцепочечный разрыв ДНК в необходимом месте гена. Данная система может быть эффективно использована для нокаута генов в клетках, поскольку после подобного разрыва системы репарации ДНК типа NHEJ (non-homology-end-repair) в клетках часто ошибаются и вносят короткие делеции или инсерции, приводящие к сдвигу рамки считывания кодирующей последовательности белка (если геновая РНК системы CRISPR/Cas9 написана на белок-кодирующую часть гена) [207]. Но для направленного изменения последовательности мутантного гена *SLC6A1* необходима система репарации по типу HDR (homology-direct-repair) и одновременно доставка в клетки ДНК-донора — одноцепочечной или двухцепочечной последовательности ДНК, которая послужит матрицей для синтеза “правильной” последовательности гена. Однако в клетках млекопитающих данные системы репарации конкурируют, и эффективность HDR значительно проигрывает по эффективности NHEJ, составляя порядка нескольких единиц процентов [208]. На данный момент актуальной является разработка новых подходов по исправлению точечных мутаций без HDR-рекомбинаций, таких как Prime Editing [209]. Данная система предполагает использование химерной геновой РНК (pegRNA), содержащей на

3' конце последовательность для “правильной” записи редактируемого участка, и химерного мутантного белка (PE) – nCas9 (никаза, удален один каталитический центр расщепления ДНК) с вирусной обратной транскриптазой, которая синтезирует новую “правильную” цепь ДНК прямо на месте, используя предлагаемую РНК-матрицу. Эффективность данного комплекса может достигать 30–70% в зависимости от редактируемого участка генома. Однако для использования данной системы возникают сложности с ее доставкой, поскольку в клетки необходимо одновременно доставлять как минимум два компонента (pegRNA и PE). Доставка большого количества копий либо плазмидной ДНК либо вирусных векторов в головной мозг по-прежнему является нетривиальной задачей, требующей тонких стереотаксических инъекций, для равномерного распределения частиц по достаточно большому объему. После физической доставки векторов кодирующих элементы системы в мозг, необходимо также обеспечить эффективное прохождение векторов через клеточную мембрану, что также является значимым барьером. Так, например, эффективность трансфекции в идеальных условиях чашки Петри, плазмидными векторами с элементами системы CRISPR/Cas9, составляет обычно 10–15% (неопубликованные данные авторов обзора), то есть подавляющее большинство клеток не принимает плазмиды. Проблемой служит размер генетических кассет, поскольку один только ген Cas9 занимает порядка 4,2 т.п.н., а вместе с сопутствующими элементами (ревертаза, промотор, WPRE-сигнал), размеры кассеты Prime Editor – целых 7,2 т.п.н. К сожалению этот факт также служит барьером для доставки Prime Editor в клетки при помощи AAV-векторов, максимальный размер кассет для которых составляет порядка 4.2–4.5 т.п.н [210]. Ну и конечно, традиционной проблемой всех методов с использованием систем редактирования генома является их нецелевая активность (т.н. “off-target” эффекты). Разные исследователи по-разному оценивают опасность применения CRISPR/Cas9 систем в плане внесения нежелательных мутаций [211], однако случаи нахождения подобных off-target мутаций являются научным фактом, и с этим неизбежно придется столкнуться при доказательстве безопасности разрабатываемого метода лечения при помощи геномного редактирования.

Таким образом, можно констатировать то, что на пути разработки методов лечения мутаций *SLC6A1* при помощи методов редактирования генома в настоящий момент находится множество препятствий, что не позволяет нам надеяться на легкое решение данной проблемы в обозримом будущем. Однако стоит заметить, что вышеуказанные проблемы носят в основном технологический характер, и вполне возможно, что открытие

новых эффективных способов доставки и новых эффективных и малоразмерных геномных редакторов помогут сдвинуть процесс с мертвой точки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Психические и неврологические полигенные заболевания отличаются сложностью генетической архитектуры. На данный момент ни для одного полигенного психического заболевания нет полноценного генетического портрета. Однако появляется все больше работ, посвященных анализу данных GWAS [98, 212], результатов секвенирования [213, 214] и подходам к их обработке биоинформатическими методами [89, 215]. Расширяются выборки, выявляются новые локусы и гены-кандидаты. Все это приближает к созданию “генетических портфолио” для полигенных заболеваний.

De novo мутации в гене *SLC6A1* вызывают дисфункцию ГАМК-транспортера (GAT1), что приводит к нарушению ГАМК-регуляции и значительно повышает риск развития эпилепсии и ряда психических заболеваний, в том числе шизофрении. Изучение мутаций в гене *SLC6A1* также важно для составления генетических карт данных заболеваний. Своевременное обнаружение таких мутаций с помощью секвенирования нового поколения и разработка подходов для их исправления могут стать первым шагом к персонализированной терапии полигенных заболеваний.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа Е.С. Букиной, Н.В. Кондратьева и В.Е. Голымбет выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 21-15-00124.

Работа А.С. Артюхова выполнена при поддержке гранта Сколтеха по системной биологии.

Работа Е.С. Букиной и Э.Б. Дашинимаева выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования для Центра высокоточного геномного редактирования и генетических технологий для биомедицины № 075-15-2019-1789.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sodium- and chloride-dependent GABA transporter 1 [Electronic resource]. URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/P30531> (accessed: 11.05.2021).
2. Dalby N.O. // *Neuropharmacology*. 2000. V. 39. № 12. P. 2399–2407.
3. Semyanov A., Walker M.C., Kullmann D.M. // *Nat. Neurosci*. 2003. V. 6. № 5. P. 484–490.

4. Keros S., Hablitz J.J. // J. Neurophysiol. 2005. V. 94. № 3. P. 2073–2085.
5. Gong N. et al. // J. Neurosci. 2009. V. 29. № 50. P. 15836–15845.
6. Andäng M. et al. // Nature. 2008. V. 451. № 7177. P. 460–464.
7. Ben-Ari Y. // Nat. Rev. Neurosci. 2002. V. 3. № 9. P. 728–739.
8. Johannesen K.M. et al. // Epilepsia. 2018. V. 59. № 2. P. 389–402.
9. Goodspeed K. et al. // Brain Commun. 2020. V. 2. № 2. P. fcaa170.
10. Carvill G.L. et al. // Am. J. Hum. Genet. 2015. V. 96. № 5. P. 808–815.
11. Feng Y.-C.A. et al. // Am. J. Hum. Genet. 2019. V. 105. № 2. P. 267–282.
12. Sanders S.J. et al. // Neuron. 2015. V. 87. № 6. P. 1215–1233.
13. Satterstrom F.K. et al. // Cell. 2020. V. 180. № 3. P. 568–584. e23.
14. Bolton P.F. et al. // Br. J. Psychiatry. 2011. V. 198. № 4. P. 289–294.
15. Nelson S.B., Valakh V. // Neuron. 2015. V. 87. № 4. P. 684–698.
16. Rees E. et al. // Nat. Neurosci. 2020. V. 23. № 2. P. 179–184.
17. Volk D.W. et al. // Am. J. Psychiatry. 2001. V. 158. № 2. P. 256–265.
18. Hashimoto T. et al. // Am. J. Psychiatry. 2008. V. 165. № 4. P. 479–489.
19. Bullock W.M. et al. // Am. J. Psychiatry. 2008. V. 165. № 12. P. 1594–1603.
20. Hysi P.G. et al. // Nat. Genet. 2020. V. 52. № 4. P. 401–407.
21. Lawrenson K. et al. // Gynecol. Oncol. 2019. V. 153. № 2. P. 343–355.
22. Adkins D.E. et al. // Twin Res. Hum. Genet. 2015. V. 18. № 4. P. 335–347.
23. Thoeninger C.K. et al. // J. Neural Transm. 2009. V. 116. № 6. P. 649–657.
24. Lasky-Su J. et al. // Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet. Wiley, 2008. V. 147B. № 8. P. 1345–1354.
25. Demontis D. et al. // Nat. Genet. 2019. V. 51. № 1. P. 63–75.
26. Mattison K.A. et al. // Epilepsia. 2018. V. 59. № 9. P. e135–e141.
27. Yuan F.-F. et al. // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2017. V. 77. P. 202–208.
28. Minelli A. et al. // J. Neurosci. 1996. V. 16. № 19. P. 6255–6264.
29. Melone M., Ciappelloni S., Conti F. // Brain Struct. Funct. 2015. V. 220. № 2. P. 885–897.
30. Fattorini G., Melone M., Sánchez-Gómez M.V. // Glia. Wiley Online Library, 2017.
31. Fattorini G. et al. // Glia. 2020. V. 68. № 3. P. 646–655.
32. Uhlén M. et al. // Science. 2015. V. 347. № 6220. P. 1260419.
33. Zhang J. et al. // Syst. Biol. Reprod. Med. 2009. V. 55. № 5–6. P. 175–180.
34. Kanner B.I. // Biochemistry. 1978. V. 17. № 7. P. 1207–1211.
35. Radian R., Kanner B.I. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 21. P. 11859–11865.
36. Guastella J. et al. // Science. 1990. V. 249. № 4974. P. 1303–1306.
37. Zafar S., Jabeen I. // Front Chem. 2018. V. 6. P. 397.
38. Risso S., DeFelice L.J., Blakely R.D. // J. Physiol. 1996. V. 490 (Pt 3). P. 691–702.
39. Cammack J.N., Schwartz E.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1996. V. 93. № 2. P. 723–727.
40. Stark E. et al. // Neuron. 2013. V. 80. № 5. P. 1263–1276.
41. Pouille F., Scanziani M. // Science. 2001. V. 293. № 5532. P. 1159–1163.
42. Hájos N. et al. // J. Neurosci. 2004. V. 24. № 41. P. 9127–9137.
43. Akam T., Kullmann D.M. // Neuron. 2010. V. 67. № 2. P. 308–320.
44. Brown D.A. // Neuropharmacology. 2018. V. 136. Pt A. P. 3–9.
45. Borden L.A. // Neurochem. Int. 1996. V. 29. № 4. P. 335–356.
46. Iversen L.L., Kelly J.S. // Biochem. Pharmacol. 1975. V. 24. № 9. P. 933–938.
47. Dingledine R., Korn S.J. // J. Physiol. 1985. V. 366. P. 387–409.
48. Isaacson J.S., Solís J.M., Nicoll R.A. // Neuron. 1993. V. 10. № 2. P. 165–175.
49. Overstreet L.S., Westbrook G.L. // J. Neurosci. 2003. V. 23. № 7. P. 2618–2626.
50. Liu G.-X. et al. // J. Neurosci. Res. 2007. V. 85. № 3. P. 649–655.
51. Liu G.-X. et al. // Neuropsychopharmacology. 2007. V. 32. № 7. P. 1531–1539.
52. Xu Y.F. et al. // J. Neurosci. Res. 2008. V. 86. № 2. P. 465–470.
53. Cai Y.-Q. et al. // J. Neurosci. Res. 2006. V. 84. № 2. P. 255–267.
54. Chiu C.-S. et al. // J. Neurosci. 2002. V. 22. № 23. P. 10251–10266.
55. Chiu C.-S. et al. // J. Neurosci. 2005. V. 25. № 12. P. 3234–3245.
56. Quandt G., Höfner G., Wanner K.T. // Bioorg. Med. Chem. 2013. V. 21. № 11. P. 3363–3378.
57. Kristensen A.S. et al. // Pharmacol. Rev. 2011. V. 63. № 3. P. 585–640.
58. Zhou Y., Danbolt N.C. // Front. Endocrinol. 2013. V. 4. P. 165.
59. Scimemi A. // Front. Cell. Neurosci. 2014. V. 8. P. 161.
60. Kavanaugh M.P. et al. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. № 31. P. 22007–22009.
61. Ikegaki N. et al. // Brain Res. Mol. Brain Res. 1994. V. 26. № 1–2. P. 47–54.
62. Conti F., Minelli A., Melone M. // Brain Res. Brain Res. Rev. 2004. V. 45. № 3. P. 196–212.

63. Zhou Y. et al. // Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2012. V. 302. № 3. P. F316–F328.
64. GeneCards Human Gene Database. SLC6A1 Gene - GeneCards [Electronic resource]. URL: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?id=P30531> (accessed: 12.05.2021).
65. Braestrup C. et al. // J. Neurochem. 1990. V. 54. № 2. P. 639–647.
66. P30531 [Electronic resource]. URL: <https://swiss-model.expasy.org/repository/uniprot/P30531?csm=094DB39C1D3B75D2> (accessed: 15.11.2020).
67. Dichter M.A., Ayala G.F. // Science. 1987. V. 237. № 4811. P. 157–164.
68. Markram H. et al. // Nat. Rev. Neurosci. 2004. V. 5. № 10. P. 793–807.
69. Markram H. et al. // Cell. 2015. V. 163. № 2. P. 456–492.
70. Rudy B. et al. // Dev. Neurobiol. 2011. V. 71. № 1. P. 45–61.
71. Petilla Interneuron Nomenclature Group et al. // Nat. Rev. Neurosci. 2008. V. 9. № 7. P. 557–568.
72. Kawaguchi Y., Kubota Y. // Cereb. Cortex. 1997. V. 7. № 6. P. 476–486.
73. Buzsáki G., Draguhn A. // Science. 2004. V. 304. № 5679. P. 1926–1929.
74. Gaetz W. et al. // Neuroimage. 2011. V. 55. № 2. P. 616–621.
75. Lundqvist M. et al. // Neuron. 2016. V. 90. № 1. P. 152–164.
76. Rojas D.C., Wilson L.B. // Biomark. Med. 2014. V. 8. № 3. P. 353–368.
77. McNally J.M., McCarley R.W. // Curr. Opin. Psychiatry. 2016. V. 29. № 3. P. 202–210.
78. Le Roux N. et al. // Eur. J. Neurosci. 2008. V. 27. № 12. P. 3244–3256.
79. den Boon F.S. et al. // Pflugers Arch. 2015. V. 467. № 7. P. 1551–1564.
80. Gao R., Penzes P. // Curr. Mol. Med. 2015. V. 15. № 2. P. 146–167.
81. Turrigiano G.G., Nelson S.B. // Nat. Rev. Neurosci. 2004. V. 5. № 2. P. 97–107.
82. Kang E. et al. // Cell Rep. 2019. V. 28. № 6. P. 1419–1428.e3.
83. Arslan A. // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. № 1.
84. Akbarian S. et al. // Arch. Gen. Psychiatry. 1995. V. 52. № 4. P. 258–266.
85. Volk D.W. et al. // Arch. Gen. Psychiatry. 2000. V. 57. № 3. P. 237–245.
86. Guidotti A. et al. // Arch. Gen. Psychiatry. 2000. V. 57. № 11. P. 1061–1069.
87. Hashimoto T. et al. // J. Neurosci. 2003. V. 23. № 15. P. 6315–6326.
88. Williams H.J. et al. // Am. J. Psychiatry. 2005. V. 162. № 9. P. 1736–1738.
89. Arslan A. // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. Elsevier Inc., 2018. V. 80. P. 155–165.
90. Bormann J. // Trends Pharmacol. Sci. 2000. V. 21. № 1. P. 16–19.
91. Zhang D. et al. // Trends Pharmacol. Sci. 2001. V. 22. № 3. P. 121–132.
92. Chebib M. // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2004. V. 31. № 11. P. 800–804.
93. Mehta A.K., Ticku M.K. // Brain Res. Brain Res. Rev. 1999. V. 29. № 2–3. P. 196–217.
94. Costa E. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1998. V. 38. P. 321–350.
95. Bianchi M.T., Haas K.F., Macdonald R.L. // J. Neurosci. 2001. V. 21 № 4. P. 1127–1136.
96. Lee Y.H., Kim J.-H., Song G.G. // Gene. 2013. V. 525. № 1. P. 107–115.
97. Lencz T. et al. // Nat. Commun. 2013. V. 4. P. 2739.
98. Ripke S. et al. // Nat. Genet. 2013. V. 45. № 10. P. 1150–1159.
99. Bettler B., Tiao J.Y.-H. // Pharmacol. Ther. 2006. V. 110, № 3. P. 533–543.
100. Jackson M.F., Esplin B., Capek R. // Epilepsy Res. 1999. V. 37. № 1. P. 25–36.
101. Brooks-Kayal A.R. et al. // Nat. Med. 1998. V. 4. № 10. P. 1166–1172.
102. Bethmann K. et al. // Neurobiol. Dis. 2008. V. 31. № 2. P. 169–187.
103. Jones K.A. et al. // Nature. 1998. V. 396. № 6712. P. 674–679.
104. Couve A., Moss S.J., Pangalos M.N. // Mol. Cell. Neurosci. 2000. V. 16. № 4. P. 296–312.
105. Mott D.D., Lewis D.V. // Int. Rev. Neurobiol. 1994. V. 36. P. 97–223.
106. Scanziani M. // Neuron. 2000. V. 25. № 3. P. 673–681.
107. Misgeld U., Bijak M., Jarolimek W. // Prog. Neurobiol. 1995. V. 46. № 4. P. 423–462.
108. Andrade R., Malenka R.C., Nicoll R.A. // Science. 1986. V. 234. № 4781. P. 1261–1265.
109. Freund T.F., Buzsáki G. // Hippocampus. 1996. V. 6. № 4. P. 347–470.
110. Miles R. et al. // Neuron. 1996. V. 16. № 4. P. 815–823.
111. Gaspary H.L., Wang W., Richerson G.B. // J. Neurophysiol. 1998. V. 80, № 1. P. 270–281.
112. Liu Q.Y. et al. // J. Neurophysiol. 2000. V. 84. № 3. P. 1392–1403.
113. Overstreet L.S., Westbrook G.L. // J. Neurophysiol. 2001. V. 86. № 2. P. 596–603.
114. Brickley S.G., Cull-Candy S.G., Farrant M. // J. Physiol. 1996. V. 497 (Pt 3). P. 753–759.
115. Rossi D.J., Hamann M. // Neuron. 1998. V. 20, № 4. P. 783–795.
116. Rivera C. et al. // Nature. 1999. V. 397, № 6716. P. 251–255.
117. Ganguly K. et al. // Cell. 2001. V. 105, № 4. P. 521–532.
118. Ben-Ari Y. et al. // Prog. Brain Res. 1994. V. 102. P. 261–273.
119. Jensen K. et al. // J. Neurophysiol. 2003. V. 90. № 4. P. 2690–2701.
120. Bragina L. et al. // J. Neurochem. 2008. V. 105. № 5. P. 1781–1793.

121. *Conti F. et al.* // *Front. Cell. Neurosci.* 2011. V. 5. P. 2.
122. *Owens D.F., Kriegstein A.R.* // *Nat. Rev. Neurosci.* 2002. V. 3. № 9. P. 715–727.
123. *Cellot G., Cherubini E.* // *Front. Neural Circuits.* 2013. V. 7. P. 136.
124. *Manent J.-B. et al.* // *J. Neurosci.* 2005. V. 25. № 19. P. 4755–4765.
125. *Behar T.N. et al.* // *Cereb. Cortex.* 2001. V. 11. № 8. P. 744–753.
126. *Behar T.N. et al.* // *Cereb. Cortex.* 2000. V. 10. № 9. P. 899–909.
127. *Aronne M.P. et al.* // *Exp. Neurol.* 2011. V. 229. № 2. P. 364–371.
128. *Cuzon V.C. et al.* // *J. Neurosci.* 2008. V. 28. № 8. P. 1854–1864.
129. *Haas M. et al.* // *Eur. J. Neurosci.* 2013. V. 37. № 10. P. 1584–1593.
130. *Manent J.-B. et al.* // *Epilepsia.* 2007. V. 48. № 4. P. 684–693.
131. *Thompson B.L., Levitt P., Stanwood G.D.* // *Nat. Rev. Neurosci.* 2009. V. 10. № 4. P. 303–312.
132. *Wu X. et al.* // *J. Neurosci.* 2012. V. 32. № 1. P. 331–343.
133. *Trinchero M.F., Giacomini D., Schinder A.F.* // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2021. V. 69. P. 124–130.
134. *Huang E.J., Reichardt L.F.* // *Annu. Rev. Neurosci.* 2001. V. 24. P. 677–736.
135. *Marín O., Rubenstein J.L.* // *Nat. Rev. Neurosci.* 2001. V. 2. № 11. P. 780–790.
136. *Park H., Poo M.-M.* // *Nat. Rev. Neurosci.* 2013. V. 14. № 1. P. 7–23.
137. *Knüsel B. et al.* // *J. Neurosci.* 1994. V. 14. № 3. Pt 2. P. 1542–1554.
138. *Polleux F. et al.* // *Development.* 2002. V. 129. № 13. P. 3147–3160.
139. *Woo N.H., Lu B.* // *Neuroscientist.* 2006. V. 12. № 1. P. 43–56.
140. *Gorski J.A. et al.* // *J. Neurosci.* 2003. V. 23. № 17. P. 6856–6865.
141. *Vicario-Abejón C. et al.* // *Nat. Rev. Neurosci.* 2002. V. 3. № 12. P. 965–974.
142. *Paus T., Keshavan M., Giedd J.N.* // *Nat. Rev. Neurosci.* 2008. V. 9. № 12. P. 947–957.
143. *Farhan H., Freissmuth M., Sitte H.H.* // *Handb. Exp. Pharmacol.* 2006. № 175. P. 233–249.
144. *Berninger B. et al.* // *Development.* 1995. V. 121. № 8. P. 2327–2335.
145. *Marty S. et al.* // *J. Neurosci.* 1996. V. 16. № 2. P. 675–687.
146. *Arion D., Lewis D.A.* // *Arch. Gen. Psychiatry.* 2011. V. 68. № 1. P. 21–31.
147. *Hyde T.M. et al.* // *J. Neurosci.* 2011. V. 31. № 30. P. 11088–11095.
148. *Ben-Ari Y. et al.* // *J. Physiol.* 1989. V. 416. P. 303–325.
149. *Blume W.T. et al.* // *Epilepsia.* 2001. V. 42. № 9. P. 1212–1218.
150. *Chen L. et al.* // *Acta Neuropsychiatr.* 2015. V. 27. № 6. P. 368–374.
151. *Cope D.W. et al.* // *Nat. Med.* 2009. V. 15. № 12. P. 1392–1398.
152. *Han H.A., Cortez M.A., Snead O.C. III.* *GABAB Receptor and Absence Epilepsy* // *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* / Ed. Noebels J.L. et al. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), 2012.
153. *Khosravani H., Zamponi G.W.* // *Physiol. Rev.* 2006. V. 86. № 3. P. 941–966.
154. *Snead O.C. 3rd.* // *Eur. J. Pharmacol.* 1992. V. 213. № 3. P. 343–349.
155. *Zhang L. et al.* // *Neuropsychopharmacology.* 2016. V. 41. № 6. P. 1467–1476.
156. *Macdonald R.L., Kang J.-Q., Gallagher M.J.* // *J. Physiol.* 2010. V. 588. Pt 11. P. 1861–1869.
157. *Yu Z. et al.* // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 7.
158. *Cai K. et al.* // *Exp. Neurol.* Elsevier, 2019. V. 320. January. P. 112973.
159. *Parikshak N.N. et al.* // *Cell.* 2013. V. 155. № 5. P. 1008–1021.
160. *Iakoucheva L.M., Muotri A.R., Sebat J.* // *Cell.* 2019. V. 178. № 6. P. 1287–1298.
161. *Grove J. et al.* // *Nat. Genet.* Nature America, Inc., 2019. V. 51. № 3. P. 431–444.
162. *Di J. et al.* // *Int. J. Dev. Neurosci.* 2020. V. 80. № 2. P. 73–85.
163. *Delahanty R.J. et al.* // *Mol. Psychiatry.* 2011. V. 16. № 1. P. 86–96.
164. *Han S. et al.* // *Nature.* 2012. V. 489. № 7416. P. 385–390.
165. *Kang J.-Q., Barnes G.* // *J. Autism Dev. Disord.* 2013. V. 43. № 1. P. 68–79.
166. *Wang J. et al.* // *Mol. Brain.* 2020. Vol. 13, № 1. P. 76.
167. *Devries S. et al.* // *Cold Spring Harb Mol Case Stud.* 2020.
168. *Posar A., Visconti P.* // *J. Pediatr. Neurosci.* 2019. V. 14. № 2. P. 100–102.
169. *Ferguson B.R., Gao W.-J.* // *Front. Neural Circuits.* 2018. V. 12. P. 37.
170. *Singh T. et al.* // *Nat. Genet.* Nature Publishing Group, 2017. V. 49. № 8. P. 1167–1173.
171. *Fromer M. et al.* // *Nature.* Nature Publishing Group, 2014. V. 506. № 7487. P. 179–184.
172. *Lee J., Park S.* // *J. Abnorm. Psychol.* 2005. V. 114. № 4. P. 599–611.
173. *Insel T.R.* // *Nature.* 2010. V. 468. № 7321. P. 187–193.
174. *Tse M.T., Piantadosi P.T., Floresco S.B.* // *Biol. Psychiatry.* Elsevier, 2015. V. 77. № 11. P. 929–939.
175. *Hashimoto T. et al.* // *Mol. Psychiatry.* 2008. V. 13. № 2. P. 147–161.
176. *Wray N.R., Visscher P.M.* // *Schizophr. Bull.* 2010. V. 36. № 1. P. 14–23.
177. *Gejman P.V., Sanders A.R., Duan J.* // *Psychiatr. Clin. North Am.* 2010. V. 33. № 1. P. 35–66.
178. *Martin A.R. et al.* // *Biol. Psychiatry.* 2019. V. 86. № 2. P. 97–109.
179. *Ma C. et al.* // *Transl. Psychiatry.* 2018. V. 8. № 1.

