

Рефераты

Подавление экспрессии мутантного гена при болезни Гентингтона

С 1989 г. компания Ionis Pharmaceuticals занимается разработкой применения антисмысловых олигонуклеотидов (АСО) при различных заболеваниях, в том числе для блокирования синтеза мРНК гентингина при болезни Гентингтона. В июле 2015 г. стартовало первое исследование I/IIa фазы IONIS-HTT_{Rx} по применению АСО у человека на ранних стадиях болезни Гентингтона с целью оценки безопасности, переносимости и фармакокинетики их интратекального введения. По результатам экспериментов на мышах R6/2, YAC128 и BACHD, снижение синтеза гентингина (в том числе его мутантной формы) приводит к торможению прогрессирования заболевания и улучшению выполнения целого ряда тестов. Тем не менее подобный терапевтический подход имеет некоторые ограничения: потенциальную необходимость повторного введения препарата и целесообразность селективного блокирования экспрессии мутантного аллеля. Согласно результатам исследований, максимальное уменьшение содержания мРНК наблюдается спустя 2 нед после введения препарата. У мышей на восстановление прежнего уровня экспрессии гентингина требуется 12–16 нед, в связи с чем в исследовании у человека было решено вводить препарат ежемесячно. Вместе с тем не исключено, что достаточным будет более редкое введение. Необходимо отметить, что на животных моделях осуществлялись попытки проводить и аллельспецифическое подавление экспрессии мутантного ген-

тинтина, однако не было отмечено преимуществ такого подхода по сравнению с аллельнеспецифическим. По данным доклинических испытаний на мышах и нечеловекообразных приматах, применение АСО было безопасным. Исследование I/IIa фазы IONIS-HTT_{Rx} по применению АСО у людей на ранних стадиях БГ – первое в своем роде и довольно небольшое: в него планируется включить 36 человек из Канады, Великобритании и Германии. Пока исследование идет по плану. Пациентам будут вводить препарат 4 раза интратекально в течение 3 мес, после чего последует 4-месячный период наблюдения. Учитывая специфику исследования, его первичные конечные точки отражают параметры безопасности и переносимости. К вторичным конечным точкам относятся содержание АСО и мутантного гентингина в цереброспинальной жидкости и ряд других показателей. Результаты этого исследования ожидаются с большим интересом.

Safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of IONIS-HTT_{Rx} in patients with early manifest Huntington's disease [NCT02519036]. 2015 // <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02519036>

Роль астроцитов в патогенезе болезни Гентингтона

Понимание механизмов, лежащих в основе развития неврологических и психиатрических проявлений различных заболеваний, остается одной из важнейших задач современной нейронауки. Значительный прогресс достигнут в изучении роли нейронов в работе головного мозга в норме и при патологии. Роль же астроцитов,

составляющих почти половину клеток головного мозга человека, напротив, до сих пор до конца не установлена. Результаты последних исследований свидетельствуют о том, что астроциты необходимы для нормального функционирования нейронных цепей. Вместе с тем, влияет ли нарушение функции астроцитов на течение болезни Гентингтона, остается до конца не выясненным. В недавних исследованиях было выявлено, что астроциты могут быть вовлечены в патогенез этого заболевания. Так, обнаружено, что мутантный гентингин накапливается в астроцитах полосатого тела головного мозга как у пациентов с болезнью