180. Pardiñas A.F. et al. // Nat. Genet. 2018. V. 50. № 3. P. 381–389.
181. Tansey K.E. et al. // Mol. Psychiatry. 2016. V. 21. № 8. P. 1085–1089.
182. Pocklington A.J. et al. // Neuron. 2015. V. 86. № 5. P. 1203–1214.
183. Ripke S. et al. // Nature. 2014. V. 511. № 7510. P. 421–427.
184. Wray N.R. et al. // J. Child Psychol. Psychiatry. 2014. V. 55. № 10. P. 1068–1087.
185. Bush W.S., Moore J.H. // PLoS Comput. Biol. 2012. V. 8. № 12. P. e1002822.
186. Sullivan P.F., Daly M.J., O'Donovan M. // Nat. Rev. Genet. Nature Publishing Group. 2012. V. 13. № 8. P. 537–551.
187. St Clair D. // Schizophr. Bull. 2009. V. 35. № 1. P. 9–12.
188. Cook E.H., Jr., Scherer S.W. // Nature. 2008. V. 455. № 7215. P. 919–923.
189. Gulsuner S. et al. // Cell. 2013. V. 154. № 3. P. 518–529.
190. Singh T. et al. // Eur. Neuropsychopharmacol. 2019. V. 29. P. S813–S814.
191. Lewis D.A., Hashimoto T., Volk D.W. // Nat. Rev. Neurosci. 2005. V. 6. № 4. P. 312–324.
192. Opris I., Bruce C.J. // Brain Res. Brain Res. Rev. 2005. V. 48. № 3. P. 509–526.
193. Семьянов А.В. // Нейрофизиология. research-gate.net, 2002.
194. Somogyi P., Klausberger T. // J. Physiol. 2005. V. 562. Pt 1. P. 9–26.
195. Lewis D.A. et al. // Trends Neurosci. 2012. V. 35. № 1. P. 57–67.
196. Lisman J. // Curr. Opin. Neurobiol. 2012. V. 22. № 3. P. 537–544.
197. Basar-Eroglu C. et al. // Int. J. Psychophysiol. 2007. V. 64. № 1. P. 39–45.
198. Wang D., Tai P.W.L., Gao G. // Nat. Rev. Drug Discov. 2019. V. 18. № 5. P. 358–378.
199. Foust K.D. et al. // Nat. Biotechnol. 2010. V. 28. № 3. P. 271–274.
200. Fu H. et al. // Mol. Ther. 2011. V. 19. № 6. P. 1025–1033.
201. Kaplitt M.G. et al. // Lancet. 2007. V. 369. № 9579. P. 2097–2105.
202. Bolt M.W. et al. // J. Toxicol. Sci. 2021. V. 46. № 2. P. 57–68.
203. Shivram H. et al. // Nat. Chem. Biol. 2021. V. 17. № 1. P. 10–19.
204. Weiss W.F. // Ther Innov Regul Sci. 2021.
205. Nishiyama J., Mikuni T., Yasuda R. // Neuron. 2017. V. 96. № 4. P. 755–768.e5.
206. Matsuda T., Oinuma I. // Sci. Rep. 2019. V. 9. № 1. P. 11309.
207. Xue C., Greene E.C. // Trends Genet. 2021.
208. Fu Y.-W. et al. // Nucleic Acids Res. 2021. V. 49. № 2. P. 969–985.
209. Anzalone A.V. et al. // Nature. 2019. V. 576. № 7785. P. 149–157.
210. Ridley R.B., Walsh E.M., Ildefonso C.J. // Methods Mol. Biol. 2021. V. 2225. P. 77–92.
211. Sledzinski P. et al. // Biotechnol. Adv. 2021. V. 49. P. 107737.
212. Visscher P.M. et al. // Am. J. Hum. Genet. 2012. V. 90. № 1. P. 7–24.
213. Malhotra D., Sebat J. // Cell. 2012. V. 148. № 6. P. 1223–1241.
214. Yuan H. et al. // BMC Med. Genet. 2020. V. 21. № 1. P. 93.
215. Golov A.K. et al. // Cells. 2020. V. 9. № 1. P. 246.

***SLC6A1* and Neuropsychiatric Diseases: The Role of Mutations, Prospects for Treatment with Genome Editing Systems**

**E. S. Bukina^{a, b}, N. V. Kondratiev^c, S. V. Kozin^a,
V. E. Golimbet^c, A. S. Artyuhov^b, and E. B. Dashinimaev^{b, d}**

^a*Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russia*

^b*Center for High Precision Genomic Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia*

^c*Federal State Budgetary Scientific Institution Mental Health Research Center, Moscow, Russia*

^d*Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

SLC6A1 (solute carrier family 6 member 1) is a gene encoding the gamma-aminobutyric acid (GABA) transporter protein GAT1. GAT1 is responsible for GABA reuptake from the synaptic cleft and intercellular space. Mutations in the *SLC6A1* gene can lead to impaired GABA regulation and are associated with epilepsy and a number of psychiatric disorders. In this review, we discuss the role of the GAT1 protein in GABAergic regulation and the association of mutations in the *SLC6A1* gene with epilepsy, autism spectrum disorders, intellectual disability and schizophrenia, as well as prospects for their treatment with genome editing systems.

Keywords: *SLC6A1*, GAT1, GABAergic system, *de novo* mutations, autism spectrum disorders, intellectual disability, epilepsy, schizophrenia

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 577

ДОСТАВКА CRISPR–Cas9 В ВИДЕ РИБОНУКЛЕОПРОТЕИНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ ПОВЫШАЕТ ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЕДАКТИРОВАНИЯ *EGFP*

© 2021 г. Я. С. Слесаренко^{1, *}, А. Г. Быконя², А. А. Анучина¹, М. И. Зайнитдинова¹,
Н. А. Евтушенко³, А. В. Лавров¹, С. А. Смирнихина¹

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Медико-генетический научный центр
имени академика Н.П. Бочкова”, Москва, Россия

²Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Россия

³Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины
Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

Поступила в редакцию 20.05.2021 г.

После доработки 05.07.2021 г.

Принята к публикации 15.07.2021 г.

Стремительное развитие технологии редактирования генома с помощью CRISPR–Cas9 привело к ее широкому использованию во многих областях биологических исследований. Однако применению этой технологии в клинической практике препятствует отсутствие эффективного способа доставки компонентов CRISPR–Cas9 в клетки, а также низкая эффективность и возможность неспецифического действия. Использование прямой доставки в виде рибонуклеопротеинового комплекса (RNP) может позволить избежать многих нежелательных эффектов, а также повысить эффективность геномного редактирования. В этой работе мы показали, что эффективность коррекции одонуклеотидной делеции в гене *EGFP* в плазмидном локусе достоверно увеличивается до 35% при использовании RNP вместо плазмид. Полученные результаты создают основу для разработки методов коррекции мутаций, приводящих к наследственным заболеваниям человека.

Ключевые слова: CRISPR–Cas9, геномное редактирование, рибонуклеопротеиновый комплекс, RNP

DOI: 10.31857/S1027813321040129

ВВЕДЕНИЕ

Одна из новейших технологий редактирования генома, основанная на системе CRISPR–Cas9, уже привела к прогрессу в области биотехнологии и медицины. В классическом варианте системы используется сконструированная единая направляющая РНК (sgRNA), чтобы направлять нуклеазу Cas9 в целевую область по принципу комплементарности. Затем Cas9 расщепляет ДНК и образует двухцепочечные разрывы (ДЦР), репарация которых приводит к вставкам или делециям (инделам) в целевых геномных локусах [1]. Этот подход — нокаут гена — редко может быть применен для генной терапии, когда важно восстановить нормальную последовательность гена. В этом случае в процессе репарации важно участие гомологичной матрицы ДНК, роль которой может играть как гомологичная хромосома, так и искусственно добавленная молекула.

Как и для классических подходов генной терапии, для геномного редактирования остро стоит вопрос доставки этого генетического инструмента в клетки. Важно, чтобы компоненты CRISPR–Cas9 с высокой эффективностью попали в целевые клетки, но в то же время не попали в другие (или при попадании не функционировали); чтобы быстро начинали свое действие внутри клетки и не персистировали в ней.

Наиболее частыми формами доставки CRISPR–Cas9 являются плазмидная ДНК (пДНК), матричная РНК (мРНК) или рибонуклеопротеиновый комплекс (RNP) [2]. Мировые данные [2–5] свидетельствуют о том, что эффективность доставки CRISPR–Cas9 в клетки можно повысить, используя RNP, который состоит из белка Cas9 в комплексе с синтезированной *in vitro* sgRNA. Прямая доставка RNP комплекса позволяет избежать многих нежелательных эффектов, связанных с пДНК или мРНК доставкой [5–8]. Одно из преимуществ доставки в форме RNP заключается в том, что редактирование гена начинается сразу, без процесса внутриклеточного синтеза компо-

* Адресат для корреспонденции: 115522 Россия, Москва, ул. Москворечье, д. 1; e-mail: yaslesarenkobio@gmail.com.

нентов и сборки системы CRISPR, также RNP достаточно быстро деградирует, что способствует снижению потенциального неспецифического действия CRISPR–Cas9 [7]. Все это в свою очередь позволяет повысить эффективность коррекции мутаций при геномном редактировании.

Целью работы явилось сравнение эффективности внесения инделов в ген *EGFP* и коррекции путем гомологичной репарации мутации с.337delG в этом гене при доставке CRISPR–Cas9 в виде плазмид и RNP с помощью липидных наночастиц.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Этическое одобрение. Для данного исследования этическое одобрение не требовалось, так как в рамках него не проводилось каких-либо исследований с использованием животных или с участием людей в качестве объектов.

Клеточные культуры. Эксперименты проводили на двух клеточных культурах: HEK293T (предоставлена к. б. н. М.Ю. Скобловым, лаборатория функциональной геномики ФГБНУ “МГНЦ”, Москва) и HEK293T-GFPmut. Последнюю получали путем лентивирусной трансдукции. Ген *EGFP* с мутацией с.337delG был амплифицирован с плазмиды pEGFP-mut (см. далее) и клонирован в плазмиду pLVT_turboRFP635. Вирионы были получены в HEK293T (60 мм чашка) из трех плазмид: 2 мкг pR8.91, 0.6 мкг pMD.G и (2 мкг) pLVT_turboRFP635-eGFPmut (все плазмиды были любезно предоставлены Didier Trono, <https://www.epfl.ch/labs/tronolab/>). Среду с вирусом пропускали через 0.45 мкм фильтр и использовали ее для заражения клеток HEK293T (5–7 MOI). С помощью клеточной сортировки были отобраны позитивные по красной флуоресценции клетки.

За день до трансфекции клетки высевали в 12-луночный планшет по 200 тысяч клеток на лунку и культивировали в DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Thermo Fisher Scientific, USA), 100 мкг/мл пенициллин/стрептомицина (ПанЭко, Россия) и 4 mM L-глутамин (ПанЭко, Россия). В день трансфекции конfluence составляла 60–70%.

Клонирование плазмид. Исходная плазида для CRISPR–Cas9 eSpCas9(1.1) была любезно предоставлена Feng Zhang (Addgene #71814). Направляющие РНК (sgRNA) были подобраны с помощью свободного программного обеспечения, разработанного Broad Institute (США) (<http://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgRNA-design>). sgRNA GFP1 (на последовательность *EGFP* дикого типа) и GFP2 (на последовательность *EGFP* с мутацией с.337delG) были клонированы в исходную плазмиду — Cas9(1.1)-GFP1 и Cas9(1.1)-GFP2. Плазида pEGFP-mut была получена из pEGFP-

C1 (Clontech, США) путем внесения мутации с.337delG сайт-направленным мутагенезом.

Сборка RNP комплексов. Исходный белок Cas9 (NEB, USA) готовили в буфере того же производителя, добавляли sgRNA, синтезированную набором Guide-it™ sgRNA In Vitro Transcription Kit (Takara Bio, Japan) по протоколу производителя, в соотношении 1 : 5 (мкг) в среде Gibco Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, США). Для *in vitro* транскрипции использовали праймеры sgGFP1: 5'-GTCGCCCTCGAACTTCACCT-3' и sgGFP2: 5'-TGTCGCCCTCGAACTTCACT-3'. Далее создавали липидные комплексы с Lipofectamine CRISPRMAX (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу производителя, после чего производили трансфекцию.

Сборка плазмидных комплексов. Для внесения инделов в плазмидный locus *EGFP* использовали таргетную плазмиду pEGFP-C1 (Clontech, США) в количестве 0.6 мкг на 200 тыс. клеток в сочетании либо с RNP (Cas9 + sgRNA GFP1), либо с плазмидой Cas9(1.1)-GFP1 в количестве 5.8 мкг. Для восстановления правильной последовательности *EGFP* использовали таргетную плазмиду pEGFP-mut в количестве 0.6 мкг на 200 тыс. клеток в сочетании либо с RNP (Cas9+sgRNA GFP2), либо с плазмидой Cas9(1.1)-GFP2 в количестве 5,8 мкг. При этом использовали донорную молекулу ssODN-GFP длиной 120 нуклеотидов (5'-TTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGG-3') в количестве 100 пмоль на 200 тыс. клеток. Все плазмиды и ssODN трансфицировали в клетки с помощью Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу производителя.

Флуоресцентная микроскопия. Через 72 ч после трансфекции оценивали эффективность редактирования с помощью флуоресцентной микроскопии на микроскопе ZEISS Axio Vert.A1 (Carl Zeiss Microscopy, Германия).

Проточная цитофлуориметрия и сортировка клеток. Эффективность трансфекции оценивали в лунках, трансфицированных комбинацией исходной плазмиды eSpCas9(1.1) и pEGFP-C1 в соотношении 10 : 1 (5.8 мкг и 0.6 мкг, соответственно) с помощью проточной цитофлуориметрии на приборе Partec FloMax через 72 ч после трансфекции. Эффективность редактирования оценивали в экспериментальных лунках так же. GFP-положительные клетки были отсортированы на клеточном сортере S3e (Bio-Rad Laboratories, США).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Амплификацию проводили методом ПЦР на амплификаторе “Терцик” (ДНК-технология, Москва). Последовательность праймеров: eGFP65_f – 5'-ACGTAAACGGCCACAAGTTCA-3';

eGFP527_r – 5'-CTGCCGTCCTCGATGTTGT-3'.

Условия ПЦР: начальная денатурация – 95°C, 5 мин; 35 циклов амплификации со следующими параметрами: 1) денатурация – 95°C, 30 с; 2) отжиг – 61°C, 20 с; 3) синтез – 72°C, 30 с; 4) инкубация при 72°C в течение 3 мин.

Секвенирование по Сэнгеру. Ампликоны секвенировали по Сэнгеру с использованием праймеров для ПЦР в качестве праймеров для секвенирования на приборе ABI Prism 3130XL genetic analyzer (Applied Biosystems, США) по протоколу производителя.

TIDE/TIDER. Полученные хроматограммы после секвенирования были проанализированы с помощью программы Tracking Indels for Decomposition (<https://tide.nki.nl>). Приложение позволяет оценить уровни гомологичной репарации или нехомологичного соединения концов ДНК. Вариант программы TIDER позволяет статистически оценить процент правильно восстановленных последовательностей и весь процент восстановленных последовательностей.

Статистический анализ. Для статистической обработки данных использовали критерий Манна–Уитни и *t*-тест. Статистическую обработку проводили в программе STATISTICA версия 10.0 (StatSoft, США). Различие считалось значимым, если значение *p* было меньше 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Внесение инделов в EGFP. На первом этапе вносили инделы в *EGFP* (схема эксперимента приведена на рис. 1а) с помощью CRISPR–Cas9. Эффективность разрушения (нокаутирования) *EGFP* оценивали проточной цитофлуориметрией с нормализацией на эффективность трансфекции. Контрольное (исходное) количество флуоресцентных клеток принимали за 100%. При нокаутировании *EGFP* наблюдали уменьшение доли флуоресцентных клеток (рис. 1в). На этом этапе были апробированы несколько протоколов (разное количество Cas9 в RNP, одновременное введение RNP и pEGFP-C1, а также отсроченное на 6 и 24 ч введение pEGFP-C1 после RNP). Различия во времени внесения плазмид и RNP обусловлены тем, что комплексу CRISPR–Cas9 необходимо время для синтеза и сборки внутри клетки (не менее 6 ч для RNP и 24 ч для редактирующей плазмиды). При одновременной трансфекции компонентов в клетку белок EGFP успевает накопиться до начала работы CRISPR–Cas9. В этом случае не исключены ложноотрицательные результаты редактирования и, как следствие, недостаточное снижение флуоресценции. Если разнести по времени внесение Cas9(1.1)-sgGFP₁ или RNP и pEGFP-C1wt, то комплекс CRISPR–

Cas9 успевает собраться и сразу начинает вносить разрезы в pEGFP-C1wt.

Как видно из гистограммы (рис. 1б), наиболее эффективное внесение инделов было достигнуто при добавлении 2.5 мкг Cas9 и трансфекции плазмиды pEGFP-C1 через 24 ч после RNP (*p* < 0.05 по сравнению с плазмидной доставкой). Доля флуоресцентных клеток при этих условиях уменьшилась в 5 раз. На следующих этапах работы использовали 2.5 мкг Cas9.

Восстановление последовательности EGFP. Восстановление правильной последовательности *EGFP* проводили в двух клеточных культурах: в культуре HEK293T, в которую трансфицировали плазмиду EGFP-mut, и в культуре HEK293T-GFPmut, в геном которой была встроена последовательность *EGFP* с той же мутацией c.337delG. Для восстановления последовательности использовали донорную молекулу ssODN. В случае восстановления правильной последовательности наблюдали флуоресценцию.

В культуре HEK293T эффективность коррекции мутации составила почти 28% при использовании RNP, по сравнению с плазмидной доставкой (5%, *p* < 0.05) (рис. 2б. 1). Последующая отработка протокола трансфекции плазмид и RNP комплексов позволила еще больше увеличить эффективность коррекции мутации в *EGFP* – практически до 17% для плазмид и 35% для RNP (*p* < 0.05) (рис. 2б. 2).

На последнем этапе работы были проведены эксперименты по восстановлению *EGFP* в клеточной культуре HEK293T-GFPmut. Вопреки ожиданиям, редактирование геномного локуса *EGFP* было менее эффективным, как с доставкой CRISPR–Cas9 в виде RNP, так и в виде плазмид. При этом доля флуоресцентных клеток при использовании RNP была в 3.6 раза ниже, чем при плазмидной доставке (*p* < 0.05) (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Классический вариант CRISPR–Cas9 с использованием нуклеазы считается довольно эффективным методом, особенно при нокаутировании генов или вырезания фрагментов генов. Однако нуклеаза способна создавать двуцепочечные разрывы не только в таргетном локусе, но и в других, тем самым потенциально внося дополнительные мутации в геном. Часто нецелевые эффекты наблюдаются в исследованиях с использованием плазмидной формы доставки [9, 10]. В свою очередь эти нецелевые эффекты могут приводить к нарушениям функций генов, что усложняет переход технологии редактирования генома в клиническую практику. Разработка безопасных и эффективных способов доставки системы CRISPR–Cas9 к тканям или клеткам-мишеням в организме человека отчасти может решить эту проблему. RNP представ-

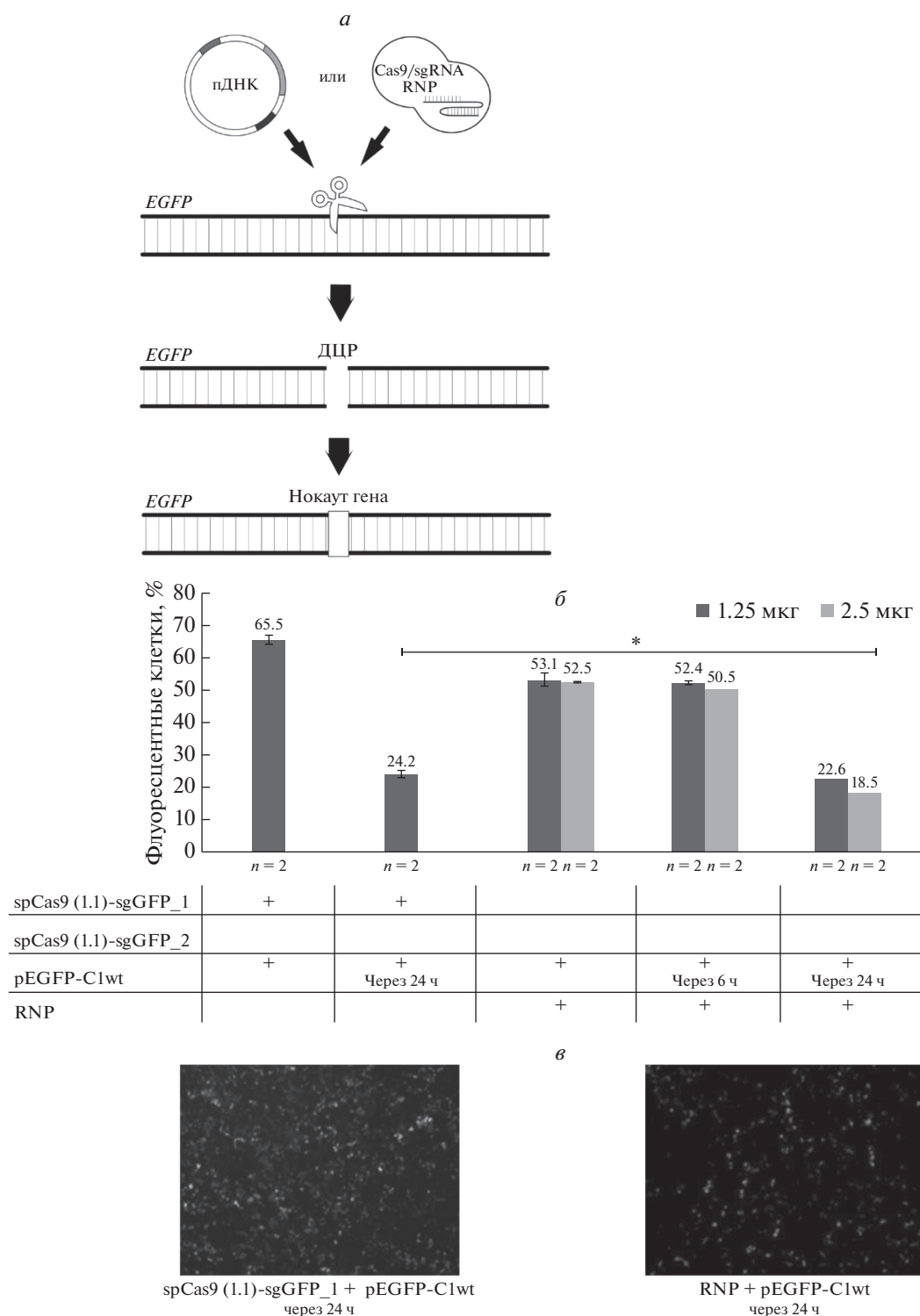


Рис. 1. *а* — схема эксперимента. Внесение инделов в гене *EGFP* в результате двухцепочечного разрыва и последующий нокаут гена. *б* — сравнение эффективности разрушения (нокаутирования) *EGFP*. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего (* $p < 0.05$ — доставка с помощью RNP по сравнению с плазмидной доставкой). *в* — микроскопия экспериментальных лунок через 72 ч после трансфекции.

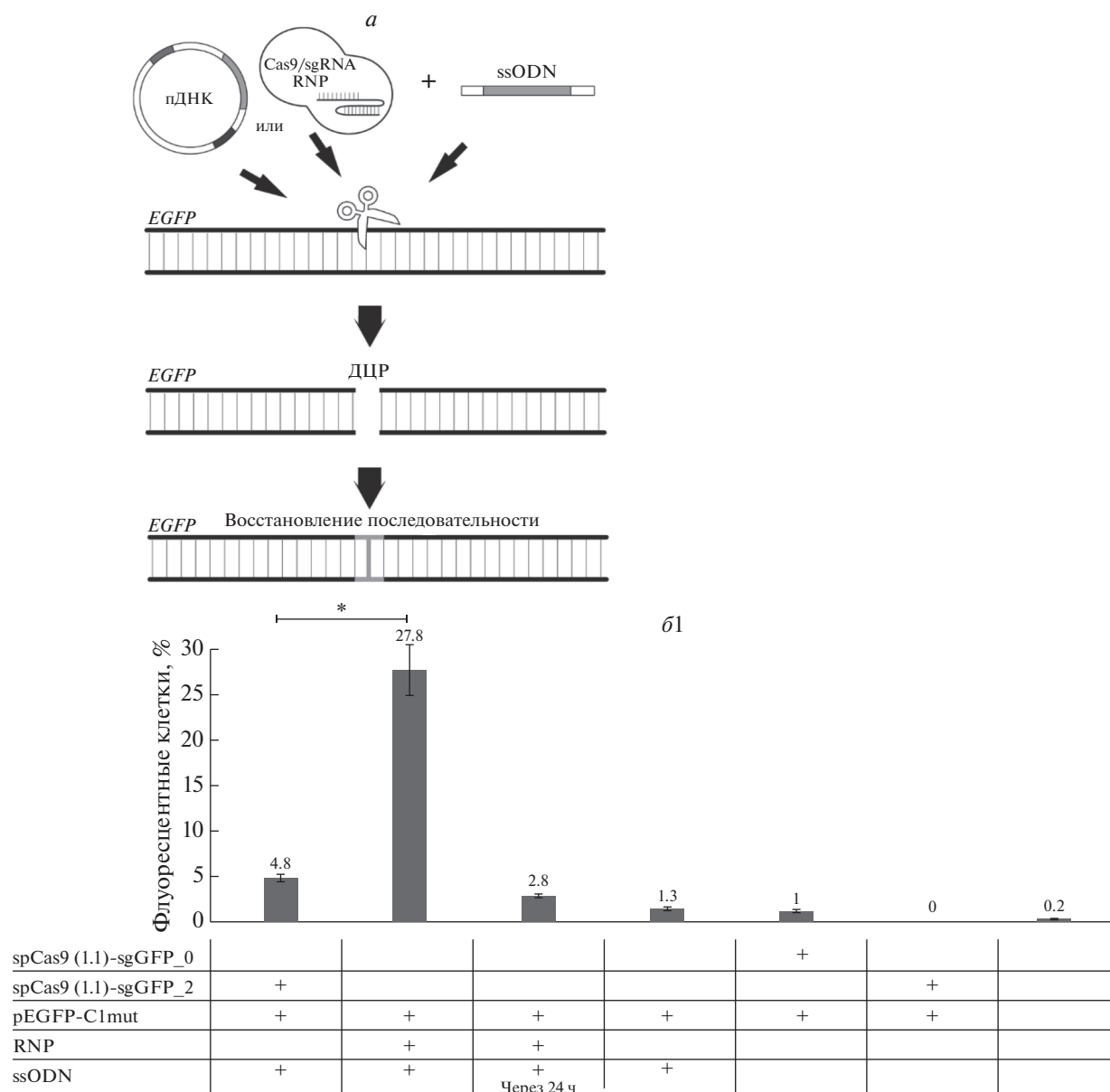


Рис. 2. *а* – схема эксперимента. Восстановление последовательности *EGFP* с использованием донорной молекулы ssODN. *б*. 1 и 2 – сравнение эффективности восстановления *EGFP*. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего (* $p < 0.05$, ** $p < 0.05$ – доставка с помощью RNP по сравнению с плазмидной доставкой). *в* – микроскопия экспериментальных лунок через 72 ч после трансфекции. *г* – секвеннограмма восстановленного *EGFP*.

ляет собой комплекс белка Cas9 с sgRNA, который формируется в пробирке и вносится в клетку уже готовым. Время жизни такого комплекса в клетке меньше, чем плазмидной ДНК, что позволяет снизить частоту неспецифического действия CRISPR–Cas9.

Кроме того, в своих работах исследователи используют не только разные способы доставки, но и разные нуклеазы [11–13]. Тогда можно предположить, что эффективность редактирования и снижение неспецифического действия варьируются именно по этой причине, независимо от спо-

соба доставки. Однако, согласно литературным данным, специфическая активность модифицированных форм нуклеаз (eSpCas9 с “повышенной специфичностью” – 1.0, 1.1, HF) сохраняется на таком же уровне, что и WT-Cas9 (дикого типа) [13]. Поэтому мы считаем, что полученные достоверные отличия при использовании как RNP, так и плазмид связаны как раз со способом доставки.

Несмотря на все достоинства RNP комплексов, существуют и особые требования в выборе материалов и стратегий для их внутриклеточной доставки. Главным образом это зависит от свой-

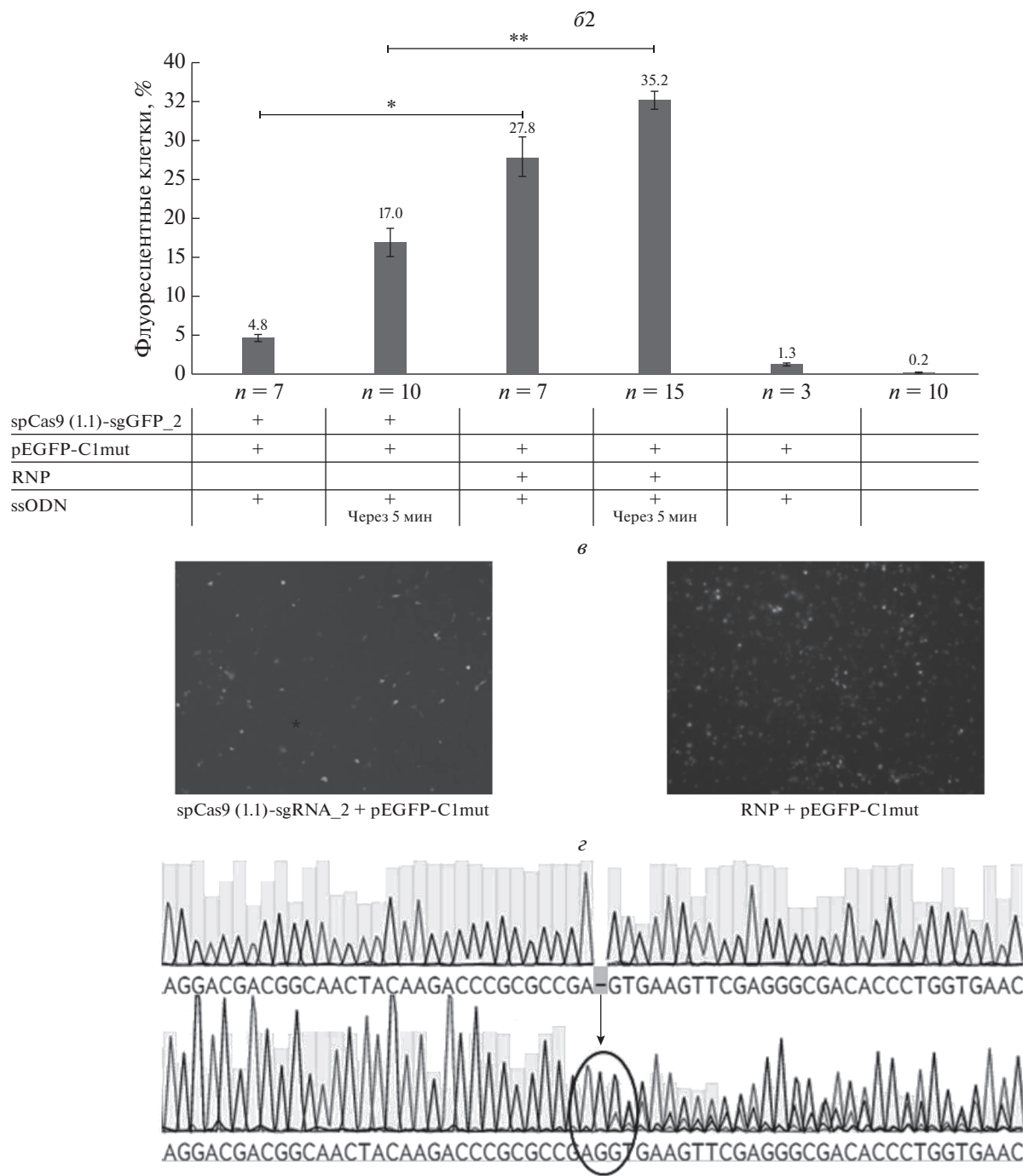


Рис. 2. Окончание

ства заряда системы — необходимо учитывать ее положительный заряд, в отличие от мРНК и пДНК. Хотя RNP могут быть доставлены в клетки млекопитающих с относительно высокой эффективностью с помощью электропорации, тем не менее липид-опосредованная трансфекция пользуется большей популярностью благодаря простоте использования, низкой стоимости и адаптации к системе с высокой пропускной способностью.

Геномное редактирование в нейронах и других неделящихся клетках имеет ряд ограничений, связанных, не только с доставкой CRISPR–Cas9, а также с невозможностью рекомбинации эндогенной ДНК с донорной молекулой. Известно, что направленная гомологичная репарация, один из механизмов репарации ДЦР, происходит лишь в фазы клеточного цикла G2/M [14]. Отсутствие митозов в клетках приводит к тому, что все ДЦР

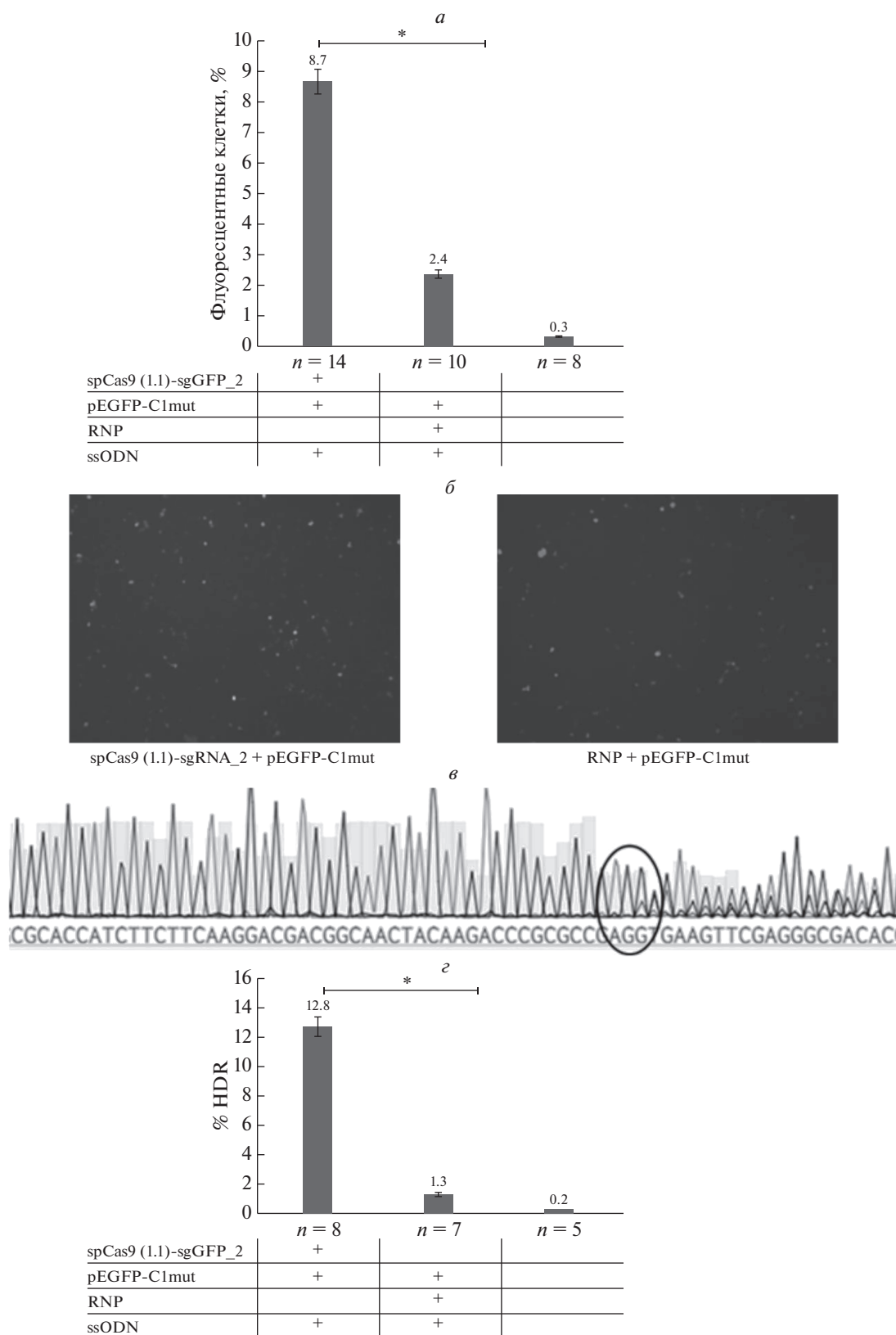


Рис. 3. *а* – сравнение эффективности восстановления *EGFP* в HEK293T-GFPmut. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего (* $p < 0.05$ – доставка с помощью RNP по сравнению с плазмидной доставкой). *б* – микроскопия экспериментальных лунок через 72 ч после трансфекции. *в* – секвенограмма GFP-положительных клеток после сортировки. *г* – результаты, обработанные с помощью TIDER (* $p < 0.05$ – доставка с помощью RNP по сравнению с плазмидной доставкой).

репарируются по другому механизму — негомолотичному соединению концов, который не позволяет встроить правильную последовательность ДНК в место разрыва. Таким образом, в нейронах можно внести инделы в таргетную область генома, что может быть использовано для нокаутирования генов. Однако коррекцию мутаций и восстановление правильной последовательности гена с помощью классического CRISPR—Cas9 в этом случае сделать не получится. Для этих целей можно использовать появившиеся недавно модификации CRISPR—Cas9 — редакторы оснований [15, 16] и праймированное редактирование [17].

Проблема эффективной доставки CRISPR—Cas9 в нейроны остается такой же актуальной, как и для других типов клеток. Данные опубликованных исследований показывают возможность и успешность доставки CRISPR—Cas9 в виде RNP в клетки мозга *in vivo*. Для этих целей RNP доставляли с помощью различных наночастиц, например, с помощью наноклубков ДНК [18], нанолентов фосфора [19], карбоксилированного разветвленного поли(β-аминоэфира) [20], а также коммерчески доступного Lipofectamine CRISPRMAX, Thermo Fisher Scientific [21]. Для этого исследования был выбран последний упомянутый способ доставки.

В своей работе мы использовали рибонуклеиновые комплексы и плазмидные векторы для трансфекции белка Cas9 и направляющей молекулы sgRNA. В результате можно увидеть, что эффективность внесения инделов в ген *EGFP* и коррекции мутации с.337delG в этом гене существенно увеличиваются при доставке CRISPR—Cas9 в виде RNP комплексов. Однако это справедливо только в случае с использованием клеточной культуры HEK293T и плазмиды для редактирования pEGFP-C1mut. Повторение эксперимента, но уже с клеточной линией HEK293T-GFPmut не показало нам значительного повышения эффективности коррекции мутации.

Подобная разница в эффективности на разных линиях создает почву для размышлений. С одной стороны, возможно влияние числа копий гена, которые редактируются: в случае с плазмидами мы имеем большое число копий на клетку и тогда здесь эффективность должна быть ниже, поскольку необходимо исправить как можно больше копий. Но при этом, чем больше копий, тем чаще происходит их “встреча” с компонентами CRISPR—Cas9. В случае исправления геномного локуса ситуация обратная — у нас нет такого большого числа копий — а значит и эффективность должна быть выше. Однако система редактирования может сталкиваться со сложной пространственной организацией геномного локуса, в отличие от более доступного локуса плазмиды. Кроме того, качество получаемых рибонуклеиновых комплексов во много определяет результат редактирования. И

тогда менее эффективное редактирование геномного локуса *EGFP* может быть связано с тем, что в работе использовалась sgRNA, синтезированная в результате *in vitro* транскрипции. Таким образом необходима дальнейшая проработка этого вопроса и оптимизация протокола трансфекции с учетом всех нюансов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эффективность коррекции однонуклеотидной делеции в гене *EGFP* в плазмидном локусе достоверно увеличивается до 35% при использовании доставки CRISPR—Cas9 в виде RNP. Полученные результаты создают основу для разработки методов коррекции мутаций, приводящих к наследственным заболеваниям человека.

БЛАГОДАРНОСТИ

Коллектив выражает благодарность к. б. н. Н.Г. Гурской из Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины Российского Национального Исследовательского Медицинского Университета им. Н.И. Пирогова, Москва, за помощь в получении клеточной культуры HEK293T-GFPmut.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ “МГНЦ”. Создание клеточной культуры HEK293T-GFPmut выполнено за счет средств гранта РФФИ № 19-29-04044.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. // Science. 2012. V. 337(6096). P. 816–821.
<https://doi.org/10.1126/science.1225829>
2. Wang M., Glass Z.A., Xu Q. // Gene Ther. 2017. V. 24. P. 144–150.
3. Liang X., Potter J., Kumar S., Zou Y., Quintanilla R., Sridharan M. // J Biotechnol. 2015. V. 208. P. 44–53.
4. Yu X., Liang X., Xie H., Kumar S., Ravinder N., Potter J. // Biotechnol Lett. 2016. V. 38. P. 919–929.
5. Mout R., Ray M., Yesilbag Tonga G., Lee Y.W., Tay T., Sasaki K. // ACS Nano. 2017. V. 11. P. 2452–2458.
6. Zuris J.A., Thompson D.B., Shu Y., Guilinger J.P., Bessen J.L., Hu J.H. // Nat. Biotechnol. 2015. V. 3. P. 73–80.
7. Liu C., Wan T., Wang H., Zhang S., Ping Y., Cheng Y. // Sci. Adv. 2019. V. 5.
8. Guan X., Luo Z., Sun W. // J. Biol. Chem. 2018. V. 293. P. 17306–17307.

9. Fu Y., Foden J.A., Khayter C., Maeder M.L., Reyon D., Joung J.K., Sander J.D. // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31(9). P. 822–826.
<https://doi.org/10.1038/nbt.2623>
10. Cradick T.J., Fine E.J., Antico C.J., Bao G. // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41(20). P. 9584–8592.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt714>
11. Kleinstiver B.P., Pattanayak V., Prew M.S., Tsai S.Q., Nguyen N.T., Zheng Z., Joung J.K. // *Nature.* 2016. V. 529(7587). P. 490–495.
<https://doi.org/10.1038/nature16526>
12. Casini A., Olivieri M., Petris G., Montagna C., Reginato G. // *Nat Biotechnol.* 2018. V. 36(3). P. 265–271.
<https://doi.org/10.1038/nbt.4066>
13. Slaymaker I.M., Gao L., Zetsche B., Scott D.A., Yan W.X., Zhang F. // *Science.* 2016. V. 351(6268). P. 84–85.
<https://doi.org/10.1126/science.aad5227>
14. Smirnikhina S.A., Anuchina A.A., Lavrov A.V. // *Hum Genet.* 2019. V. 138(1). P. 1–19.
<https://doi.org/10.1007/s00439-018-1953-5>
15. Komor A.C., Kim Y.B., Packer M.S., Zuris J.A., Liu D.R. // *Nature.* 2016. V. 533. P. 420–424.
16. Nishida K. // *Science.* 2016. V. 353.
17. Anzalone A.V., Randolph P.B., Davis J.R. // *Nature.* 2019. V. 576(7785). P. 149–157.
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4>
18. Sun W., Ji W., Hall J.M., Hu Q., Wang C., Beisel C.L., Gu Z. // *Angewandte Chemie – International Edition.* 2015. V. 54(41). P. 12029–12033.
<https://doi.org/10.1002/anie.201506030>
19. Zhou W., Cui H., Ying L., Yu X.F. // *Angewandte Chemie – International Edition.* 2018. V. 57(32). P. 10268–10272.
<https://doi.org/10.1002/anie.201806941>
20. Rui Y., Wilson D.R., Choi J., Varanasi M., Sanders K., Karlsson J., Lim M., Green J.J. // *Science Advances.* 2019. V. 5(12).
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aay3255>
21. Nouredine A., Maestas-Olguin A., Saada E.A., La-Bauve A.E., Agola J.O., Baty K.E., Howard T., Sabo J.K., Espinoza C.R.S., Doudna J.A. // *Acta Biomaterialia.* 2020. V. 114. P. 358–368.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.07.027>

CRISPR–Cas9 Delivery via the Ribonucleoprotein Complexes Increased *EGFP* Editing Efficiency

Ya. S. Slesarenko^a, A. G. Bykonya^b, A. A. Anuchina^a, M. I. Zaynitdinova^a,
N. A. Evtushenko^c, A. V. Lavrov^a, and S. A. Smirnikhina^a

^a*Federal State Budgetary Scientific Institution Research Centre of Medical Genetics, Moscow, Russia*

^b*Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia*

^c*Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine,
Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia*

The rapid development of CRISPR–Cas9 technology has already led to wide use in many areas of biological research. However a major roadblock to achieve the clinical potential of the CRISPR–Cas9 is the lack of a safe and effective delivery method this system into cells, as well as the possibility of nonspecific action. The use of direct delivery ribonucleoprotein complexes (RNP) avoid many undesirable effects and increase the efficiency of genome editing. In this work, we showed that the efficiency of single nucleotide correction in the *EGFP* gene at the plasmid locus significantly increased to 35% using RNP instead of plasmids. The results formed the basis for the development of methods of correction disease-causing genetic mutations.

Keywords: CRISPR–Cas9, genome editing, ribonucleoprotein complexes, RNP

ТОКСИЧЕСКИЕ ПОРАЖЕНИЯ ДВИГАТЕЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ

© 2021 г. М. Н. Захарова¹*, И. С. Бакулин¹, А. А. Абрамова¹

¹ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия

Поступила в редакцию 04.07.2021 г.

После доработки 06.07.2021 г.

Принята к публикации 08.07.2021 г.

Боковой амиотрофический склероз (БАС) является мультифакториальным заболеванием, в развитии которого играют роль как генетические, так и средовые факторы. В частности, влияние различных токсинов (как органических, так и неорганических соединений) может приводить к повышению риска развития БАС и ускорению прогрессирования заболевания. При воздействии некоторых токсинов описано развитие потенциально курабельных БАС-подобных синдромов, при которых может быть достигнута положительная клиническая динамика при условии проведения специфической терапии, направленной на прекращение воздействия токсического фактора. В настоящей статье рассмотрены основные виды токсинов, влияние которых приводит к поражению мотонейронов головного и спинного мозга и развитию клинической картины БАС, приведена краткая историческая справка об изучении роли токсических агентов, а также описание основных механизмов патогенеза болезни мотонейрона, связанной с их воздействием.

Ключевые слова: боковой амиотрофический склероз, болезнь двигательного нейрона, токсические факторы, латризм, конзо, цианотоксины, тяжелые металлы, аминокислоты с разветвленными боковыми цепями

DOI: 10.31857/S1027813321040166

ВВЕДЕНИЕ

Боковой амиотрофический склероз (БАС) — одно из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний, которое характеризуется относительно селективным поражением мотонейронов в коре головного мозга и спинном мозге [1, 2]. БАС является наиболее частой причиной поражения мотонейронов. Заболевание характеризуется неуклонно прогрессирующим течением и в большинстве случаев приводит к гибели пациентов через 3–5 лет после появления первых клинических проявлений [3].

Последние годы ознаменовались значительным прогрессом в области изучения молекулярно-генетических основ развития и прогрессирования нейродегенеративного процесса при БАС [4]. Описано более 20 локусов, связанных с развитием семейных и спорадических случаев БАС [5]. Охарактеризованы основные механизмы гибели мотонейронов при БАС, такие как эксайтотоксичность, оксидативный стресс, митохондриальная дисфункция, дефицит нейротрофических факторов, нарушения метаболизма РНК, конформационные изменения белков и др. [1, 6]. В отношении двух лекарственных препаратов (рилузол и эдаравон) получены дан-

ные об их способности в определенной степени замедлять прогрессирование нейродегенеративного процесса при БАС [3].

В настоящее время считается, что БАС является мультифакториальным заболеванием, в развитии которого принимает участие сложный комплекс генетических и средовых факторов [7]. В течение длительного времени различные токсины являются объектом изучения в контексте их возможного влияния на риск и прогрессирование БАС [8–11]. Интерес к этой теме обусловлен несколькими факторами. С одной стороны, описаны некоторые варианты токсического относительно селективного поражения мотонейронов, клинические отличия от БАС, но представляющего значительный интерес как модель поражения мотонейронов [9]. С другой стороны, целый ряд токсинов, оказывая воздействие на популяционном уровне, могут влиять на риск развития и прогрессирования БАС, в том числе, у генетически предрасположенных лиц [10]. Интерес к этой теме поддерживается неоднократно описанными в литературе случаями регистрации повышенной заболеваемости БАС на определенной территории, что также весьма вероятно может быть связано с действием ряда токсинов окружающей среды [11]. Наконец, при некоторых интоксикациях описаны случаи развития БАС-подобных синдромов,

* Адресат для корреспонденции: 125367 Россия, Москва, Волоколамское шоссе, д. 80; e-mail: zakharova@neurology.ru.

которые являются курабельными при проведении соответствующей терапии. Изучение роли токсических факторов в поражении мотонейронов, таким образом, представляют интерес для изучения патофизиологии нейродегенеративного процесса, разработки обоснованных мер снижения популяционного риска развития БАС и выявления потенциально курабельных случаев БАС-подобных синдромов.

ЛАТИРИЗМ И КОНЗО – КЛАССИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ ТОКСИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ МОТОНЕЙРОНОВ

К вариантам поражения мотонейронов, связь которых с действием конкретных нейротоксинов является наиболее доказанной, относятся латиризм и конзо. Оба заболевания характеризуются относительно селективным поражением верхнего мотонейрона, в связи с чем их основным клиническим проявлением является нижний спастический парапарез [9, 12].

В основе развития латиризма лежит токсическое действие оксалилдиаминопропионовой кислоты (β -ODAP, β -оксалиламиноаланин), которая содержится в растениях рода Чина (*Lathyrus*) семейства Бобовые [13, 14]. Латиризм известен с античных времен и является, вероятно, первым известным человечеству нейротоксическим заболеванием. Уже в 1671 г. герцог Вюртенберга запретил употреблять в пищу горох из-за его способности вызывать паралич ног. В странах Европы, Африки и Азии неоднократно наблюдались вспышки данного заболевания в неурожайные годы или в период войн, когда резко возрастало употребление в пищу семян чины. На известной гравюре Франсиско Гойя “Слава горошку”, написанной 1808 году во время голода в Мадриде после вторжения войск Наполеона, изображены группы людей, которые едят кашу из гороха, и женщина с предполагаемыми признаками латиризма [15]. А.Я. Кожевников описал более 100 случаев заболевания, сходного с латиризмом, во время эпидемии 1881–1882 гг. в Саратовской области [16]. И.Н. Филимонов, вероятно, первым в мире в 1920-х годах выполнил патоморфологическое исследование нервной системы пациента, страдающего в течение нескольких десятилетий от латиризма и умершего от острого лейкоза [15]. Крупные вспышки латиризма регистрировались в ряде стран Европы во время Второй мировой войны. В последние годы вспышки латиризма регистрировались в Индии, Бангладеш и Эфиопии [17]. Например, в Эфиопии вспышка латиризма произошла в 1995–1997 годах с общим числом заболевших более 2000 человек [18].

В большинстве случаев латиризм начинается с продромального периода, для которого характерны спазмы в мышцах ног, парестезии в ногах и учащенное мочеиспускание. Затем достаточно

остро развивается симметричный нижний спастический парапарез разной степени выраженности, который имеет непрогрессирующее течение, но в то же время является практически необратимым. Другие нарушения в отсроченный период для латиризма не характерны. Заболевание несколько чаще развивается у мужчин молодого возраста [9, 15].

Диагностические критерии латиризма включают следующие пункты: 1) употребление *Lathyrus sativus* или другого нейротоксичного вида чины как минимум за 2 нед. до развития симптоматики; 2) симметричный спастический нижний парапарез с увеличением сухожильных рефлексов с ног, могут выявляться клонусы и рефлекс Бабинского; 3) отсутствие чувствительных нарушений; 4) отсутствие признаков поражения черепных нервов, мозжечка и когнитивных нарушений [9].

Основными механизмами токсического действия β -ODAP являются эксайтотоксичность, индукция окислительного стресса и митохондриальной дисфункции [11, 19–22]. Под эксайтотоксичностью понимают повреждение нейронов, вызванное чрезмерной или длительной стимуляцией рецепторов глутамата, приводящей к увеличению внутриклеточной концентрации кальция. Эксайтотоксичность в настоящее время рассматривается как один из ведущих механизмов патогенеза нейродегенеративных заболеваний, в том числе, БАС [23–25]. Мотонейроны являются особо восприимчивыми к эксайтотоксическому повреждению в связи с высоким уровнем экспрессии AMPA (α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота) рецепторов глутамата, а также низкой экспрессией кальцийсвязывающих белков. Показано наличие нескольких механизмов эксайтотоксического действия β -ODAP [20]: 1) данное вещество вследствие структурного сходства с глутаматом может выступать как агонист AMPA рецепторов, что было выявлено в условиях как *in vitro*, так и *in vivo* на различных моделях; 2) β -ODAP оказывает ингибирующий эффект на Na^+ -зависимый переносчик глутамата, что приводит к дополнительному увеличению внеклеточной концентрации данного медиатора (так называемая глутаматергическая петля); 3) β -ODAP может выступать в качестве субстрата для цистин/глутаматного транспортера, также способствуя увеличению внеклеточной концентрации глутамата [26]. Установлена способность β -ODAP увеличивать продукцию активных форм кислорода и ингибировать активность каталазы, глутатионпероксидазы и цистатионин-гамма-лиазы [27, 28]. Кроме того, β -ODAP ингибирует активность НАДН-дегидрогеназного комплекса (митохондриальный комплекс I) [29]. На роль оксидативного стресса указывают данные о протективном действии метионина и цистеина на модели β -ODAP-индуцированного повреждения мото-

нейронов [20]. Следует также отметить, что риск развития латиризма снижается при одновременном употреблении продуктов, богатых серосодержащими аминокислотами [30]. Важное значение в патогенезе латиризма также может иметь нарушения гомеостаза митохондриального кальция [31].

Как и в случае латиризма, основным клиническим проявлением конзо является нижний спастический парапарез [32, 33]. Данное заболевание впервые было описано в Демократической Республике Конго (ДРК). Название заболевания переводится как “связанные ноги” (слово “конзо” используется одним из племен ДРК для обозначения амулета, использующегося для ослабления ног животных во время охоты) [34]. Кроме ДРК, которая остается основным центром распространения конзо, вспышки данного заболевания описаны во многих других странах Африки, расположенных к югу от Сахары, включая Мозамбик, Танзанию, Анголу, Камерун, Замбию, Центральнуюафриканскую республику и другие [34–38].

Считается убедительно доказанным, что причиной возникновения конзо является употребление недостаточно обработанного маниока (*Mánihot esculénta*) — растения семейства Молочайные. Маниок является основным источником питания населения ряда стран Африки, при этом особенно значимой роль этого засухоустойчивого растения становится при ухудшении агроэкологических или социальных условий (засуха, гражданские войны и др.). Это обуславливает особенности эпидемиологии конзо — возникновение в виде вспышек, хотя регистрируются и отдельные спорадические случаи заболевания [39–41]. Точная эпидемиология конзо остается неизученной. Считается, что суммарно в разных странах Африки от этого заболевания могут страдать сотни тысяч человек, при этом в некоторых сельских районах частота встречаемости заболевания может достигать 5%. Болеют взрослые (чаще женщины детородного возраста) и дети старше 3 лет [9, 34].

Ядром клинической картины конзо является остро возникающий непрогрессирующий и необратимый нижний спастический парапарез. В дебюте заболевания могут возникать обратимые чувствительные нарушения в ногах (парестезии, боль). Как правило, в течение нескольких дней происходит стабилизация состояния без последующего нарастания, в исходе — формируется нижний спастический парапарез разной степени выраженности. В тяжелых случаях описано развитие спастического тетрапареза в сочетании с признаками псевдобульбарного синдрома. Для пациентов, которые сохраняют способность к передвижению, весьма характерна походка со скрещенными ногами (в виде “ножниц”). В наиболее легких случаях симптоматика в резидуальном периоде ограничивается спастичностью в ногах при ходьбе и беге. В

отдельных случаях описаны признаки двусторонней оптической невропатии, глазодвигательные нарушения (в частности, маятниковый нистагм) [34, 42, 43]. Необходимо отметить, что до настоящего времени эффективные методы лечения конзо отсутствуют.

Критерии диагностики конзо были определены ВОЗ: 1) наличие временной связи с употреблением маниока как основного продукта питания; 2) внезапное начало (прогрессирование менее 1 недели) и непрогрессирующее течение слабости в ногах у ранее здорового человека; 3) симметричная спастичность в ногах при ходьбе или беге; 4) двустороннее повышение сухожильных рефлексов с ног без признаков заболевания позвоночника и спинного мозга [34].

Кроме конзо, употребление маниока может также приводить к развитию тропической атаксической невропатии, которая проявляется медленно прогрессирующей сенсорной полиневропатией, сенситивной атаксией, двусторонней оптической невропатией и сенсоневральной тугоухостью и встречается преимущественно в пожилом возрасте [41, 44].

Согласно доминирующей гипотезе, развитие конзо связано с токсическим действием цианидов, которые содержатся в маниоке [9, 34, 36, 44, 45]. По данным токсикологических исследований, основное значение в патогенезе конзо играют метаболиты линамарина — цианогенного гликозида маниока, в частности, цианид (митохондриальный токсин), тиоцианат (АМРА хаотропный агент) и цианат (токсин двигательной системы) [36]. У пациентов с конзо было выявлено увеличение концентрации тиоцианата (SCN (—)) — основного метаболита цианидов — в сыворотке крови и моче [46]. Основным механизмом повреждения мотонейронов при конзо, вероятно, является индукция окислительного стресса и карбамилирование белков [34, 47]. Токсический эффект линамарина и цианата воспроизведен в серии экспериментальных работ на разных животных [36, 48]. Наибольший интерес представляет работа, выполненная с использованием модели хронической интоксикации цианатом на макаках резус, в которой было показано развитие сходной с конзо клинической картины (внезапное развитие тетрапареза), а при проведении патоморфологического исследования выявлены структурные изменения клеток Беца, передних рогов спинного мозга и базальных ганглиев [49]. Следует также отметить гипотезу, согласно которой и латиризм, и конзо могут быть вызваны нитрилами, содержащими цианогруппы, которые выявлены в составе как чины, так и маниока [50]. Риск развития заболевания увеличивается при недостаточном поступлении с пищей серосодержащих аминокислот, которые участвуют в опосредованном роденазой превращении цианида в водораствори-

мый и менее токсичный тиоционат, экскретируемый с мочой [9].

L-BMAA

В 1945 г. Н. Zimmerman, служивший в качестве военного врача в Военно-морских силах США, описал кластер с высокой распространенностью болезни двигательного нейрона среди коренного населения чаморро острова Гуам [51]. Проведенное в 1954 году первое эпидемиологическое исследование среди жителей острова подтвердило, что распространенность заболевания, клинически схожего с боковым амиотрофическим склерозом, среди коренного населения острова Гуам в 100 раз превышало средние общемировые показатели [52]. При этом особенно высокая распространенность заболевания наблюдалась в отдельных деревенских поселениях: так, в деревне Уматас (Umatas) она достигала 273 человека в пересчете на 100 тысяч населения [53]. Одновременно среди чаморро было отмечено большое число случаев синдрома паркинсонизма, развивавшегося в зрелом возрасте, часто сопровождавшегося отчетливыми когнитивными нарушениями, достигающими степени деменции. Случаи синдрома паркинсонизма—деменции нередко встречались в тех же семьях, где уже наблюдались случаи развития БАС; иногда оба синдрома развивались у одних и тех же людей. В 1961 г. Asao Hirano и соавт. дали заболеванию название “комплекс БАС—паркинсонизм—деменция” [54]. Заболевание также получило название болезни литико-бодига; на местном диалекте “литико” соответствовало фенотипу с прогрессирующей мышечной слабостью, клиническая картина которой была схожа с классической формой бокового амиотрофического склероза; “бодиг” отражало развитие подкорковой дегенерации с синдромом паркинсонизма [55].

Дебют клинической картины заболевания в большинстве случаев начинался с развития прогрессирующей мышечной слабости, более выраженной в дистальных отделах рук и ног, оживления сухожильных и периостальных рефлексов. В дальнейшем развивалась распространенная гипотрофия мышц конечностей, бульбарные нарушения и псевдобульбарный синдром, повышение тонуса в конечностях преимущественно по пластическому типу, гипокинезия, тремор покоя, формировались согбенная поза и замедленная походка. Летальный исход чаще всего был вызван прогрессирующей дыхательной недостаточностью вследствие гипотрофии скелетной мускулатуры [56].

Несмотря на существенное преобладание мужчин среди заболевших, медико-генетических анализ пациентов и членов их семей позволил в скором времени полностью исключить генетическую причину как ведущий этиологический фактор

развития заболевания. Кроме того, заболевание развивалось не только у народности чаморро, но и у приехавших извне жителей острова, несмотря на несколько меньшие показатели заболеваемости среди иммигрантов. В исследовании С. Plato и соавт. был проведен анализ всех зарегистрированных случаев заболеваемости БАС и/или комплексом “паркинсонизм—деменция” среди жителей острова Гуам в период с 1958 по 1999 г. ($n = 135$); было показано, что риск заболевания несколько выше у родственников больных, чем у остального населения, чьи родственники клинически здоровы [57].

Употребление в пищу большого количества муки, приготовленной из плодов пальм саговника *Cycas micronesica*, было предложено в качестве ключевого этиологического фактора развития комплекса “БАС—паркинсонизм—деменция” [58]. Была высказана гипотеза, что несмотря на многоэтапный процесс обработки семян саговника, в них сохраняются нейротоксические факторы, которые могут накапливаться в организме человека при регулярном употреблении муки в пищу. В 1950-е гг. было показано, что семена саговника содержат сильный яд циказин, однако исследование его биологических эффектов на животных моделях не привели к установлению какой-либо связи между ним и болезнью литико-бодига [52].

В 1967 г., вскоре после установления связи между другим БАС-подобным синдромом — латитизмом — и употреблением в пищу нейротоксических соединений (L-BOAA), содержащихся в зернобобовых растениях из рода Чина, биохимик Arthur Bell и соавт. обнаружили в семенах саговника другой токсин — L-BMAA (бета-N-метил-амино-L-аланин) [52]. Тем не менее, в первых экспериментальных исследованиях было продемонстрировано, что содержание свободного L-BMAA в муке из саговника не сопоставимо с концентрациями, обладающими токсическим эффектом, в связи с чем гипотеза об этиологической роли L-BMAA была отвергнута [52]. Дальнейшие исследования показали, что в муке из саговника действительно содержатся высокие концентрации формы L-BMAA, связанной с белком; при этом в зонах наибольшей заболеваемости комплексом БАС—паркинсонизм—деменции концентрации L-BMAA в муке являются наибольшими [59]. Противоречивость данных о содержании L-BMAA в тканях биологических организмов во многом связана с использованием различных аналитических методов определения концентрации этого вещества, а также его метаболитов [60, 61].

Другим возможным путем попадания L-BMAA в организм человека является употребление в пищу народностью чаморро мяса летучих лисиц, выкармливающихся на семенах саговника. Концентрация L-BMAA преимущественно в жировой ткани летучих лисиц могла значительно

превышать таковую в готовой муке за счет механизма накопления в пищевой цепочке. Употребление мяса летучих лисиц в пищу являлось неотъемлемой частью культурных традиций коренного населения, что даже привело к вымиранию одного из их видов (*Pteropus tokudae*) и резкому сокращению численности ряда других. Дальнейшее снижение частоты употребления в пищу летучих лисиц коренным населением, наиболее вероятно, привело к существенному спаду заболеваемости комплексом “БАС—паркинсонизм—деменция” [61]. С большой вероятностью L-ВМАА накапливался в организмах и других животных, питающихся семенами саговника, чье мясо употребляло в пищу коренное население [62, 63].

В ходе проведенных впоследствии эпидемиологических исследований было показано, что заболеваемость комплексом БАС—паркинсонизм—деменции постепенно снижается [64]; тем не менее, случаи заболевания продолжают регистрироваться и по настоящее время, хотя распространенность изолированного фенотипа БАС значительно снизилась, а средний возраст дебюта заболевания стал выше [65]. При исследовании всего населения острова Гуам в 2000-е гг. была выявлена высокая распространенность деменции среди лиц старше 65 лет, однако в преобладающем большинстве случаев у больных наблюдалась классическая деменция альцгеймеровского типа [66].

Первые патоморфологические исследования подтвердили наличие у заболевших в ткани головного мозга скоплений нейрофибриллярных клубков, аналогичных таковым при болезни Альцгеймера; при этом у пациентов с изолированным фенотипом БАС (без синдрома паркинсонизма и выраженных когнитивных нарушений) их количество было несколько меньше [67]. Кроме того, в мозге больных было выявлено большое количество скоплений белка TDP-43 ((TAR)-DNA-binding protein 43) в нейронах и глиальных клетках. Функции этого белка включают подавление транскрипции и регулирование сплайсинга; на сегодняшний день TDP-43-позитивные включения в нейронах описаны при различных вариантах лобно-височной деменции, а также при классическом БАС [68]. Гипотеза об этиологической роли L-ВМАА была подтверждена обнаружением этого нейротоксина в ткани головного мозга пациентов с синдромом БАС-паркинсонизма и классическим БАС, проживавших на острове Гуам и в Канаде; это наблюдение также является подтверждением феномена накопления (биомагнификации) токсина в пищевой цепочке, приводящего к существенному повышению концентрации попадающего алиментарным путем в организм человека L-ВМАА [69, 70].

В 2003 г. было обнаружено, что L-ВМАА могут выделять цианобактерии рода *Nostoc*, живущие в

качестве симбионтов на корнях саговника. В ходе дальнейших исследований было показано, что L-ВМАА могут продуцировать практически известные виды цианобактерий — как свободноживущие, так и симбионты [69, 71]. При этом концентрации вырабатываемого ими L-ВМАА являются крайне низкими, накапливаясь в организмах более высоких уровней пищевой цепи, начиная с зоопланктона [71]. Это открытие позволило предположить, что другие локальные вспышки заболеваемости БАС по всей планете могут быть также вызваны высоким содержанием цианобактерий, продуцирующих L-ВМАА, в питьевой воде и/или продуктах питания [52, 72]. Эвтрофикация и ряд других процессов, обусловленных климатическими изменениями, приводят к повышению популяции цианобактерий в природных водоемах, что в свою очередь может быть причиной роста общемировой заболеваемости боковым амиотрофическим склерозом [60, 63, 70].

За открытием продукции L-ВМАА цианобактериями последовало проведение ряда исследований, направленных на изучение концентраций L-ВМАА в водоемах по всему миру, густонаселенных различными видами цианобактерий. Так, очаги повышенного содержания L-ВМАА были описаны в природных водоемах Великобритании, Дании, во Флоридском заливе в США, пустыне Гоби в Монголии [52].

Были неоднократно предприняты попытки связать повышенный уровень L-ВМАА в источниках питьевой воды с высокой распространенностью БАС среди населения соответствующей географической местности. Так, описан кластер с повышенной заболеваемостью БАС (более чем в 25 раз по сравнению с другими штатами) около озера Маскома в штате Нью-Гэмпшир (США), при этом в воде озера и тканях рыб, обитающих в нем, были зарегистрированы высокие концентрации L-ВМАА [73].

Отдельного внимания заслуживает планируемое к проведению крупное эпидемиологическое исследование, охватывающее население трех регионов Франции (т.н. Французская программа ВМААLS). В ходе его выполнения будут проанализированы географические области с повышенной заболеваемостью БАС, с применением среди населения опросника, включающего особенности приема пищевых продуктов, используемых источников питьевой воды и воды для полива. Будут исследованы уровни L-ВМАА в биобразцах овощей и фруктов, произрастающих в данной местности, питьевой воды и воды, используемой для полива растений; кроме того, будут проведены гистохимические исследования тканей головного мозга пациентов со sporadическим БАС, живших в данной местности, с целью

исследования содержания L-ВМАА и его метаболитов [60].

Существует несколько теорий в отношении механизмов нейротоксичности L-ВМАА. Во-первых, L-ВМАА является не только агонистом глутаматных NMDA-рецепторов, но и в низких концентрациях приводит к селективному повреждению двигательных нейронов вследствие активации AMPA и каинатных рецепторов [70, 71, 74]. Во-вторых, L-ВМАА оказывает воздействие на функционирование цистин-глутаматного антипортера (так называемая xc-транспортная система), что приводит к индукции оксидативного стресса и повышению концентрации внеклеточного глутамата [75]. В-третьих, L-ВМАА может встраиваться в структуру белков, заменяя L-серин, что приводит к нарушению фолдинга и дальнейшей агрегации белков — известного механизма патогенеза ряда нейродегенеративных патологий [76, 77]. Кроме того, воздействие L-ВМАА может приводить к накоплению нерастворимого белка TDP-43, агрегация которого в тканях центральной нервной системы наблюдается у пациентов с БАС [78]. Еще одним механизмом нейротоксического действия L-ВМАА может являться индукция секреции провоспалительных цитокинов вследствие активации NLRP3-инфламмосомы (nucleotide-binding domain (NOD)-like receptor protein 3) [79].

Существует предположение, что при попадании в желудочно-кишечный тракт L-ВМАА оказывает двойное негативное воздействие: во-первых, проникает в нейроны энтеральной нервной системы, приводя к митохондриальной дисфункции; во-вторых, попадая в организованную лимфоидную ткань слизистых оболочек пищеварительного тракта, способствует гиперактивации структур иммунной системы, поддерживая хроническое воспаление в полости кишечного тракта, что также может приводить к провокации процессов нейродегенерации по оси “мозг—кишечник” (brain-gut axis) [80].

Показано, что L-ВМАА может являться звеном патогенеза других нейродегенеративных патологий, в том числе болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и пигментной ретинопатии [60]. Предполагается, что L-ВМАА, проникая через гематоэнцефалический барьер, взаимодействует с нейромеланином черной субстанции и голубого пятна, что может лежать в основе развивающегося синдрома паркинсонизма [81]. Интересно, что у части больных с комплексом “БАС—паркинсонизм—деменция” с острова Гуам отмечалось развитие специфической ретикулярной пигментной эпителиопатии, иногда предшествующей основным симптомам заболевания, что также может быть обусловлено прямым воздействием L-ВМАА на нейромеланин ретикулярного пигментного эпителия [55].

Нейротоксичность L-ВМАА была показана в том числе на нейрональных клеточных культурах, приводя к дегенерации и клеточной гибели [82]. Прямое воздействие L-ВМАА на структуры центральной нервной системы у мышей также приводило к гибели нейронов, расположенных в гиппокампе [83]. Введение L-ВМАА животным моделям приводит к формированию различных анатомических аномалий развития структур центральной нервной системы и нарушениям их нормального функционирования, в том числе гипервозбудимости, проявляющейся миоклониями и судорогами. У птиц описано развитие вакуолярной миелопатии, у грызунов — классической клинической картины болезни двигательного нейрона [84–86]. Продолженное интратекальное введение L-ВМАА (на протяжении 30 дней) крысам приводило к дегенерации двигательных нейронов передних рогов спинного мозга, астроглиозу и накоплению белковых агрегатов TDP-43 [87]. В целом, воздействие L-ВМАА даже на ранних стадиях развития животных оказывает долговременные эффекты не только на развитие и нормальное функционирование структур нервной системы, но и на системный энергетический метаболизм, приводя к развитию митохондриальной дисфункции во многих тканях [88]. Таким образом, из-за длительного латентного периода между первым попаданием L-ВМАА в организм и дебютом симптомов заболевания его можно отнести к так называемым “медленным токсинам”: развитие клинической картины синдрома БАС—паркинсонизм—деменции, наиболее вероятно, возможно лишь при условии длительного воздействия L-ВМАА на организм [77, 89].

ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ

В течение длительного времени интенсивно изучается возможная роль тяжелых металлов в патогенезе БАС и других нейродегенеративных заболеваний [10, 90, 91]. Исследования в этой области можно разделить на три основных направления. В ряде работ на больших выборках проводился анализ ассоциации между воздействием тяжелых металлов как факторов окружающей среды и риском развития БАС на популяционном уровне. Данное направление направлено на определение роли тяжелых металлов в качестве факторов риска развития и прогрессирования БАС как мультифакториального заболевания. Второе направление исследований связано с описанием отдельных клинических наблюдений, в которых развитие клиники БАС было по времени ассоциировано с подтвержденной интоксикацией. Данные наблюдения, несмотря на их редкость и часто отсутствие убедительной каузальной связи между воздействием металла и развитием заболевания, представляют большой практический интерес, особенно в случаях, когда

удается добиться регресса или стабилизации симптомов. Наконец, третье направление исследование связано с изучением механизмов нейротоксического эффекта тяжелых металлов в условиях *in vitro* и *in vivo* на различных моделях. Среди тяжелых металлов наибольшее количество исследований было посвящено возможной связи между развитием БАС и воздействием свинца и ртути.

Свинец. В отличие от многих других металлов, свинец не обладает естественными биологическими функциями в организме человека, однако легко накапливается как при остром, так и при хроническом воздействии [92]. Даже в низких дозах свинец обладает повреждающим воздействием на многие органы и системы, включая костную ткань, скелетные мышцы, сердце, печень и почки, иммунную и нервную системы [93–96]. Кроме того, свинец является достаточно хорошо изученным канцерогеном. До настоящего времени свинец широко используется во многих областях промышленности, что определяет риск как развития острых отравлений, так и хронического воздействия свинцом, содержащимся в воздухе, воде и почве [92].

Связь между воздействием свинцом и риском БАС выявлена во многих исследованиях (см., например, [97–101]), а также подтверждена в нескольких метаанализах [102–104]. В одном из метаанализов показано, что риск развития БАС увеличивается примерно в 2 раза при профессиональном воздействии свинца в анамнезе, при этом приблизительно 5% случаев БАС могут быть связаны с воздействием свинцом [102]. Важно отметить, что наибольшее значение имеет свинец как профессиональный (производственный) фактор [92].

Свинец легко проникает через гематоэнцефалический барьер и накапливается в нейронах и глиальных клетках. У пациентов с БАС наблюдается статистически значимое увеличение концентрации свинца в сыворотке крови и цереброспинальной жидкости [92, 98]. Свинец обладает плеотропным токсическим эффектом. Большое значение имеет его энзимопатический эффект, обусловленный связью с сульфгидрильными группами и ингибированием активности ряда ключевых ферментов [94, 105]. В частности, свинец ингибирует активность дегидратазы 5-аминолевулиновой кислоты, что приводит к нарушению образования гема [96]. Кроме того, свинец может замещать двухвалентные катионы (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+}) в составе белковых молекул [106]. Еще одним хорошо изученным механизмом токсического действия свинца является индукция окислительного стресса [107].

В нескольких экспериментальных исследованиях показано, что интоксикация свинцом может вызывать дегенерацию мотонейронов спинного мозга, поражение аксонов периферических мото-

нейронов и скелетных мышц [108]. В контексте изучения роли свинца в развитии БАС большое значение имеют результаты исследования Р.Е.А. Ash и соавт. [109]. В этой работе на модели БАС у мышей изучалась способность 91 потенциального нейротоксина индуцировать формирование TDP-43-содержащих включений — одного из ключевых патоморфологических признаков БАС. Среди всех протестированных молекул такая способность была выявлена только у ацетата свинца и хлорида метилртути [109].

Среди потенциальных механизмов токсического действия свинца на мотонейроны также обсуждается возможность его влияние на укладку металлосодержащих белков. Свинец может увеличивать экспрессию мРНК *SOD1* [110], таким образом, потенциально влияя на накопление молекул данного белка с аномальной конформацией. Это может быть одним из механизмов влияния свинца на развитие БАС у генетически предрасположенных лиц [103].

Следует отметить, что свинец при БАС может оказывать и парадоксальный эффект. В частности, было показано, что при развитии заболевания содержание свинца в крови и костной ткани положительно коррелирует с выживаемостью [111, 112]. Это может быть связано с увеличением экспрессии под действием свинца фактора роста эндотелия сосудов, хотя обсуждается роль и других факторов [10, 103, 111].

Наиболее хорошо изученным вариантом поражения нервной системы при интоксикации свинцом является периферическая нейропатия. Ее характерной особенностью является асимметричность и преимущественное поражение моторных волокон, при этом чаще всего вовлекаются разгибатели пальцев кистей и разгибатели запястья. В тяжелых случаях возможно развитие тетраплегии. По данным электронейромиографии (ЭНМГ) выявляется аксональная моторная, реже — сенсорная невропатия. Могут наблюдаться признаки системного поражения — микроцитарная гипохромная анемия с нормальным уровнем железа в сыворотке и базофильной зернистостью эритроцитов, схваткообразные боли в животе, признаки поражения почек, артериальная гипертензия, а также признаки так называемой свинцовой энцефалопатии (когнитивные и поведенческие нарушения, эпилептические приступы, атаксия) [113]. В литературе представлено несколько клинических наблюдений развития БАС-подобных синдромов при подтвержденной интоксикации свинцом. В 1968 г. был представлен случай БАС-подобного синдрома с клиникой смешанного тетрапареза и регрессом симптоматики после проведения хелатной терапии [114]. Описан случай развития интоксикации свинцом вследствие вдыхания паров расплавленного свинца с ритуальной целью, при ко-

тором в клинической картине наблюдался прогрессирующий в течение одного года верхний атрофический парапарез с сохраненными сухожильными рефлексами. Стоит отметить, что в данном случае у пациентки также были выявлены когнитивные нарушения и признаки системного поражения (базофильная зернистость эритроцитов и боль в животе). Через 4 мес. после прекращения ритуала было отмечено восстановление силы в руках и регресс когнитивных нарушений [115]. Еще в одном наблюдении у пациентки на фоне системных проявлений (общая слабость, рвота, боль в животе, анемия и артериальная гипертензия) развились два генерализованных тонико-клонических эпилептических приступа, а через несколько месяцев – прогрессирующий вялый тетрапарез и бульбарный синдром с нейрональными изменениями на ЭНМГ. Увеличение концентрации свинца было выявлено в крови и моче. После проведения терапии ЭДТА IV и DMPS был отмечен практически полный регресс симптоматики, однако через некоторое время у пациентки развился двусторонний паралич лучевых нервов и было вновь выявлено увеличение содержания свинца. Тогда был определен источник поступления свинца в организм – крем для губ, содержащий 13.4% Pb [116]. Клиническими особенностями представленных наблюдений является изолированное поражение нижних мотонейронов, а также наличие системных проявлений, которые играют важнейшую роль в постановке правильного диагноза.

РТУТЬ И ЕЕ СОЕДИНЕНИЯ

Метилртуть является одним из наиболее изученных нейротоксинов. Первые случаи отравления метилртутью, в том числе с летальным исходом, были описаны еще в 1866 г. у химиков, спустя всего несколько лет после первого синтеза данного соединения. В XX веке метилртуть стала использоваться в качестве фунгицида, что привело к увеличению промышленного производства данного соединения. В 1930-х годах были представлены первые описания клинической и патоморфологической картины отравления метилртутью у работников заводов [117]. Необходимо отметить, что с точки зрения токсикологии метилртуть представляет особую проблему в связи со способностью накапливаться в пищевых цепочках. В природной среде метилирование ртути происходит главным образом в водной среде в результате биохимических, химических и фотохимических процессов. В дальнейшем метилртуть накапливается в моллюсках и рыбах, употребление которых в пищу может вызывать отравление человека и животных [118].

Известны 2 крупных катастрофы, связанных с отравлением большого количества людей метил-

ртутью. В 1956 г. в Японии на побережье залива Минаматы было зарегистрировано более 2000 случаев тяжелого поражения нервной системы в результате отравления метилртутью. Причиной катастрофы стал сброс большого количества неорганической ртути в воду залива местным заводом компании “Chisso”. Неорганическая ртуть перерабатывалась донными микроорганизмами в метилртуть, которая накапливалась по пищевой цепочке и поступала в организм людей с рыбой и моллюсками. Основные проявления заболевания, названного болезнью Минаматы, включали чувствительные нарушения (парестезии и гипестезии по полиневритическому типу), концентрическое сужение полей зрения, снижение слуха, атаксию, эпилептические приступы, речевые нарушения, психические нарушения и др. Были описаны выраженные эффекты пренатального воздействия метилртути (тяжелая задержка психического развития, двигательные нарушения и др.). Официальное число погибших в результате этой катастрофы составило 1043 человека [117, 119, 120]. Второй случай массового отравления метилртутью произошел в Ираке в 1973 г. и был связан с употреблением в пищу партии отравленного метилртутью зерна, не предназначенного для продажи. В результате заболело более 6000 человек и умерло 452 человека [121]. После этого сообщалось об еще нескольких не столь массовых и тяжелых случаях отравления метилртутью, например, в Бразилии у жителей, занятых рыбной ловлей [122].

Метилртуть обладает сложным и многокомпонентным нейротоксическим эффектом. Считается, что наибольшее значение имеют 3 компонента токсического действия метилртути: 1) повышение внутриклеточной концентрации кальция; 2) индукция окислительного стресса; 3) взаимодействие с сульфгидрильными группами с формированием тиолсодержащих комплексов [117]. В серии экспериментальных исследований показано увеличение при воздействии метилртутью внутриклеточной концентрации кальция, которое происходит как за счет его выхода из внутриклеточных депо, так и поступления в клетку извне [123–125]. Последний механизм может реализовываться в том числе посредством активации метилртутью NMDA рецепторов глутамата, а также за счет изменения функциональных свойств этих рецепторов вследствие взаимодействия метилртути с их сульфгидрильными группами [117]. Одним из последствий увеличения внутриклеточной концентрации кальция является индукция окислительного стресса [126, 127]. На моделях отравления метилртутью выявлено увеличение образования супероксида, перекиси водорода и периксинитрита [128, 129]. Для развития окислительного стресса также имеет значение снижение доступности глутатиона за счет связывания метилр-

тути с его сульфгидрильными группами [130, 131]. Подтверждением значимости описанных выше механизмов является возможность уменьшения выраженности токсического эффекта метилртути при использовании хелаторов кальция, блокаторов кальциевых каналов, а также различных антиоксидантов (витамин Е, селен, тиоктовая кислота и др.) [132, 133]. За счет связывания с сульфгидрильными группами метилртуть может влиять на структуру и функции ряда белков, в частности, тубулина и Na^+/K^+ -АТФ-азы [134]. Наконец, еще одним крайне значимым механизмом нейротоксического действия метилртути является индукция апоптоза по разным механизмам [117].

С точки зрения потенциального участия метилртути в патогенезе БАС особый интерес представляют данные о способности метилртути селективно накапливаться в мотонейронах спинного мозга и вызывать их дегенеративные изменения в эксперименте [135]. Кроме того, у трансгенных животных хроническое введение метилртути ускоряет начало БАС [136]. Следует также отметить и описанную выше способность метилртути индуцировать формирование TDP-43-содержащих включений в мотонейронах в экспериментальных условиях [109]. Кроме метилртути, способность вызвать поражение мотонейронов спинного мозга показана также для металлической ртути при ее ингаляционном введении [137].

Несмотря на эти данные, до настоящего времени не получено убедительных данных о связи между интоксикацией метилртутью и поражением мотонейронов. Следует также отметить противоречивые данные о связи между экспозицией различных соединений ртути и риском развития БАС по данным популяционных исследований [10]. Кроме того, анализ случаев болезни Минамата показывает, что двигательные нарушения не имеют ведущего значения в клинике интоксикации метилртутью.

В литературе представлено несколько наблюдений, в которых клиническая картина БАС развивалась после документированного отравления ртутью, при этом заболевание неуклонно прогрессировало и приводило к гибели пациентов, несмотря на проведение хелатной терапии [138–140]. В этих случаях каузальная роль метилртути является спорной, так как нельзя исключить случайность совпадения во времени отравления и начала БАС. В то же время обращает внимание, что в представленных наблюдениях клиническая картина не совсем типична для БАС. Кроме того, неэффективность хелатной терапии может быть связана с ее поздним началом после поступления ртути в организм. Особый интерес представляют несколько описанных случаев, в которых наблюдался регресс симптомов (спонтанно или после проведения хелатной терапии), что позволяет ис-

ключить БАС. Так в одном из наблюдений, C.R. Adams и соавт. [141] описали случай развития БАС-подобного синдрома после кратковременной интоксикации ртутью у работника завода со спонтанным регрессом симптомов после нормализации уровня ртути в моче. Клиническая картина заболевания была представлена выраженной астенией, снижением массы тела на 9 кг, атрофией дельтовидных и двуглавых мышц на руках и мышц бедер с наличием фасцикуляций, однако при отсутствии признаков убедительных признаков поражения верхнего мотонейрона. Описание развития клиники БАС-подобного синдрома со спонтанным регрессом симптомов была также представлено T.E. Barber [142] у двух работников завода по производству неорганической ртути. Еще в одном наблюдении представлен случай развития клиники прогрессирующей мышечной атрофии (вариант БАС), которую авторы связали с наличием ранее установленных амальгамовых пломб. После удаления пломб и проведения хелатной терапии в комбинации с селеном и тиоктовой кислотой было отмечено улучшение состояния пациента, которое сохранялось в течение 3 лет последующего наблюдения за пациентом [143]. В данном случае, однако, интоксикация ртутью не была подтверждена лабораторно. Следует также отметить представленную серию из 3 наблюдений развития клинико-нейрофизиологической картины гипервозбудимости мотонейронов с регрессом симптоматики после проведения хелатной терапии [144].

Анализируя в целом результаты проведенных исследований в этой области можно отметить, что нейротоксичность тяжелых металлов (в первую очередь свинца и соединений ртути) достаточно убедительно показана в экспериментальных исследованиях. Данные эпидемиологических исследований о связи между экспозицией тяжелых металлов и риском БАС противоречивы, однако в большинстве исследований такая связь выявлена, при этом наиболее убедительные данные были получены для свинца. Описаны отдельные случаи развития БАС-подобных синдромов после интоксикации тяжелыми металлами, однако причинно-следственную связь в каждом случае установить достаточно трудно. Необходимо отметить, что наблюдения, свидетельствующие о возможности замедления прогрессирования заболевания или регресса симптомов после проведения элиминирующей терапии, являются единичными. С нашей точки зрения, в большинстве описанных клинических наблюдений клиника является не совсем типичной для БАС. В целом интоксикация тяжелыми металлами должна рассматриваться в качестве одного из многих механизмов развития и прогрессирования нейродегенеративного процесса при БАС. Кроме того, обсуждается возможная роль тяжелых металлов в ускорении раз-

вития нейродегенеративного процесса у генетически предрасположенных лиц.

АМИНОКИСЛОТЫ С РАЗВЕТВЛЕННЫМИ БОКОВЫМИ ГРУППАМИ

Аминокислоты с разветвленными боковыми цепями (ВСАА, от англ. branched-chain amino acids) – группа протеиногенных незаменимых аминокислот (лейцин, изолейцин, валин), которые имеют разветвленную боковую алифатическую цепь [145]. ВСАА активно используются в спорте и фитнесе в качестве пищевой добавки для стимуляции роста мышц и восстановления после тренировок [146, 147]. Изначально ВСАА изучались как возможное средство для лечения БАС, однако в одном из небольших рандомизированных исследований было показано, что их применение приводит к статистически значимо более выраженному снижению жизненной емкости легких по сравнению с плацебо [148]. К настоящему времени опубликованы результаты нескольких экспериментальных работ, которые демонстрируют возможную роль ВСАА в развитии и прогрессировании БАС. В экспериментальном исследовании на культуре клеток показано, что высокие концентрации ВСАА обладают нейротоксическим эффектом и усиливают эксайтотоксичность. Показано, что этот эффект ВСАА наблюдается только в отношении культуры корковых нейронов, но не нейронов гиппокампа, и связан с усиленной стимуляцией NMDA рецепторов глутамата [149]. В исследовании на C57Bl/6J мышях показано, что добавление к рациону ВСАА (в дозах, эквивалентных применению у человека) сопровождается снижением экспрессии генов ряда антиоксидантных ферментов и увеличением экспрессии генов некоторых переносчиков кислорода [150]. Еще в одном исследовании показано, что ВСАА вызывает гиперактивность и снижает болевой порог у мышей дикого типа, а у мышей с мутацией G93A *SOD1* увеличивает двигательный дефицит и приводит к нарушению синаптической пластичности [151]. В исследовании, проведенном I. Carunchio и соавт. [152], было показано, что у мышей диета, обогащенная ВСАА, приводит к возникновению гипервозбудимости корковых мотонейронов (феномен, характерный для БАС), при этом данный эффект, вероятно, связан с увеличением персистирующего натриевого тока (INaP). Сходные нейрофизиологические изменения характерны для мышей с мутацией G93A *SOD1*. В этой работе было показано, что данный нейрофизиологический эффект специфичен для ВСАА, поскольку не наблюдается при использовании аминокислот с неразветвленной цепью (фенилаланин, аланин). Кроме того, было показано, что гипервозбудимость корковых мотонейронов, вызванная как мутацией G93A *SOD1*, так и введением ВСАА, может быть предот-

ращена рапамицином – ингибитором протеинкиназы mTOR (mammalian target of rapamycin), активность которой регулируется различными питательными веществами, в том числе, ВСАА [152]. В совокупности представленные данные позволяют сделать вывод о возможной роли ВСАА в развитии и прогрессировании БАС. Они вызывают серьезную озабоченность, учитывая распространенность применения ВСАА в качестве пищевой добавки. Высказывается мнение, что употребление ВСАА может быть одним из факторов высокой частоты развития БАС среди, например, профессиональных игроков в американский футбол или у футболистов в Италии [147]. Роль ВСАА в развитии БАС нуждается в тщательном изучении в будущих исследованиях.

ДРУГИЕ ТОКСИНЫ

В последние годы список потенциальных токсинов, которые могут выступать в качестве этиологических факторов, факторов риска или прогрессирования БАС, существенно расширился. Кроме описанных выше токсинов, обсуждается возможная роль в развитии БАС селена [153], кадмия [154], алюминия [155], различных пестицидов [156], органических растворителей и формальдегида [10], некоторых нейротоксинов грибов [157] и ряда других токсинов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Внешнее финансирование отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brown R.H., Al-Chalabi A. // New England J. Medicine. 2017. V. 377. P. 162–172.
2. Masrori P., Van Damme P. // European J. Neurology. 2020. V. 27. P. 1918–1929.
3. Corcia P., Beltran S., Bakkouche S., Couratier P. // Revue Neurologique. 2021. V. 177. P. 544–549.
4. Gittings L.M., Sattler R. // Faculty Reviews. 2020. V. 9.
5. Kim G., Gautier O., Tassoni-Tsuchida E., Ma X.R., Gitler A.D. // Neuron. 2020. V. 108. P. 822–842.
6. Riva N., Agosta F., Lunetta C., Filippi M., Quattrini A. // J. Neurology. 2016. V. 263. P. 1241–1254.
7. Zufiria M., Gil-Bea F.J., Fernandez-Torron R., Poza J.J., Muñoz-Blanco J. L., Rojas-Garcia R., Riancho J., de Munain A.L. // Progress in Neurobiology. 2016. V. 142. P. 104–129.
8. Munsat T.L., Hollander D. // Therapie. 1990. V. 45. P. 277–279.

9. *Tshala-Katumbay D.D., Spencer P.S.* // *Handb. Clin. Neurol.* 2007. V. 82. P. 353–372.
10. *Riancho J., Bosque-Varela P., Perez-Pereda S., Povedano M., de Munain A.L., Santurtun A.* // *International J. biometeorology.* 2018. V. 62. P. 1361–1374.
11. *Spencer P., Lagrange E., Camu W.* // *Revue Neurologique.* 2019. V. 175. P. 652–663.
12. *Ludolph A.C., Spencer P.S.* // *J. Neurol. Sci.* 1996. V. 139. Suppl. P. 53–9.
13. *Spencer P.S., Roy D.N., Ludolph A., Hugon J., Dwivedi M.P., Schaumburg H.H.* // *Lancet.* 1986. V. 2. P. 1066–1067.
14. *Spencer P.S.* // *Drug Metab Rev.* 1999. V. 31. P. 561–587.
15. *Giménez-Roldán S., Morales-Asín F., Ferrer I., Spencer P.S.* // *J. History of the Neurosciences.* 2019. V. 28. P. 361–386.
16. *Valko P., Bassetti C.L.* // *J. Neurol.* 2006. V. 253. P. 537–538.
17. *Singh S.S., Rao S.* // *The Indian J. Medical Research.* 2013. V. 138. P. 32.
18. *Getahun H., Mekonnen A., Teklehaimanot R., Lambein F.* // *The Lancet.* 1999. V. 354. P. 306–307.
19. *Ravindranath V.* // *Neurochem. Int.* 2002. V. 40. P. 505–509.
20. *Van Moorhem M., Lambein F., Leybaert L.* // *Food Chem. Toxicol.* 2011. V. 49. P. 550–555.
21. *Khandare A. L., Ankulu M., Aparna N.* // *Neurotoxicology.* 2013. V. 34. P. 269–274.
22. *Jiao C.J., Jiang J.L., Ke L.M., Cheng W., Li F.M., Li Z.X., Wang C.Y.* // *Food Chem Toxicol.* 2011. V. 49. P. 543–549.
23. *Bakulin I.S., Chervyakov A.V., Suponeva N.A., Zakharova M.N., Piradov M.A.* // *Update on Amyotrophic Lateral Sclerosis.* 2016. P. 47–72.
24. *King A.E., Woodhouse A., Kirkcaldie M.T., Vickers J.C.* // *Exp. Neurol.* 2016. V. 275. Pt. 1. P. 162–171.
25. *Pradhan J., Bellingham M.C.* // *Brain Sci.* 2021. V. 11.
26. *Warren B.A., Patel S.A., Nunn P.B., Bridges R.J.* // *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2004. V. 200. P. 83–92.
27. *Willis C., Meldrum B., Nunn P., Anderton B., Leigh P.* // *Neuroscience Letters.* 1994. V. 182. P. 159–162.
28. *Diwakar L., Ravindranath V.* // *Neurochemistry International.* 2007. V. 50. P. 418–426.
29. *Pai K.S., Ravindranath V.* // *Brain Research.* 1993. V. 621. P. 215–221.
30. *Getahun H., Lambein F., Vanhoorne M., Stuyft P.V.* // *Tropical Medicine & International Health.* 2005. V. 10. P. 169–178.
31. *Van Moorhem M., Decrock E., Coussee E., Faes L., De Vuyst E., Vranckx K., De Bock M., Wang N., D'Herde K., Lambein F.* // *Cell Calcium.* 2010. V. 47. P. 287–296.
32. *Slama M.C., Berkowitz A.L.* // *Seminars in Neurology – Thieme Medical Publishers, Inc.* 2021.
33. *Parks N.E.* // *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology.* 2021. V. 27. P. 143–162.
34. *Kashala-Abomes E., Okitundu D., Mumba D., Boivin M.J., Tylleskär T., Tshala-Katumbay D.* // *Brain Research Bulletin.* 2019. V. 145. P. 87–91.
35. *Tylleskär T., Rosling H., Banea M., Bikangi N., Cooke R., Poulter N.* // *The Lancet.* 1992. V. 339. P. 208–211.
36. *Nzwalo H., Cliff J.* // *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 2011. V. 5. P. e1051.
37. *Ngudi D.D., Kuo Y.-H., Van Montagu M., Lambein F.* // *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012. V. 6. P. e1759.
38. *Siddiqi O.K., Kapina M., Kumar R., Moraes A.N., Kabwe P., Mazaba M.L., Hachaambwa L., Ng'uni N.M., Chikoti P.C., Morel-Espinosa M.* // *Neurology.* 2020. V. 94. P. e1495–e1501.
39. *Tylleskär T., Banea M., Bikangi N., Fresco L., Persson L.A., Rosling H.* // *Bulletin of the World Health Organization.* 1991. V. 69. P. 581.
40. *Cliff J., Nicala D., Saute F., Givragy R., Azambuja G., Tacla A., Chavane L., Howarth J.* // *Tropical Medicine & International Health.* 1997. V. 2. P. 1068–1074.
41. *Oluwole O., Onabolu A., Link H., Rosling H.* // *J. Neurology, Neurosurgery & Psychiatry.* 2000. V. 69. P. 96–101.
42. *Mwanza J.-C., Tshala-Katumbay D., Tylleskär T.* // *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 2005. V. 19. P. 491–496.
43. *Tshala-Katumbay K.E.E.-O., Thorkild Tylleskär, Theodore Kazadi-Kayembe, Desire* // *Disability and Rehabilitation.* 2001. V. 23. P. 731–736.
44. *Newton C.R.* // *Lancet Glob. Health.* 2017. V. 5. P. e853–e854.
45. *Baguma M., Nzabara F., Balemba G.M., Malembaka E.B., Migabo C., Mudumbi G., Bito V., Cliff J., Rigo J.-M., Chabwine J.N.* // *Neuro Toxicology.* 2021. V. 13. P. 2628.
46. *Kassa R.M., Kasensa N.L., Monterroso V.H., Kayton R.J., Klimek J.E., David L.L., Lunganza K.R., Kayembe K.T., Bentivoglio M., Juliano S.L.* // *Food and Chemical Toxicology.* 2011. V. 49. P. 571–578.
47. *Rwatambuga F., Ali E., Bramble M., Gosschalk J., Kim M., Yandju D., Okitundu L., Boivin M., Banea J., Westaway S.* // *Food and Chemical Toxicology.* 2021. V. 148. P. 111917.
48. *Rivadeneira-Domínguez E., Rodríguez-Landa J.* // *Metabolic Brain Disease.* 2020. V. 35. P. 65–74.
49. *Shaw C.-M., Papayannopoulou T., Stamatoyannopoulos G.* // *Pharmacology.* 1974. V. 12. P. 166–176.
50. *Llorens J., Soler-Martín C., Saldaña-Ruiz S., Cutillas B., Ambrosio S., Boadas-Vaello P.* // *Food and Chemical Toxicology.* 2011. V. 49. P. 563–570.
51. *Hirano A., Arumugasamy N., Zimmerman H.M.* // *Arch. Neurol.* 1967. V. 16. P. 357–363.
52. *Bradley W.G., Mash D.C.* // *Amyotrophic Lateral Sclerosis.* 2009. V. 10. P. 7–20.
53. *Zhang Z.-X., Anderson D.W., Mantel N.* // *Archives of Neurology.* 1990. V. 47. P. 1069–1074.
54. *Hirano A., Kurland L.T., Krooth R.S., Lessell S.* // *Brain.* 1961. V. 84. P. 642–661.
55. *McGeer P.L., Steele J.C.* // *Prog. Neurobiol.* 2011. V. 95. P. 663–669.
56. *Murakami N.* // *J. Neurol.* 1999. V. 246. Suppl 2. P. i16–8.
57. *Plato C.C., Galasko D., Garruto R.M., Plato M., Gamst A., Craig U.K., Torres J.M., Wiederholt W.* // *Neurology.* 2002. V. 58. P. 765–773.

58. Whiting M.G. // *Economic Botany*. 1963. V. 17. P. 270–302.
59. Cheng R., Banack S.A. // *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. 2009. V. 10. P. 41–43.
60. Delzor A., Couratier P., Boumédiène F., Nicol M., Druet-Cabanac M., Paraf F., Méjean A., Ploux O., Leleu J.-P., Brient L. // *BMJ Open*. 2014. V. 4. P. e005528.
61. Dunlop R., Banack S., Bishop S., Metcalf J., Murch S., Davis D., Stommel E., Karlsson O., Brittebo E., Chatziefthimiou A. // *Neurotoxicity Research*. 2021. P. 1–26.
62. Banack S.A., Murch S.J., Cox P.A. // *J. Ethnopharmacology*. 2006. V. 106. P. 97–104.
63. Papapetropoulos S. // *Neurochem. Int.* 2007. V. 50. P. 998–1003.
64. Garruto R.M., Yanagihara R., Gajdusek D.C. // *Neurology*. 1985. V. 35. P. 193.
65. Steele J.C., McGeer P.L. // *Neurology*. 2008. V. 70. P. 1984–1990.
66. Galasko D., Salmon D., Gamst A., Olichney J., Thal L., Silbert L., Kaye J., Brooks P., Adonay R., Craig U.-K. // *Neurology*. 2007. V. 68. P. 1772–1781.
67. Steele J.C. // *Movement Disorders: Official J. Movement Disorder Society*. 2005. V. 20. P. S99–S107.
68. Hasegawa M., Arai T., Akiyama H., Nonaka T., Mori H., Hashimoto T., Yamazaki M., Oyanagi K. // *Brain*. 2007. V. 130. P. 1386–1394.
69. Cox P.A., Banack S.A., Murch S.J. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003. V. 100. P. 13380–13383.
70. Cox P.A., Kostrzewa R.M., Guillemin G.J. // *Neurotox. Res.* 2018. V. 33. P. 178–183.
71. Cox P.A., Banack S.A., Murch S.J., Rasmussen U., Tien G., Bidigare R.R., Metcalf J.S., Morrison L.F., Codd G.A., Bergman B. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005. V. 102. P. 5074–5078.
72. Stipa G., Taiuti R., de Scisciolo G., Arnetoli G., Tredici M.R., Biondi N., Barsanti L., Lolli F. // *Medical Hypotheses*. 2006. V. 67. P. 1363–1371.
73. Banack S.A., Caller T., Henegan P., Haney J., Murby A., Metcalf J.S., Powell J., Cox P.A., Stommel E. // *Toxins*. 2015. V. 7. P. 322–336.
74. Vyas K.J., Weiss J.H. // *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. 2009. V. 10. P. 50–55.
75. Lobner D. // *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. 2009. V. 10. P. 56–60.
76. Dunlop R.A., Cox P.A., Banack S.A., Rodgers K.J. // *PLoS One*. 2013. V. 8. P. e75376.
77. Lee S.E. // *Curr. Opin. Neurol.* 2011. V. 24. P. 517–524.
78. Dewey C.M., Cenik B., Sephton C.F., Johnson B.A., Herz J., Yu G. // *Brain Research*. 2012. V. 1462. P. 16–25.
79. Michaelson N., Facciponte D., Bradley W., Stommel E. // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2017. V. 37. P. 81–88.
80. Nunes-Costa D., Magalhães J.D., Cardoso S.M., Empadinhas N. // *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2020. V. 12. P. 26.
81. Delcourt N., Claudepierre T., Maignien T., Arnich N., Mattei C. // *Toxins*. 2017. V. 10. P. 6.
82. Weiss J.H., Koh J.Y., Choi D.W. // *Brain Res.* 1989. V. 497. P. 64–71.
83. Buenz E.J., Howe C.L. // *Neurotoxicology*. 2007. V. 28. P. 702–704.
84. Purdie E., Samsudin S., Eddy F., Codd G. // *Aquatic Toxicology*. 2009. V. 95. P. 279–284.
85. Bidigare R.R., Christensen S.J., Wilde S.B., Banack S.A. // *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. 2009. V. 10. P. 71–73.
86. Tian K.W., Jiang H., Wang B.B., Zhang F., Han S. // *Toxicol Res (Camb.)*. 2016. V. 5. P. 79–96.
87. Yin H.Z., Yu S., Hsu C.I., Liu J., Acab A., Wu R., Tao A., Chiang B.J., Weiss J.H. // *Exp. Neurol.* 2014. V. 261. P. 1–9.
88. Engskog M.K., Karlsson O., Haglöf J., Elmsjö A., Brittebo E., Arvidsson T., Pettersson C. // *Toxicology*. 2013. V. 312. P. 6–11.
89. Bradley W.G., Mash D.C. // *Amyotroph Lateral Scler.* 2009. V. 10 Suppl 2. P. 7–20.
90. Hersi M., Quach P., Wang M.D., Gomes J., Gaskin J., Krewski D. // *Neurotoxicology*. 2017. V. 61. P. 12–18.
91. Gunnarsson L.G., Bodin L. // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2019. V. 16.
92. Farace C., Fenu G., Lintas S., Oggiano R., Pisano A., Sabalic A., Solinas G., Bocca B., Forte G., Madeddu R. // *Neurotoxicology*. 2020. V. 81. P. 80–88.
93. Явербаум П.М. // *Общие вопросы токсического действия свинца*. М.: Иркутский гос. ун-т 2006.
94. Новикова М.А., Пушкарев Б.Г., Судаков Н.П., Никифоров С.Б., Гольдберг О.А., Явербаум П.М. // *Сибирский медицинский журн. (Иркутск)*. 2013. Т. 117. С. 13–16.
95. Flora G., Gupta D., Tiwari A. // *Interdisciplinary Toxicology*. 2012. V. 5. P. 47.
96. Mitra P., Sharma S., Purohit P., Sharma P. // *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2017. V. 54. P. 506–528.
97. Pierce-Ruhland R., Patten B. // *Annals of Clinical Research*. 1981. V. 13. P. 102–107.
98. Kamel F., Umbach D.M., Munsat T.L., Shefner J.M., Hu H., Sandler D.P. // *Epidemiology*. 2002. P. 311–319.
99. Kamel F., Umbach D., Hu H., Munsat T., Shefner J., Taylor J., Sandler D. // *Neurodegenerative Diseases*. 2005. V. 2. P. 195–201.
100. Muddasir Qureshi M., Hayden D., Urbinelli L., Ferrante K., Newhall K., Myers D., Hilgenberg S., Smart R., Brown R.H., Cudkowicz M.E. // *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. 2006. V. 7. P. 173–182.
101. Scarpa M., Colombo A., Panzetti P., Sorgato P. // *Acta Neurologica Scandinavica*. 1988. V. 77. P. 456–460.
102. Wang M.-D., Gomes J., Cashman N. R., Little J., Krewski D. // *J. Occupational and Environmental Medicine*. 2014. V. 56. P. 1235.
103. Wang M.-D., Little J., Gomes J., Cashman N.R., Krewski D. // *Neurotoxicology*. 2017. V. 61. P. 101–130.
104. Belbasis L., Bellou V., Evangelou E. // *Neuroepidemiology*. 2016. V. 46. P. 96–105.
105. Rocha A., Trujillo K.A. // *Neurotoxicology*. 2019. V. 73. P. 58–80.

106. Dudev T., Grauffel C., Lim C. // Inorganic Chemistry. 2018. V. 57. P. 14798–14809.
107. Fan Y., Zhao X., Yu J., Xie J., Li C., Liu D., Tang C., Wang C. // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 2020. V. 58. P. 126443.
108. Mazliah J., Barron S., Bental E., Rogowski Z., Coleman R., Silbermann M. // Neuroscience Letters. 1989. V. 101. P. 253–257.
109. Ash P.E., Dhawan U., Boudeau S., Lei S., Carlomagno Y., Knobel M., Al Mohanna L.F., Boomhower S.R., Newland M.C., Sherr D.H. // Toxicological Sciences. 2019. V. 167. P. 105–115.
110. Kim S., Hyun J., Kim H., Kim Y., Kim E., Jang J., Kim K. // Biological Trace Element Research. 2011. V. 142. P. 683–692.
111. Barbeito A.G., Martinez-Palma L., Vargas M.R., Pehar M., Mañay N., Beckman J.S., Barbeito L., Cassina P. // Neurobiology of Disease. 2010. V. 37. P. 574–580.
112. Kamel F., Umbach D.M., Stallone L., Richards M., Hu H., Sandler D.P. // Environmental Health Perspectives. 2008. V. 116. P. 943–947.
113. Thomson R.M., Parry G.J. // Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine. 2006. V. 33. P. 732–741.
114. Livesley B., Sissons C. // British Medical Journal. 1968. V. 4. P. 387.
115. Bachmeyer C., Bagur E., Lenglet T., Maier-Redelsperger M., Lecomte I. // The American J. Medicine. 2012. V. 125. P. e5–e6.
116. Fluri F., Lyrer P., Gratwohl A., Raetz-Bravo A., Steck A. // Neurology. 2007. V. 69. P. 929–930.
117. Ceccatelli S., Daré E., Moors M. // Chemico-Biological Interactions. 2010. V. 188. P. 301–308.
118. Кузубова Л., Шуваева О., Аношин Г. // Метилртуть в окружающей среде (распространение, образование в природе, методы определения) Новосибирск: ГПНТБ СО РАН. 2000. Т. 82.
119. Harada M. // Critical Reviews in Toxicology. 1995. V. 25. P. 1–24.
120. Caricchio V.L., Samà A., Bramanti P., Mazzone E. // Biological Trace Element Research. 2019. V. 187. P. 341–356.
121. Bakir F., Damluji S.F., Amin-Zaki L., Murtadha M., Khalidi A., Al-Rawi N., Tikriti S., Dhahir H., Clarkson T., Smith J. // Science. 1973. V. 181. P. 230–241.
122. Harada M., Nakanishi J., Yasoda E., Maria da Conceição N. P., Oikawa T., de Assis Guimarães G., da Silva Cardoso B., Kizaki T., Ohno H. // Environment International. 2001. V. 27. P. 285–290.
123. Sarafian T. A. // J. Neurochemistry. 1993. V. 61. P. 648–657.
124. Marty M.S., Atchison W.D. // Toxicology and Applied Pharmacology. 1997. V. 147. P. 319–330.
125. Marty M.S., Atchison W.D. // Toxicology and Applied Pharmacology. 1998. V. 150. P. 98–105.
126. Do Nascimento J., Oliveira K., Crespo-Lopez M.E., Macchi B.M., Maues L., Pinheiro Mda C., Silveira L., Herculano A.M. // Indian J. Med. Res. 2008. V. 128. P. 373–382.
127. Farina M., Aschner M. // Neurotoxicity of Metals. 2017. P. 267–286.
128. Sarafian T., Verity M.A. // International J. Developmental Neuroscience. 1991. V. 9. P. 147–153.
129. Yee S., Choi B.H. // Experimental and Molecular Pathology. 1994. V. 60. P. 188–196.
130. Shanker G., Syversen T., Aschner J.L., Aschner M. // Molecular Brain Research. 2005. V. 137. P. 11–22.
131. Farina M., Aschner M. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—General Subjects. 2019. V. 1863. P. 129285.
132. Sakamoto M., Ikegami N., Nakano A. // Pharmacology & Toxicology. 1996. V. 78. P. 193–199.
133. Gassó S., Cristofol R.M., Selema G., Rosa R., Rodríguez-Farré E., Sanfeliu C. // J. Neuroscience Research. 2001. V. 66. P. 135–145.
134. Atchison W.D., Hare M.F. // The FASEB J. 1994. V. 8. P. 622–629.
135. Su M., Wakabayashi K., Kakita A., Ikuta F., Takahashi H. // J. Neurological Sciences. 1998. V. 156. P. 12–17.
136. Callaghan B., Feldman D., Gruis K., Feldman E. // Neurodegenerative Diseases. 2011. V. 8. P. 1–8.
137. Roos P.M., Dencker L. // Basic & clinical pharmacology & toxicology. 2012. V. 111. P. 126–132.
138. Brown I.A. // AMA Arch Neurol Psychiatry. 1954. V. 72. P. 674–681.
139. Schwarz S., Husstedt I., Bertram H.P., Kuchelmeister K. // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 1996. V. 60. P. 698.
140. Praline J., Guennoc A.M., Limousin N., Hallak H., de Toffol B., Corcia P. // Clin. Neurol. Neurosurg. 2007. V. 109. P. 880–883.
141. Adams C.R., Ziegler D.K., Lin J.T. // Jama. 1983. V. 250. P. 642–643.
142. Barber T.E. // J. Occup. Med. 1978. V. 20. P. 667–669.
143. Mangelsdorf I., Walach H., Mutter J. // Complement Med. Res. 2017. V. 24. P. 175–181.
144. Zhou Z., Zhang X., Cui F., Liu R., Dong Z., Wang X., Yu S. // Eur. Neurol. 2014. V. 72. P. 218–222.
145. Holeček M. // Nutrition & Metabolism. 2018. V. 15. P. 33.
146. Ohtani M., Sugita M., Maruyama K. // The J. Nutrition. 2006. V. 136. P. 538S–543S.
147. Manuel M., Heckman C. // Experimental Neurology. 2011. V. 228. P. 5.
148. Tandan R., Bromberg M., Forshew D., Fries T., Badger G., Carpenter J., Krusinski P., Betts E., Arciero K., Nau K. // Neurology. 1996. V. 47. P. 1220–1226.
149. Contrusciere V., Paradisi S., Matteucci A., Malchiodi-Albedi F. // Neurotoxicity Research. 2010. V. 17. P. 392–398.
150. Piscopo P., Crestini A., Adduci A., Ferrante A., Massari M., Popoli P., Vanacore N., Confaloni A. // J. Neuroscience research. 2011. V. 89. P. 1276–1283.
151. Venerosi A., Martire A., Rungi A., Pieri M., Ferrante A., Zona C., Popoli P., Calamandrei G. // Molecular Nutrition & Food Research. 2011. V. 55. P. 541–552.
152. Carunchio I., Curcio L., Pieri M., Pica F., Caioli S., Viscomi M. T., Molinari M., Canu N., Bernardi G., Zona C. // Experimental Neurology. 2010. V. 226. P. 218–230.

153. Vinceti M., Bonvicini F., Bergomi M., Malagoli C. // *Annali dell'Istituto superiore di sanità*. 2010. V. 46. P. 279–283.
154. Oggiano R., Pisano A., Sabalic A., Farace C., Fenu G., Lintas S., Forte G., Bocca B., Madeddu R. // *Neurological Sciences*. 2020. P. 1–7.
155. Maya S., Prakash T., Madhu K.D., Goli D. // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016. V. 83. P. 746–754.
156. Mostafalou S., Abdollahi M. // *Toxicology*. 2018. V. 409. P. 44–52.
157. French P.W., Ludowyke R., Guillemin G.J. // *Neurotoxicity Research*. 2019. V. 35. P. 969–980.

Toxin-Induced Motor Neuron Injury

M. N. Zakharova^a, I. S. Bakulin^a, and A. A. Abramova^a

^a*Research Center of Neurology, Moscow, Russia*

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a multifactorial disease where interaction of both genetic and environmental factors is thought to play a major role in disease pathophysiology. In particular, influence of various organic and inorganic toxic substances may increase the risk of ALS development and more rapid disease progression. In some cases, exposure to certain toxins may lead to the development of potentially curable ALS-like disorders with a positive clinical response to detoxification therapy. This review covers main toxic agents which affect motor neurons of the brain and spinal cord and result in typical clinical manifestations of ALS. We also provide a brief historical background on the research in this field, as well as data obtained from experimental studies on the pathophysiology of toxin-induced motor neuron disease.

Keywords: amyotrophic lateral sclerosis, motor neuron disease, toxic agents, latrism, konzo, cyanotoxins, heavy metals, amino acids with branched side chains (BCAA)

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 577.2+616.8-092+612.821(082)

НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ И ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ОЛИГОМЕРОВ АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА У МЫШЕЙ ТРЕХМЕСЯЧНОГО ВОЗРАСТА

© 2021 г. В. В. Шерстнев¹, М. А. Грудень¹, *, О. А. Соловьева¹, В. С. Кудрин²,
В. Б. Наркевич², Н. П. Михайлова¹, А. М. Ратмиров¹

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
“Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина”, Москва, Россия

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
“Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова”, Москва, Россия

Поступила в редакцию 24.06.2021 г.

После доработки 04.07.2021 г.

Принята к публикации 05.07.2021 г.

Болезнь Паркинсона — широко распространенное, прогрессирующее, возрастзависимое нейродегенеративное заболевание. Нейрохимической основой двигательных и недвигательных нарушений при болезни Паркинсона является дисфункция многих нейромедиаторных систем мозга и, в первую очередь, функциональный дефицит и дисбаланс моноаминергических систем, которые обусловлены деградацией и гибелью определенных популяций нервных клеток в условиях мисфолдинга белка α -синуклеина и действия его амилоидогенных нейротоксических конформаций. Особый интерес вызывают исследования возрастных особенностей изменений моноаминергических систем и развития моторных и немоторных нарушений на доклинической и клинической стадиях заболевания. В работе изучено влияние олигомеров α -синуклеина, вводимых интраназально в течение 14-ти дней, на двигательную активность, эмоциональное состояние, кратко- и долговременную память, а также содержание и обмен дофамина, серотонина и норадреналина в гиппокампе, фронтальной коре мозга и мозжечке самцов мышей C57Bl/6 в возрасте 3-х месяцев. В поведенческих экспериментах использовали модели: “Открытое поле”, “Распознавание нового объекта”, “Условная реакция пассивного избегания” и “Приподнятый крестообразный лабиринт”. Содержание моноаминов и их метаболитов в ткани мозга животных определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электромагнитной детекцией. Обнаружено, что мыши, получавшие олигомеры α -синуклеина, демонстрировали проявления аффективноподобного поведения с признаками апатии. Нарушений двигательной активности, кратковременной и долговременной памяти и повышения тревожности у животных не документировано. Олигомеры α -синуклеина вызвали значимое снижение содержания дофамина и его метаболитов DOPAC и HVA во фронтальной коре мозга, а также снижение концентрации метаболита дофамина — 3-МТ и разнонаправленные изменения показателей обмена серотонина и дофамина в гиппокампе. При этом зарегистрировано значительное повышение содержания 3-МТ в мозжечке. Выполнен сравнительный анализ полученных в работе данных и экспериментальных фактов, выявленных в ранее проведенном нами исследовании нейрохимических и поведенческих эффектов олигомеров α -синуклеина у мышей 6-ти месячного возраста. Полученные результаты свидетельствуют, что олигомеры α -синуклеина при хроническом интраназальном введении вызывают у мышей 3-х месячного возраста недвигательные нарушения и нейрохимические изменения, которые наблюдаются на доклинической стадии БП.

Ключевые слова: α -синуклеин, олигомеры, моноамины, двигательная активность, аффективноподобное поведение, память, 3-х месячные мыши, Болезнь Паркинсона

DOI: 10.31857/S1027813321040117

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) — хроническое, прогрессирующее, возрастзависимое, нейродегенеративное заболевание. Среди всех неврологических заболеваний БП находится на втором ме-

сте по частоте встречаемости и на первом — по приросту распространенности. Так, общее число пациентов с БП во всем мире увеличилось более чем вдвое за период с 1990 по 2015 г. Количество случаев БП в 2014–2015 гг. оценивалось в 6.2–6.9 миллионов пациентов по всему миру, а к 2040 г. ожидается увеличение числа заболевших до 12.9–14.2 миллионов человек. БП является заболева-

* Адресат для корреспонденции: 125315 Россия, Москва, ул. Балтийская д. 8, тел.: 8(499)231-00-46, e-mail: mgrud-en@mail.ru.

нием наиболее зависимым от возраста. Заболеваемость БП с возрастом увеличивается более чем в 400 раз [1–3].

В качестве ключевого звена молекулярного патогенеза БП, в настоящее время рассматривают гиперпродукцию и мисфолдинг белка α -синуклеина (α -син) с образованием амилоидогенных нейротоксических структур, среди которых наиболее выраженным нейротоксическим действием обладают префибриллярные олигомерные формы белка. Высокие концентрации α -син и его амилоидогенные структуры инициируют деградацию и избирательную гибель определенных популяций нервных клеток, локализующихся в различных церебральных структурах, что приводит к дисбалансу и дисфункции многих нейромедиаторных систем мозга. При этом моноаминергические системы подвержены более раннему и выраженному нейротоксическому влиянию α -син и его амилоидогенных конформаций. Считают, что дисфункции и дисбаланс нейромедиаторных систем обуславливают развитие и проявление характерных двигательных и многообразных не двигательных нарушений, наблюдаемых при БП [4–6].

В последние годы все более активно и широко исследуются различные вопросы междисциплинарной проблемы старения и БП. Признано, что старение является основным фактором риска развития БП. Возраст дебюта заболевания в значительной степени определяет, спектр клинических проявлений и продолжительность течения БП. В зависимости от возраста начала БП выделяют подтипы заболевания, которые различаются пространственностью, клиническими и генетическими особенностями. Ювенильный паркинсонизм — с началом заболевания в возрасте менее 20 лет. БП с молодым (ранним) началом в возрасте от 21 до 40 лет. БП с поздним началом, когда классические признаки заболевания (двигательные нарушения) появляются после 61 г. [1, 3, 7, 8].

Значимый интерес для понимания молекулярного патогенеза и разработки адекватных экспериментальных моделей БП представляют знания о возрастных особенностях нейрохимических механизмов двигательных и не двигательных нарушений, наблюдаемых на доклинической и клинической стадиях заболевания. Нами была разработана оригинальная экспериментальная модель сходных с БП патологических состояний, основанная на хроническом интраназальном введении амилоидогенных конформаций α -син стареющим мышам. В экспериментах, проведенных на мышах 12-ти месячного возраста, было показано, что олигомеры α -син, вводимые интраназально в течение 14-ти дней, вызывают нейрохимические и поведенческие эффекты сходные с проявлениями, наблюдаемыми на клинической стадии БП: снижение числа дофаминергических нейронов в компакт-

ной части черной субстанции мозга, выраженные изменения содержания моноаминов и их метаболитов в черной субстанции и стриатуме, нарушение нейрогенеза в гиппокампе, а также нарушение двигательной активности, памяти и повышение тревожности [9]. Мыши 6-ти месячного возраста, получавшие олигомеры α -син, воспроизводили отдельные доклинические проявления БП: повышение тревожности, снижение содержания дофамина и разнонаправленные изменения уровня его метаболитов в гиппокампе и фронтальной коре мозга. При этом нарушений двигательной активности, обучения и памяти животные не демонстрировали [10, 11].

Учитывая изложенное, настоящая работа была направлена на исследование особенностей влияния олигомеров α -син в условиях хронического интраназального их введения на двигательную активность, тревожность, кратко- и долговременную память, содержание и обмен дофамина, серотонина и норадреналина в гиппокампе, фронтальной коре мозга и мозжечке мышей 3-х месячного возраста.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на 20 самцах мышей линии C57Bl/6 в возрасте 3 месяцев (ФГБУН НЦБМТ ФМБА питомник “Столбовая”, Россия). Мыши содержались по 3–5 особей в клетках в стандартных условиях вивария со сменой темной и светлой фаз суток 12/12 ч. при свободном доступе к пище и воде. Мышам двух групп вводили поочередно в каждую ноздрю либо раствор олигомеров α -син, приготовленном на физиологическом растворе (8 мкл, 0.48 мг/кг, $n = 10$), либо физиологический раствор (ФР, 8 мкл, $n = 10$) ежедневно в течение 14 дней.

В исследовании была использована батарея поведенческих тестов, описанная нами ранее [10, 11]. На 15-й день от начала введения растворов животных из экспериментальной и контрольной групп однократно помещали в установку “Открытое поле” (ОП) (Columbus Instruments, Огайо, США) на 11 мин (адаптация в течение 5 мин, тестирование — последние 6 минут). Поведение животных регистрировали с помощью видеокамеры CNB-BBB-31F (CNB Technology Inc., Корея), размещенной под потолком комнаты. Сбор и анализ данных проводили с помощью программы Ethovision XT 8.5 (Noldus, Голландия). Для анализа площадь установки делили на 16 равных квадратов. По перемещению центра тела животного оценивали среднюю скорость движения, а также длительность нахождения и количество заходов в центральную зону (4 центральных квадрата из 16-ти). На 16-е сут оценивали кратковременную память мышей в тесте “Распознавание нового объекта” (РНО), используя установку ОП как

арену для проведения исследования. Во время сессии обучения длительностью 5 мин животные имели возможность свободно исследовать два идентичных объекта (банки из стекла с металлическими крышками, диаметром 5.4 см). Через 1 ч после обучения мышей проводили 5-минутную сессию тестирования: в установку помещали один ранее знакомый и один новый для мыши объект (зеленый пластмассовый стакан диаметром 7.5 см). В тесте РНО зоны интереса определяли по границам размещенных в установке 2-х объектов (двух при обучении и двух при тестировании) и на расстоянии 2 см от этих объектов (в пограничных зонах). В этом тесте положение животного определяли по трем точкам (нос, центр тела и хвост). Считали, что мышь исследует объект, если ее нос определялся в границах самого объекта или его пограничной зоны. На основе файлов, записанных во время тестирования, рассчитывали индекс дискриминации (ИД) = $T_{\text{нов}} / (T_{\text{нов}} + T_{\text{знак}})$, где $T_{\text{нов}}$ — длительность нахождения в зоне нового объекта и его пограничной зоне (в секундах), $T_{\text{знак}}$ — длительность нахождения в зоне знакомого объекта и его пограничной зоне (в секундах). При анализе результатов, полученных в модели РНО, были исключены данные одной мыши из контрольной группы, которая при адаптации не подходила ни к одному из объектов. На 18-е сутки исследования в установке PACS Shuttle Box (v.3.13) (Columbus Instruments, Ohio, USA) у животных обеих групп формировали условную реакцию пассивного избегания (УРПИ), которую оценивали через 24 ч. Животных адаптировали к освещенному отсеку в течение 15 с, максимальная длительность сессии обусловливания составляла 180 с, сессии тестирования — 300 с. В случае перехода в темный отсек мышь получала электрокожное раздражение лап и хвоста (сила тока — 0.6 мА, длительность разряда — 3 с). С помощью программного обеспечения PACS 30 Shuttle Box v. 3.13 в обеих сессиях автоматически фиксировали латентное время (ЛВ) перехода из освещенного в темный отсек камеры. Если животное не переходило в темный отсек в течение первой сессии обусловливания, ей предоставлялась еще одна попытка, но не ранее, чем через 30 минут после первой сессии. Спустя 2 дня после проведения УРПИ животных однократно в течение 5 минут тестировали в установке “Приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ) (Columbus Instruments, Ohio, USA). В ПКЛ выделяли 2 суммарные зоны интереса: 2 открытых рукава и 2 закрытых. Оценивали следующие показатели: среднюю скорость движения, суммарное количество входов и длительность пребывания в двух закрытых и двух открытых рукавах. Опыты в ОП, РНО и ПКЛ проводили в помещении при освещении установки рассеянным светом (10–14 люкс).

Через 24 ч по окончании поведенческих экспериментов всех животных декапитировали, извлекали мозг и выделяли на холоде образцы структур мозга: гиппокамп, фронтальная кора мозга и мозжечок, которые замораживали в жидком азоте. Далее в полученных образцах церебральных структур определяли содержание биогенных аминов: дофамина (dopamine, DA), его метаболитов (3,4-Dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC; homovanillic acid, HVA; 3-Methoxytyramine, 3-MT), норадреналина (NA), серотонина (5-hydroxytryptamine, serotonin, 5-HT) и его метаболита (5-hydroxyindoleacetic acid, 5-HIAA). В экспериментах были использованы моноамины и их метаболиты производства Sigma, St. Louis, MO, USA. Уровень нейромедиаторов определяли в структурах мозга мышей методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией на хроматографе LC-304T (BAS, West Lafayette, США) с инжектором Rheodyne 7125, с объемом петли для нанесения образцов в 20 мкл [12]. Величины концентрации моноаминов в опытных образцах рассчитывали методом “внутреннего стандарта”, исходя из отношений площадей пиков в стандартной смеси и экспериментальном образце и выражали в нМ/г ткани.

Олигомеры α -син были получены и охарактеризованы по описанному ранее протоколу [13].

Статистический анализ результатов поведенческих экспериментов осуществляли с помощью программы SPSS Statistics 17.0 (SPSS Inc., США), Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США). Данные представляли как средние значения и стандартные ошибки измерения ($M \pm SEM$), использовали межгрупповое сравнение по U критерию Mann–Whitney. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В поведенческой части исследования оценивали двигательную активность, кратко- и долговременную память и тревожность самцов мышей 3-х месячного возраста, получавших интраназально в течение 14 дней олигомеры α -син либо физиологический раствор. Обнаружено, что общая двигательная активность экспериментальных мышей по сравнению с контрольными животными статистически значимо не различалась ни в ОП, ни в моделях РНО и в ПКЛ. Средняя скорость движения экспериментальных мышей в ОП при адаптации составила 9.4 ± 1.0 см/с (ФР: 8.3 ± 0.5 см/с, тест Манна–Уитни, $U = 14.00$, $Z = -1.347$, $p = 0.178$), при тестировании — 6.2 ± 0.5 см/с (ФР: 6.5 ± 0.7 см/с, $U = 24.00$, $Z = -0.122$, $p = 0.903$). Пройденное животными расстояние также достоверно не различалось (адаптация: олигомеры α -син: 2775.7 ± 277.4 см, ФР: 2479.5 ± 137.3 см, $U = 14.00$, $Z = -1.347$, $p = 0.178$; тест: олигомеры α -син:

Таблица 1. Длительность обследования объектов при обучении и тестировании через 1 час в модели РНО

Тесты	Олигомеры α -синуклеина	Физиологический раствор	Различия между группами, критерий Манна–Уитни
Адаптация			
Длительность обследования объекта 1	7.0 ± 4.7	14.3 ± 5.0	$U = 8.0, Z = -1.933, p = 0.053$
Количество подходов к объекту 1	29 ± 15	50 ± 16	$U = 11.5, Z = -1.472, p = 0.141$
Длительность обследования объекта 2	7.1 ± 4.8	14.2 ± 5.4	$U = 8.0, Z = -1.933, p = 0.053$
Количество подходов к объекту 2	26 ± 16	49 ± 16	$U = 10.0, Z = -1.669, p = 0.095$
Тест			
Длительность обследования нового объекта	16.1 ± 9.8	19.5 ± 3.8	$U = 12.0, Z = -1.4, p = 0.162$
Количество подходов к новому объекту	70 ± 48	70 ± 17	$U = 13.0, Z = -1.272, p = 0.203$
Длительность обследования знакомого объекта	10 ± 7	9.9 ± 2.3	$U = 14.0, Z = -1.133, p = 0.257$
Количество подходов к знакомому объекту	47 ± 34	38 ± 8	$U = 14.0, Z = -1.133, p = 0.257$
Индекс распознавания	0.77 ± 0.1	0.71 ± 0.02	$U = 15.0, Z = -1.0, p = 0.317$

2236.9 ± 179.3 см, ФР: 2339.0 ± 267.9 см, $U = 24.00$, $Z = -0.122$, $p = 0.903$). Не было выявлено статистически значимых различий во времени нахождения в центре установки ОП (адаптация: олигомеры α -син: 31.9 ± 3.5 с, ФР: 29.9 ± 3.1 с, $U = 20.00$, $Z = -0.612$, $p = 0.540$; тест: олигомеры α -син: 52.6 ± 14.2 с, ФР: 33.9 ± 3.8 с, $U = 15.00$, $Z = -1.226$, $p = 0.220$). При адаптации количество заходов экспериментальных мышей в центр ОП составило в среднем 25 ± 2 (ФР: 24 ± 2 , $U = 23.00$, $Z = -0.246$, $p = 0.805$), при тестировании — 23 ± 2 (ФР: 20 ± 3 , $U = 14.50$, $Z = -1.292$, $p = 0.196$). У мышей, получавших олигомеры α -син, средняя скорость движения в модели РНО при обучении составила 5.6 ± 0.5 см/с (ФР: 6.4 ± 0.6 см/с, $U = 18.00$, $Z = -0.6$, $p = 0.549$), при тестировании 4.7 ± 0.4 см/с (ФР: 5.0 ± 0.6 см/с, $U = 22.00$, $Z = 0.067$, $p = 0.947$). За время обучения экспериментальные мыши прошли в среднем 3306.5 ± 308.6 см, контроль — 3822.8 ± 370.2 см ($U = 18.00$, $Z = -0.6$, $p = 0.549$), а при тестировании — в среднем, соответственно, 2767.8 ± 260.7 и 2983.4 ± 366.8 см ($U = 22.00$, $Z = -0.067$, $p = 0.947$). В ПКЛ у мышей из экспериментальной и контрольной групп не различались ни средняя скорость движения (олигомеры α -син: 7.5 ± 1.3 см/с, ФР: 5.6 ± 3.9 см/с, $U = 12.00$, $Z = -1.592$, $p = 0.111$), ни длина пути, пройденного за 5 мин (олигомеры α -син: 2218.8 ± 380.7 см, ФР: 1679.6 ± 117.0 см, $U = 12.00$, $Z = -1.592$, $p = 0.111$).

Сравнение поведение экспериментальных и контрольных мышей в модели РНО выявило различия на уровне тенденции во времени обследования двух объектов при адаптации ($0.05 < p < 0.1$), но не при тестировании через 1 ч ($p > 0.1$). Индексы распознавания также статистически значимо не различались (табл. 1).

При формировании УРПИ среднее ЛВ перехода в темный отсек статистически значимо различалось между группами мышей при обусловливании (оли-

гомеры α -син: 15.8 ± 3.8 с, ФР: 53.6 ± 15.2 с, $U = 5.5$, $Z = -2.395$, $p = 0.017$), но не тестировании через 24 ч (олигомеры α -син: 146.4 ± 64.4 с, ФР: 177.3 ± 36.64 с, $U = 22.0$, $Z = -0.374$, $p = 0.708$).

В тесте ПКЛ между мышами, которым вводили олигомеры α -син или ФР, выявлены различия на уровне тенденции в продолжительности нахождения в открытых рукавах (олигомеры α -син: 107.5 ± 19.9 с, ФР: 56.7 ± 13.34 с, $U = 9.00$, $Z = -1.96$, $p = 0.05$) и индексе предпочтения открытых рукавов (олигомеры α -син: 0.77 ± 0.23 , ФР: 0.33 ± 0.09 , $U = 11.00$, $Z = -1.715$, $p = 0.083$). Мыши из экспериментальной и контрольной групп не различались по количеству входов в открытые рукава лабиринта (олигомеры α -син: 20.2 ± 4.0 , ФР: 13.8 ± 2.0 , $U = 15.00$, $Z = -1.23$, $p = 0.219$), но имели различия на уровне четкой тенденции в количестве заходов в закрытые рукава ПКЛ (олигомеры α -син: 11.4 ± 1.8 , ФР: 14.9 ± 2.8 , $U = 20.5$, $Z = -0.554$, $p = 0.580$).

В нейрoхимической части исследования определяли содержание моноаминов и их метаболитов в гиппокампе, фронтальной коре мозга и мозжечке у мышей 3-х месячного возраста, которым интраназально в течение 14-ти дней вводили олигомеры α -син либо ФР. Документировано, что в гиппокампе экспериментальных животных содержание моноаминов и метаболитов DOPAC, HVA и 5-HIAA не отличалось от содержания таковых у контрольных животных. При этом, отмечено статистически значимое снижение уровня метаболита 3-МТ на 53.33% и коэффициента обмена DOPAC/DA на 22.73%, а также выраженное повышение коэффициента обмена серотонина 5-HIAA/5-HT на 96.97% (табл. 2). Во фронтальной коре у экспериментальных мышей зарегистрировано статистически достоверное снижение концентрации DA и его метаболитов DOPAC, HVA на 41.49, 36.36 и 26,92% соответственно.

Таблица 2. Влияние хронического интраназального введения олигомеров α -син на содержание моноаминов и их метаболитов, а также показатели их обмена в гиппокампе, фронтальной коре и мозжечке у 3-х месячных мышей

Группы животных и структуры мозга	Нейромедиаторы, их метаболиты (нМ/г ткани) и показатели обмена (усл. ед.)									
	NA	DA	DOPAC	HVA	3-MT	5-HT	5-HIAA	DOPAC/DA	HVA/DA	5-HIAA/5-HT
Гиппокамп										
Физ. раствор	4.46 ± 0.35	0.68 ± 0.38	0.13 ± 0.05	0.73 ± 0.25	0.30 ± 0.25	7.48 ± 0.80	4.94 ± 0.48	0.22 ± 0.06	1.28 ± 0.49	0.66 ± 0.06
Олигомеры α -синуклеина	5.00 ± 0.78	0.63 ± 0.04	0.16 ± 0.01	0.70 ± 0.41	0.14 ± 0.09*	6.79 ± 0.71	4.27 ± 0.42	0.166 ± 0.05*	1.301 ± 0.12	1.301 ± 0.01*
Фронтальная кора										
Физ. раствор	5.53 ± 0.46	27.04 ± 12.98	1.98 ± 0.60	3.90 ± 1.21	0.84 ± 0.54	5.74 ± 0.69	2.66 ± 0.34	0.08 ± 0.02	0.16 ± 0.05	0.46 ± 0.04
Олигомеры α -синуклеина	6.41 ± 1.67	15.82 ± 8.77*	1.26 ± 0.55*	2.854 ± 1.06*	0.88 ± 0.56	5.74 ± 0.99	2.32 ± 0.76	0.102 ± 0.03	0.23 ± 0.09*	0.44 ± 0.10
Мозжечок										
Физ. раствор	5.17 ± 0.44	0.31 ± 0.19	0.23 ± 0.10	0.71 ± 0.18	0.08 ± 0.03	3.31 ± 0.24	2.74 ± 0.81	0.80 ± 0.19	2.67 ± 0.82	0.83 ± 0.14
Олигомеры α -синуклеина	5.07 ± 0.16	0.35 ± 0.16	0.19 ± 0.02	1.18 ± 0.37*	0.18 ± 0.31*	4.21 ± 0.49*	2.65 ± 0.271	0.52 ± 0.27*	1.48 ± 0.69*	0.66 ± 0.12*

Вместе с тем коэффициент обмена дофамина — HVA/DA повысился на 43.75% по сравнению с контролем. Статистически достоверных изменений содержания NA и 5-HT, метаболитов 3-MT и 5-HIAA, а также показателей коэффициентов обмена DOPAC/DA и 5-HIAA/5-HT во фронтальной коре не выявлено (табл. 2). В мозжечке мышей, получавших препарат олигомеров α -син, документировано повышение уровня метаболита 3-MT более чем в 2 раза (на 212.5%), при том, что статистически значимых изменений других исследованных показателей не отмечено (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты выполненного исследования демонстрируют, что олигомеры α -син при хроническом интраназальном введении вызывают у самцов мышей 3-х месячного возраста проявления аффективноподобного поведения с признаками апатии. Мыши, получавшие олигомеры α -син по сравнению с мышами, получившими ФР, проявляли снижение интереса к исследованию новых объектов в период адаптации в модели РНО, более продолжительное время находились в открытых рукавах, при меньшем количестве посещений закрытых рукавов ПКЛ. Нарушений двигательной активности, кратковременной и долговременной памяти, а также повышения тревожности у этих животных не обнаружено.

Аффективные расстройства (апатия, тревога, депрессия, психозы) являются распространенными

ми немоторными нарушениями при БП, которые наблюдаются на доклинической и клинической стадиях заболевания. Так: распространенность апатии при БП достигает 60%, тревога наблюдается у 20–49% пациентов с БП, а распространенность депрессии в среднем составляет 35%. Аффективные расстройства часто наблюдаются на доклинической стадии БП, опережая характерные двигательные проявления заболевания на 3–6 лет. В качестве основных нейробиохимических механизмов формирования аффективных расстройств при БП рассматривают дисбаланс и дисфункцию моноаминергических и ацетилхолинергической систем, а также дефицит моноаминов и нарушение моноаминергической трансмиссии во фронтальной коре мозга, гиппокампе и базальных ядрах. Показано, что различные аффективные расстройства отличаются особенностями нейроанатомической и нейробиохимической организации [14–16].

В работе обнаружено, что олигомеры α -син, вводимые интраназально в течение 14-ти дней, инициируют у мышей 3-х месячного возраста значимые изменения содержания моноаминов и их метаболитов в исследованных церебральных структурах, участвующих в регуляции эмоционального поведения. Так, во фронтальной коре мозга зарегистрировано выраженное снижение уровня DA и его метаболитов DOPAC, HVA, а также повышение коэффициента обмена HVA/DA. В гиппокампе отмечено достоверное снижение содержания метаболита 3-MT и разнонаправленные изменения коэффициентов обмена DA и 5-HT. В мозжечке документировано более чем двукратное

повышение 3-МТ — метаболита DA. Выявленные изменения содержания моноаминов и их метаболитов свидетельствует о дефиците DA и нарушении его обмена во фронтальной коре мозга, нарушении обмена DA и 5-НТ в гиппокампе, а также изменение метаболизма DA в мозжечке, что, по-видимому, обуславливает развитие аффективно-подобного состояния с признаками апатии у мышей 3-х месячного возраста в условиях хронического введения олигомеров α -син. Полученные данные указывают, что олигомеры α -син при хроническом интраназальном введении воспроизводят у 3-х месячных мышей проявления аффективно-подобного поведения и нейрохимические изменения, сходные с двигательными нарушениями, которые наблюдаются на доклинической стадии БП.

Документированные экспериментальные факты подтверждают представления о ведущей роли дисбаланса и дисфункции DA- и 5-НТ-ергических систем мозга в развитии немоторных нарушений на доклинической стадии БП [5, 15]. Результаты работы согласуются с современными взглядами о том, что мозжечок вовлечен в патогенез БП. Структурно-функциональные нарушения мозжечка, вызванные дефицитом DA, вносят существенный вклад в развитие не только моторных, но и двигательных симптомов, в том числе аффективных состояний при БП [17].

Считают, что исследования и экспериментальное моделирование немоторных симптомов и нейрохимических основ доклинических двигательных нарушений БП актуальны и перспективны для разработки методов ранней диагностики и патогенетического лечения заболевания [15, 16]. В проведенном нами ранее исследовании было обнаружено, что олигомеры α -син в условиях аналогичного экспериментального протокола вызывают у мышей 6-ти месячного возраста поведенческие и нейрохимические эффекты сходные с доклиническими, немоторными проявлениями БП. Животные демонстрировали повышение тревожности без признаков нарушения двигательной активности, обучения и памяти. При этом во фронтальной коре мозга зарегистрировано достоверное снижение содержания DA и повышение уровня его метаболитов, а также снижение концентрации DA и его метаболитов в гиппокампе [11].

Таким образом, у мышей 3-х и 6-ти месячного возраста эффекты олигомеров α -син при хроническом интраназальном введении воспроизводят двигательные доклинические проявления БП, которые, вместе с тем, имеют определенные особенности. Животные 3-х месячного возраста демонстрируют аффективно-подобное поведение с признаками апатии с дефицитом DA во фронтальной коре мозга и нарушением его обмена в гиппокампе, фронтальной коре и мозжечке. Тогда как 6-ти месячные мыши проявляли тревожно-подобное поведение, ассоциированное с дефицитом DA не только во фронтальной коре, но и в гиппокампе, а также нарушениями обмена DA в

указанных церебральных структурах. Следует отметить, что полученные нами данные подтверждаются фактами о нейроанатомических и нейрохимических особенностях различных аффективных расстройств [14, 16, 18]. Имеющиеся результаты позволяют, на наш взгляд, считать, что характер выявленных у 3-х и 6-ти месячных животных проявлений двигательных доклинических нарушений, наблюдаемых при БП, определяется возрастом начала нейродегенерации вызванной действием олигомеров α -син при интраназальном введении [3, 7, 8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, результаты данной работы и ранее выполненного нами исследования свидетельствуют, что олигомеры α -син при хроническом интраназальном введении вызывают у мышей 3-х и 6-ти месячного возраста поведенческие и нейрохимические эффекты, которые отличаются особенностями и воспроизводят двигательные проявления, сходные с наблюдаемыми на доклинической стадии БП. Мыши 3-х месячного возраста демонстрируют аффективно-подобное поведение с признаками апатии ассоциированное с дефицитом DA и нарушением его обмена во фронтальной коре мозга, нарушением обмена DA и 5-НТ в гиппокампе, а также изменением метаболизма DA в мозжечке. У мышей 6-ти месячного возраста зарегистрировано тревожно-подобное поведение, ассоциированное с выраженным снижением концентрации DA и нарушения его обмена в гиппокампе и фронтальной коре мозга. При этом нарушений двигательной активности, обучения и памяти у животных не документировано. Предполагается, что обнаруженные у 3-х и 6-ти месячных животных особенности двигательных доклинических проявлений БП определяются возрастом дебюта нейродегенеративного процесса, вызванного действием олигомеров α -син.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность профессору Ludmilla Morozova-Roche, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Umea University, Sweden за консультативную и техническую помощь в характеристике препарата олигомеров α -синуклеина.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках выполнения государственного задания.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Этическое одобрение. Все манипуляции с животными были проведены с соблюдением требований, изложенных в директиве по охране животных, используемых в

научных целях (2010/63/EU от 22 сентября 2010 г.), а также в соответствии с правилами, утвержденными комиссией по биоэтике ФГБНУ “Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 // *Lancet Neurol.* 2018. V. 17. № 11. P. 939–953.
2. Dorsey E.R., Bloem B.R. // *JAMA Neurol.* 2018. V. 75. № 1. P. 9–10.
3. Rodriguez M., Rodriguez-Sabate C., Morales I., Sanchez A., Sabate M. // *Aging Cell.* 2015. Jun. V. 14. № 3. P. 293–308.
4. Bridi J.C., Hirth F. // *Front. Neurosci.* 2018. V. 12. P. 12–80.
5. Grosch J., Winkler J., Kohl Z. // *Front. Cell. Neurosci.* 2016. V. 10. P. 293.
6. Brichta L., Greengard P., Flajolet M. // *Trends in Neurosci.* 2013. V. 36. № 9. P. 543–554.
7. Schrag A., Schott J.M. // *Lancet Neurol.* 2006. V. 5. № 4. P. 355–363.
8. Post B., van den Heuvel L., van Prooije T., van Ruissen X., van de Warrenburg B., Nonnekes J. // *J. Park. Dis.* 2020. V. 10. № S1. P. 29–36.
9. Gruden M.A., Davydova T.V., Narkevich V.B., Fomina V.G., Wang C., Kudrin V.S., Morozova-Roshe L.A., Sewell R.D. // *Behav. Brain Res.* 2014. V. 263. P. 158–168.
10. Sherstnev V.V., Kedrov A.V., Solov'eva O.A., Gruden M.A., Kononova E.V., Kalinin I.A., Proshin A.T. // *Neurochem. J.* 2017. V. 11. № 4. P. 282–289.
11. Грудень М.А., Соловьева О.А., Кудрин В.С., Наркевич В.Б., Шерстнев В.В. // *Нейрохимия.* 2020. Т. 37. № 1. С. 24–31.
12. Villar-Pique A., da Fonseca T.L., Outeiro T.F. // *J. Neurochem.* 2016. V. 139. Suppl. 1. P. 240–255.
13. Gruden M.A., Davydova T.V., Yanamandra K., Kucheryan V.G., Morozova-Roshe L.A., Sherstnev V.V., Sewell R.D. // *Behav. Brain Res.* 2013. V. 243. P. 205–212.
14. Gallagher D.A., Schrag A. // *Neurobiol. Dis.* 2012. V. 46. № 3. P. 581–589.
15. Schapira A.H.V., Chaudhuri K.R., Jenner P. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2017. V. 18. № 7. P. 435–450.
16. Dujardin K., Sgambato V. // *Front. Neurosci.* 2020. V. 14. A. 25.
17. Wu T., Hallett M. // *Brain.* 2013. V. 136. P. 696–709.
18. Pagonabarraga J., Kulisevsky J., Strafella A.P., Krack P. // *Lancet Neurol.* 2015. V. 14. № 5. P. 518–531.

Neurochemical and Behavioral Effects of Alpha-Synuclein Oligomers in Mice of Three Months Age

V. V. Sherstnev^a, M. A. Gruden^a, O. A. Solovieva^a, V. S. Kudrin^b,
V. B. Narkevich^b, N. P. Mikhailova^a, and A. M. Ratmirov^a

^aFederal State Budget Scientific Institution “P.K. Anokhin Research Institute of Normal Physiology”, Moscow, Russia

^bFederal State Budget Scientific Institution “V.V. Zakusov Research Institute of Pharmacology”, Moscow, Russia

Parkinson's disease is a widespread, progressive, age-related neurodegenerative disease. The neurochemical basis of motor and non-motor disorders in Parkinson's disease is the dysfunction of many brain neurotransmitter systems and, first of all, the functional deficit and imbalance of monoaminergic systems, which are caused by the degradation and death of certain populations of nerve cells under conditions of misfolding of the protein α -synuclein and the action of its amyloidogenic neurotoxic conformations. Of particular interest is the study of age-related characteristics of changes in monoaminergic systems and the development of motor and non-motor disorders at the preclinical and clinical stages of the disease. The work studied the effect of α -synuclein oligomers, administered intranasally for 14 days, on motor activity, emotional state, short- and long-term memory, as well as the content and metabolism of dopamine, serotonin and norepinephrine in the hippocampus, frontal cortex and cerebellum of male C57Bl/6 mice at the age of 3 months. In behavioral experiments, the following models were used: “Open field”, “Recognition of a new object”, “Conditioned reaction of passive avoidance” and “Elevated cruciform maze”. The content of monoamines and their metabolites in the brain tissue of animals was determined by high performance liquid chromatography with electro-magnetic detection. It was found that mice treated with α -synuclein oligomers showed manifestations of affective-like behavior with signs of apathy. Alterations of motor activity, short-term and long-term memory, and an increase in anxiety in animals have not been documented. Oligomers of α -synuclein caused a significant decrease in the content of dopamine and its metabolites DOPAC and HVA in the frontal cortex, as well as a decrease in the concentration of the dopamine metabolite, 3-MT, and multidirectional changes in serotonin and dopamine metabolism in the hippocampus. At the same time, a significant increase in the content of 3-MT in the cerebellum was recorded. A comparative analysis of the data obtained in this work and the experimental facts revealed in our earlier study of the neurochemical and behavioral effects of α -synuclein oligomers in 6-month-old mice was carried out. The results obtained indicate that oligomers of α -synuclein, when administered chronic intranasally, cause non-motor disorders and neurochemical changes in mice of 3 months of age, which are observed at the preclinical stage of PD.

Keywords: α -synuclein, oligomers, monoamines, locomotor activity, affective-like behavior, memory, 3-month-old mice, Parkinson's disease

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА НЕЙРОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ПАЦИЕНТОВ С ПРОФЕССИОНАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ ВОЗДЕЙСТВИЕМ ФИЗИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

© 2021 г. Г. М. Бодиенкова¹, *, Е. В. Боклаженко¹

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
“Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований”, Ангарск, Россия

Поступила в редакцию 17.04.2021 г.

После доработки 28.04.2021 г.

Принята к публикации 13.05.2021 г.

Цель исследования заключалась в сравнительном анализе изменений в содержании сывороточных концентраций нейрональных антител и цитокинов у пациентов с профессиональной патологией, сформировавшейся при воздействии физических (авиационный шум, вибрация) и химических (пары металлической ртути) факторов. В условиях клиники проведено обследование мужчин с профессиональной нейросенсорной тугоухостью ($n = 55$), вибрационной болезнью ($n = 53$), хронической ртутной интоксикацией ($n = 27$) и 34 “условно” здоровых лиц. Установлено, что общей закономерностью нарушений цитокиновой регуляции аутоиммунного ответа у пациентов с нейросенсорной тугоухостью и вибрационной болезнью является гиперпродукция аутоАТ к регуляторным белкам нервной ткани (S-100, ОБМ, NF-200, GFAP, В-зав. Са-каналу) на фоне выраженной провоспалительной направленности иммунных реакций (увеличение IL-1 β , TNF α , IL-2, IL-8). Показано угнетение иммунного ответа у пациентов с хронической ртутной интоксикацией, характеризующееся нарушением выработки АТ, снижением сывороточной концентрации провоспалительного IL-1 β и противовоспалительного IL-4. Полученные результаты определяют необходимость проведения целенаправленной иммунотерапии для повышения эффективности лечения и восстановления после прекращения контакта с производственными вредностями.

Ключевые слова: профессиональная нейросенсорная тугоухость, вибрационная болезнь, хроническая ртутная интоксикация, аутоантитела к белкам нервной ткани, цитокины

DOI: 10.31857/S1027813321040026

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время приобретает особую значимость сохранение и укрепление здоровья работающего населения, которое является приоритетной задачей здравоохранения и социальной политики государства. В последние годы в Российской Федерации и в мире заболевания, обусловленные воздействием физических и химических факторов, по-прежнему занимают лидирующие позиции. В структуре профессиональных заболеваний ведущие места принадлежат вибрационной болезни и шумовой патологии, которые развиваются в самом трудоспособном возрасте и имеют тенденцию к росту [1–3]. Нейроинтоксикации парами ртути также продолжают оставаться актуальной проблемой нарушений здоровья человека, несмотря на закрытие многих предприятий, где пары металли-

ческой ртути являлись ведущим неблагоприятным фактором [4]. Известно, что развитие и течение вышеперечисленных заболеваний сопровождается нарушениями со стороны нервной системы, которые зависят от многих факторов (продолжительности, интенсивности воздействия, индивидуальных особенностей организма и др.). У лиц с нейросенсорной тугоухостью (НСТ) изменения в нервной системе характеризуются нарушением чувствительных нервных волокон внутреннего уха, слухового нерва и центральных образований слуховой системы [5]. При производственном воздействии вибрации в патологический процесс вовлечены мозжечок, стволые структуры, гипоталамус [6, 7]. Соединения ртути, обладая нейротоксичными и кумулятивными свойствами [8, 9] способствуют развитию дегенерации нервных клеток ЦНС: коры мозга, ретикулярной формации, а также периферических нервов [10, 11]. Важную роль в патогенезе неврологических нарушений при НСТ, ВБ, ХРИ

* Адресат для корреспонденции: 665827 Россия, Иркутская область, г. Ангарск, 12а м-н, д. 3, а/я 1170; тел.: +7(3955)58-69-10 (доб. 1411); e-mail: immun11@yandex.ru.

играют особенности нейроиммунных взаимодействий [12, 13]. В последние годы многочисленными исследованиями показано, что при многих патологических состояниях изменения в нервной системе сопровождаются развитием аутоиммунного ответа относительно регуляторных белков нервной ткани, а изменения в содержании вырабатываемых АТ с одной стороны могут стать одной из причин развития нейроиммунопатологии, а с другой — выступать в качестве эндогенных протективных веществ, участвующих в саногенетических механизмах [14, 15]. При этом выработка АТ находится под контролем цитокинов, локальная и системная продукция, которых является ключевым звеном межклеточных и межсистемных взаимодействий. В настоящее время не вызывает сомнений, что цитокины являются важнейшими факторами иммунопатогенеза различных заболеваний, а определение их концентраций в сыворотке крови позволяет получить информацию о функциональной активности иммунокомпетентных клеток, соотношении процессов активации Т-хелперов I и II типов, что очень важно при дифференциальной диагностике ряда иммунопатологических процессов [16]. Несмотря на то, что механизмы формирования профессиональных поражений нервной системы различны, клиническая картина их начальных проявлений может не отличаться или мало отличается от широко распространенных в популяции неврологических нарушений, сопровождающих многие заболевания другой этиологии [17]. В связи с этим, в последние годы большое внимание уделяется выявлению патогенетических особенностей развития поражений нервной системы при профессиональных заболеваниях для обоснования персонализированного подхода к их дифференциальной диагностике и лечению.

Цель исследования заключалась в сравнительном анализе изменений в содержании сывороточных концентраций нейрональных антител и цитокинов у пациентов с профессиональной патологией, сформировавшейся при воздействии физических (авиационный шум, вибрация) и химических (пары металлической ртути) факторов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведено лабораторно-иммунологическое обследование 135 мужчин с профессиональной патологией, которые находились на обследовании и лечении в клинике института. В первую группу включены 55 пациентов с установленным диагнозом нейросенсорной тугоухости (НСТ), обусловленной воздействием авиационного шума (персонал летного состава — пилоты-инструкторы, командиры воздушного судна, бортмеханики) в возрасте 52.0 ± 1.36 г. Вторая группа представлена 53 пациентами с вибрационной болезнью (ВБ), индуцированной локальной вибрацией и сочетанным воздействием

общей и локальной вибрации. В третью группу вошли лица ($n = 27$) с хронической ртутной интоксикацией (ХРИ), подвергавшихся в период трудовой деятельности хроническому воздействию паров металлической ртути (средний возраст 53.4 ± 0.8 г.). Клиническая верификация диагнозов осуществлялась врачами клиники в соответствии с Международной классификацией болезней 10-го пересмотра (МКБ-10). Критериями включения в основные группы было наличие установленного в период трудовой деятельности профессионального заболевания, отсутствие коморбидной патологии (ожирение, сахарный диабет, артериальная гипертензия и т.д.). Группа сравнения представлена 34 “условно” здоровыми лицами (средний возраст — 50.35 ± 1.69 лет), которые по специфике профессиональной деятельности не подвергались хроническому воздействию шума, вибрации и каких-либо химических факторов и не имели на момент исследования острых и хронических (в стадии обострения) заболеваний. Кровь для исследования у пациентов брали однократно при поступлении в стационар, натощак до проведения лечения, используя пробирки Vacutainer, которые центрифугировали при 1500 об./мин в течение 15 мин для получения сыворотки. Сыворотку отбирали в отдельные пробирки Эппендорф (Eppendorf) и хранили в низкотемпературной морозильной камере (Sanyo) при температуре -70°C . Определение АТ проводили с помощью стандартных тест-систем ЭЛИ-Нейро-Тест (Московского научно-производственного объединения “Иммункулус”, регистрационное удостоверение № ФСР 2009/04554 от 23.03.2009 г.) в соответствии с прилагаемой к набору инструкцией. Оценивали сывороточные концентрации АТ класса IgG к антигенам нервной ткани: нейрофиламентному протеину-200 (NF-200), глияльному фибриллярному кислому белку (GFAP), S-100, основному белку миелина (ОБМ), вольтажзависимому Са-каналу (В-зав. Са-канал). Концентрации цитокинов (IL-1 β , TNF α , IL-2, IL-8, IL-10, IL-4, INF γ) в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) на автоматическом ридере для стрипов и микропланшет ELx800 (BIO-TEK INSTRUMENTS, USA) с использованием тест-систем (ЗАО “Вектор-Бест”, г. Новосибирск). Лабораторные исследования для сравнительной оценки показателей во всех группах выполнены одновременно.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета прикладных программ “STATISTICA 6.0” (StatSoft, USA). Возраст обследованных пациентов представлен в виде средней (M) и ее ошибки (m). Проверку нормальности распределения выполняли с использованием критерия Шапиро—Уилкса. Результаты представлены в виде медианы (Me), нижнего (Q_{25}) и верхнего (Q_{75}) квартилей. Для определения значимости между независимыми выборками при ненормальном

распределении использовали критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.017$ и $p < 0.0085$ (при сравнении трех и четырех групп соответственно). Обследование пациентов проходило в соответствии с этическим стандартом Хельсинской декларации всемирной ассоциации “Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека”, с поправками 2000 г. и “Правилами клинической практики в Российской Федерации”, утвержденными Приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 г., с информированного согласия пациентов и по заключению местного этического комитета (протокол № 5 от 14.11.2012 г.).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Основываясь на результатах предыдущих исследований, свидетельствующих об изменении выработки АТ к белкам нервной ткани у работающих в условиях воздействия физических и химических факторов [15, 18], представляло определенный интерес проанализировать в сравнительном плане сывороточные концентрации наиболее информативных аутоАТ к белкам нервной ткани и цитокинов у пациентов с профессиональной НСТ, ВБ и ХРИ. Сравнительная оценка уровней нейрональных АТ (табл. 1) позволила выявить общие закономерности изменений у лиц с профессиональной патологией, обусловленной воздействием физических факторов. А именно, в группе лиц как с НСТ, так и с ВБ медианные значения показателей АТ к белкам S-100, ОБМ, NF-200, GFAP, В-зав. Са-каналу ткани были статистически значимо выше аналогичных показателей в группе сравнения. Обращает на себя внимание тот факт, что у пациентов с НСТ наблюдалось более выраженное ($p < 0.0085$) повышение уровней АТ, чем у лиц с ВБ.

Важно отметить, что в большинстве случаев избыточная продукция АТ, будучи вторичным явлением, отражает изменения в специализированных структурах нервной ткани. При этом возрастание продукции АТ направлено на активацию клиренса, утилизацию избытка соответствующих антигенов и является защитной реакцией. Вместе с тем, аномальное повышение продукции определенных аутоАТ или длительно сохраняющиеся высокие их уровни могут выступать инструментами иммунометаболических нарушений разной степени выраженности, вплоть до аутодеструктивных реакций [19]. Напротив, у лиц с ХРИ, сформировавшейся при хроническом воздействии паров ртути, установлено статистически значимое снижение выработки АТ к ОБМ и GFAP ($p < 0.0085$) и ярко выраженная тенденция к снижению уровней АТ к NF-200, В-зав. Са-каналу ($p < 0.03$) относительно группы сравнения. У пациентов с ХРИ при сопоставлении со сравни-

ваемыми группами (НСТ, ВБ) отмечены более низкие ($p < 0.0085$) значения показателей АТ к белкам S-100, ОБМ, NF-200, GFAP, В-зав. Са-каналу. Полученные результаты могут свидетельствовать о нарушении синтеза АТ, обусловленного дисфункцией иммунной системы и/или разрушением задействованных молекулярных компонентов нервной ткани, на которые могут вырабатываться АТ [14]. Для всестороннего, комплексного понимания функционирования специфического клеточного иммунного ответа у пациентов с профессиональной патологией, обусловленной воздействием физических и химических факторов целесообразным являлось, наряду с определением специфических антител, исследование антиген-индуцированной продукции биоактивных молекул – цитокинов, обеспечивающих регуляторные и эффекторные функции Т-клеток. Исследование функциональной активности антиген-специфических Т-клеток предоставляет важную информацию о функционировании иммунной системы. Сравнительная оценка цитокинового профиля у пациентов с профессиональной НСТ, ВБ и ХРИ также позволила выявить общие закономерности в изменении цитокинов и отличительные особенности. У лиц с НСТ и ВБ выявлено возрастание концентрации провоспалительного IL-1 β относительно группы сравнения ($p < 0.0085$). Между группами (НСТ и ВБ) различия не были статистически значимыми. При этом у лиц с ХРИ установлено снижение IL-1 β как относительно лиц группы сравнения, так и пациентов с ВБ ($p < 0.00001$). Следует отметить, что при ранее выполненных обследованиях пациентов с профессиональной патологией, сформировавшейся при хроническом воздействии токсических соединений алюминиевой промышленности, также зарегистрировано снижение IL-1 β [20]. Известно, что IL-1 β стимулируя синтез ПГЕ в гипоталамусе способствует развитию “воспалительной” и “нейропатической” реакций, вызывает депрессию, недомогание, социальную дезадаптацию, снижает расходование энергии и др. [16]. В настоящее время заболевания, при которых обсуждается патогенетическое значение IL-1 β , характеризуются развитием разнообразных клинических и лабораторных проявлений, ассоциирующихся с локальным и системным воспалением [21]. Поэтому подавление биологических эффектов IL-1 β с использованием генно-инженерных биологических препаратов в последние годы рассматривается как перспективный подход к лечению [22]. Аналогичные, как и для IL-1 β , закономерные изменения были выявлены для провоспалительного TNF α у лиц с НСТ и ВБ (увеличение сывороточных концентраций относительно группы сравнения при $p < 0.0085$). При этом у пациентов с НСТ наблюдалось более выраженное повышение указанного показателя по сравнению с пациентами с ВБ ($p < 0.001$) и группой сравнения ($p < 0.00001$).

Таблица 1. Сравнительная оценка нейрохимических показателей у пациентов с профессиональной патологией от воздействия физических и химических факторов, Ме (Q₂₅–Q₇₅)

Наименование показателей, ед. изм.	Пациенты с НСТ (1 группа)	Пациенты с ВБ (2 группа)	Пациенты с ХРИ (3 группа)	Группа сравнения (4 группа)
ОБМ, усл. ед.	0.652 (0.525–0.821) * $p = 0.00000$; • 1–2 $p = 0.01$	0.553 (0.436–0.679) * $p = 0.00000$; • 2–3 $p = 0.0000009$	0.175 (0.144–0.196) * $p = 0.000007$; • 1–3 $p = 0.00000$	0.300 (0.270–0.360)
GFAP, усл. ед.	0.836 (0.702–0.954) * $p = 0.00000$; • 1–2 $p = 0.002$	0.615 (0.50–0.854) * $p = 0.00000$; • 2–3 $p = 0.0000007$	0.274 (0.229–0.342) * $p = 0.0009$; • 1–3 $p = 0.000005$	0.368 (0.310–0.430)
S-100, усл. ед.	1.05 (0.930–1.14) * $p = 0.000001$; • 1–2 $p = 0.006$	0.836 (0.585–1.14) * $p = 0.000007$; • 2–3 $p = 0.000001$	0.378 (0.202–0.580) * $p = 0.03$; • 1–3 $p = 0.00000$	0.285 (0.240–0.410)
NF-200, усл. ед.	0.897 (0.695–0.974) * $p = 0.00000$; • 1–2 $p = 0.0005$	0.662 (0.536–0.818) * $p = 0.00000$; • 2–3 $p = 0.0000008$	0.272 (0.200–0.287) * $p = 0.03$; • 1–3 $p = 0.000008$	0.306 (0.250–0.320)
В-зав. Са кан., усл. ед.	0.914 (0.751–1.11) * $p = 0.00000$; • 1–2 $p = 0.004$;	0.731 (0.582–0.935) * $p = 0.000001$; • 2–3 $p = 0.0000003$	0.171 (0.153–0.200) * $p = 0.003$; • 1–3 $p = 0.000003$	0.215 (0.170–0.326)
IL-1 β , пг/мл	13.13 (7.95–49.1) * $p = 0.0000$; • 1–2 $p = 0.01$	11.49 (6.14–39.17) * $p = 0.0000$; • 2–3 $p = 0.00001$	0.27(0.01–2.9) * $p = 0.00001$;	3.4 (1.21–6.19)
IL-2, пг/мл	4.96 (2.55–6.91)	3.86 (2.38–6.55) • 2–3 $p = 0.00001$	2.8 (0.01–13.0)	4.22 (2.67–6.33)
IL-4, пг/мл	0.10 (0.01–4.63) * $p = 0.04$	0.01 (0.01–0.37)	0.01 (0.01–0.01) * $p = 0.005$; • 1–3 $p = 0.0011$	0.01 (0.01–0.69)
IL-8, пг/мл	10.69 (1.54–36.64) * $p = 0.04$; • 1–2 $p = 0.02$;	7.53 (5.49–21.79) * $p = 0.003$;	7.2 (2.6–16.5)	5.08 (1.41–13.40)
IL-10, пг/мл	0.86 (0.01–2.67) • 1–2 $p = 0.01$	0.25 (0.01–1.41)		0.01 (0.01–1.54)
TNF α , пг/мл	2.66 (1.64–4.01) * $p = 0.0000$; • 1–2 $p = 0.02$	1.87 (1.25–3.26) * $p = 0.001$; • 2–3 $p = 0.00001$	0.38 (0.01–2.3) • 1–3 $p = 0.002$	0.73 (0.01–1.47)
INF γ , пг/мл	0.01 (0.01–0.81) • 1–2 $p = 0.0000$	1.25 (0.01–9.56) * $p = 0.0000$; • 2–3 $p = 0.00001$	0.01(0.01–0.015)	0.01 (0.01–1.16)

Примечание: различия статистически значимы • — между группами; * — относительно группы сравнения при $p < 0.0085$.

У лиц с ХРИ наблюдалось статистически значимое снижение этого цитокина по сравнению с больными НСТ ($p < 0.002$) и ВБ ($p < 0.002$), а также тенденция к его снижению относительно группы сравнения. Что касается других провоспалительных цитокинов IL-8 и IL-2, то значения их во всех сравниваемых группах соответствовали контрольному диапазону, хотя IL-8 имел ярко выраженную тенденцию к возрастанию. Между сравниваемыми группами изменения отмечены лишь для IL-2, уровни которого были ниже в группе па-

циентов с ХРИ по сравнению с ВБ ($p < 0.00001$). Провоспалительные цитокины (IL-1 β , TNF α и др.) относятся к клеточным медиаторам воспаления и играют ключевую роль в его развитии, оказывая влияние на синтез простагландинов, фагоцитоз, пролиферацию и активацию фибробластов, пирогенный эффект [23]. Однако воспаление может выступать не только в качестве защитной реакции организма, но и играть важную роль в индукции патологических процессов в организме [24], что, по-видимому, характерно для большинства об-

следованных нами пациентов. Что касается INF γ , который помимо провоспалительных эффектов обладает и рядом противовоспалительных свойств, то изменения концентраций его в сыворотке крови имели разнонаправленный характер относительно группы сравнения. Нарастание концентраций зарегистрировано при ВБ ($p < 0.00001$) и тенденция к снижению при НСТ и ХРИ. Сопоставление INF γ между сравниваемыми группами показало статистически значимое снижение показателя у лиц с НСТ ($p < 0.001$) и ХРИ ($p < 0.00001$) по сравнению с ВБ. Важно отметить, что INF γ является уникальным цитокином, обеспечивающим взаимодействие множества клеточных систем посредством контроля транскрипции большого количества генов [25]. Нарушение функционирования системы INF γ может проявляться различными состояниями, в том числе и аутоиммунными заболеваниями различных органов и систем (ЦНС, ЖКТ, воспалительные заболевания кожи, опорно-двигательного аппарата, органов внутренней секреции и др.) [26]. В нашем случае возможность сниженной продукции INF γ при НСТ и ХРИ может быть результатом развития феномена истощения специфического иммунного ответа [27]. В то же время, соотнесение повышенной антиген индуцированной продукции INF γ с клинической картиной, характерной для ВБ не дает оснований говорить о наличии защитного иммунного ответа [28, 29]. Концентрации противовоспалительного IL-4 статистически значимо были выше у лиц с НСТ, чем при ВБ ($p < 0.003$) и ХРИ ($p < 0.0011$). При этом у пациентов с ХРИ снижались ($p < 0.005$) относительно группы сравнения в отличие от лиц с НСТ и ВБ. Для другого противовоспалительного IL-10 различия как при сопоставлении с группой сравнения, так и между группами не были обнаружены.

Совокупность полученных результатов анализа изменений сывороточных концентраций АТ и цитокинового профиля в сравниваемых группах позволяет заключить о гиперактивации иммунных реакций у пациентов с профессиональной патологией, обусловленной воздействием физических факторов (НСТ и ВБ) и угнетении иммунного ответа у лиц с ХРИ.

Таким образом, общей закономерностью нарушений цитокиновой регуляции аутоиммунного ответа у пациентов с профессиональной патологией, обусловленной воздействием физических факторов (НСТ и ВБ), является гиперпродукция ауто-АТ к регуляторным белкам нервной ткани (S-100, ОБМ, NF-200, GFAP, В-зав. Са-каналу) на фоне выраженной провоспалительной направленности иммунных реакций (увеличение IL-1 β , TNF α , IL-2, IL-8). Напротив, при ХРИ установлено угнетение иммунного ответа, характеризующегося нарушением выработки АТ, снижением уровней провоспалительного IL-1 β и противовоспалительного IL-4. Полученные результаты исследования опре-

деляют необходимость проведения целенаправленной иммунотерапии для повышения эффективности лечения и восстановления после прекращения контакта с производственными вредностями.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет финансовых средств, выделенных в рамках Государственного задания ФГБНУ ВСИМЭИ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Этическое одобрение. Обследование пациентов соответствовало этическим стандартам в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (2000) и “Правилами клинической практики в РФ”, утвержденными Приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 г.

Информированное согласие. Исследования выполнены с информированного согласия пациентов на участие в них и одобрено Этическим комитетом ВСНЦ ЭЧ СО РАМН (Протокол № 5 от 14.11.12).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Панкова В.Б., Скрябина Л.Ю., Каськов Ю.Н. // Вестник оториноларингологии. 2016. Т. 8. № 11. С. 13–18.
2. Левашов С.П. // Проблемы анализа риска. 2012. Т. 9. № 6. С. 54–66.
3. Тарасова Н.В., Корженкова А.В. // Вестник медицинского института РЕАВИЗ. 2011. № 3. С. 20–26.
4. Малов А.М., Сибиряков В.К., Муковский Л.А., Семенов Е.В. // Известия Самарского научного центра Российской академии. 2014. Т. 16. № 5(2). С. 907–910.
5. Дроздова Т.В. // Российская оториноларингология. 2007. Т. 12. № 6. С. 61–65.
6. Кулешова М.В., Панков В.А., Дьякович М.П., Рукавишников В.С., Сливницына Н.В., Казакова П.В., Бочкин Г.В. // Гигиена и санитария. 2018. Т. 97. № 10. С. 915–920.
7. Катаманова Е.В., Бичев С.С., Нурбаева Д.Ж. // Acta Biomedica Scientifica. 2012. № 1(83). Р. 32–36.
8. Ильченко И.Н. // Здравоохранение Российской Федерации. 2015. № 59(1). С. 48–53.
9. Steckling N., Tobollik M., Plass D., Hornberg C., Ericson B., Fuller R. // Ann. Glob. Health. 2017. № 83(2). Р. 234–247.
10. Катаманова Е.В., Шевченко О.И., Лахман О.Л., Ещина И.М. // Фундаментальные исследования. 2014. № 10(5). С. 888–892.
11. Cao B., Lee W., Jin S., Tang J., Wang S., Zhao H., Guo H., Su J., Cao X. // Neurol. Sci. 2013. № 34(5). Р. 663–669.
12. Bodienkova G.M., Kurchevenko S.I. // Bulletin of Siberian Medicine. 2020. V. 19. № 2. Р. 6–12.

13. Боклаженко Е.В., Бодиевкова Г.М., Русанова Д.В. // Медицинская иммунология. 2019. Т. 21. № 6. С. 1197–1202.
14. Полетаев А.Б. // Молекулярная диспансеризация (новые подходы к раннему проявлению патологических изменений в организме человека: методические рекомендации для врачей. М.: “Иммункулус”, 2014. 80 с.
15. Bodienkova G.M., Kurchevenko S.I., Rusanova D.V. // *Neurochemical J.* 2019. V. 12. № 3. P. 275–279.
16. Насонов Е.Л., Елисеев М.С. // Научно-практическая ревматология. 2016. Т. 54. № 1. С. 60–77.
17. Катаманова Е.В., Шевченко О.И., Лахман О.Л., Брежнева И.А., Проскоков К.М. // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2012. № 1(83). С. 26–31.
18. Бодиевкова Г.М., Боклаженко Е.В. // Нейрохимия. 2020. Т. 37. № 1. С. 88–96.
19. Орлова В.А., Михайлова И.И., Минутко В.Л., Симонина А.В. // Социальная и клиническая психиатрия. 2015. Т. 25. № 4. С. 45–53.
20. Бодиевкова Г.М., Боклаженко Е.В., Бодиевкова С.Г., Бейгель Е.А. // Биомедицинская химия. 2018. Т. 64. № 4. С. 376–379.
21. Schett G., Dayer J.-M., Manger B. // *Nat. Rev. Rheumatol.* 2016. № 12(1). P. 14–24.
<https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.166>
22. Cavalli G., Dinarello C.A. // *Rheumatology (Oxford)*. 2015. № 54. P. 2134–2144.
<https://doi.org/10.1093/rheumatology/kev269>
23. Brito H.O., Barbosa F.L., Reis R.C.D., Fraga D., Borges B.S., Franco C.R.C., Zamprônio A.R. // *J. Neuroimmun.* 2016. V. 293. P. 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.01.016>
24. Bodmer J.-L., Schneider P., Tschopp J. // *Trends Biochem. Sci.* 2002. V. 27. № 1. P. 19–26.
25. Billiau A., Matthys P. // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009. V. 20. № 2. P. 97–113.
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.02.004>
26. Kelchtermans H., Billiau A., Matthys P. // *Trends Immunol.* 2008. V. 29. № 10. P. 479–486.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2008.07.002>
27. Луцкий А.А., Жирков А.А., Лобзин Д.Ю., Рао М., Алексеева Л.А., Мейер М., Лобзин Ю.В. // Журнал инфектологии. 2015. Т. 7. № 4. С. 10–22.
<https://doi.org/10.22625/2072-6732-2015-7-4-10-22>
28. Schlingmann T.R., Shive C.L., Targoni O.S., Tary-Lehmann M., Lehmann P.V. // *Cell Immunol.* 2009. V. 258. № 2. P. 131–137.
<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2009.04.002>
29. Roche P.A., Furuta K. // *Nat. Rev. Immunol.* 2015. V. 15. № 4. P. 203–216.
<https://doi.org/10.1038/nri3818>
30. Шевченко О.И., Лахман О.Л., Русанова Д.В., Тихонова И.В. // Вестник оториноларингологии. 2020. Т. 85. № 5. С. 33–39
<https://doi.org/10.17116/otorino20208505133>

Comparative Assessment of Neurochemical Indicators in Patients with Occupational Pathology Due To Physical and Chemical Factors

G. M. Bodienkova^a and E. V. Boklazhenko^a

^a*Federal State Budgetary Scientific Institution “East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research”, Angarsk, Russia*

The aim of the study was to compare changes in serum concentrations of neuronal antibodies and cytokines in patients with occupational pathology formed by exposure to physical (aviation noise, vibration) and chemical (metal mercury vapor) factors. In the conditions of the clinic, an examination was carried out of men with professional neurosensory hearing loss ($n = 55$), vibration disease ($n = 53$), chronic mercury intoxication ($n = 27$) and 34 “conditionally” healthy persons. It is established that the general regularity of violations of cytokine regulation of the autoimmune answer at patients with neurotouch relative deafness and a vibration disease is hyperproduction autoAB to regulatory proteins of nervous tissue (S-100, MBP, NF-200, GFAP, voltage-dependent.Ca-channel) against the background of the expressed pro-inflammatory orientation of immune reactions (increase in IL-1 β , TNF α , IL-2, IL-8). Inhibition of immune response in patients with chronic mercury intoxication is shown, characterized by impaired AB production, decreased serum concentration of proinflammatory IL-1 β and anti-inflammatory IL-4. Obtained results determine necessity of carrying out targeted immunotherapy to increase efficiency of treatment and recovery after termination of contact with industrial pests.

Keywords: professional neurosensory hearing loss, vibratory disease, chronic mercury intoxication, autoantibodies to nerve tissue proteins, cytokines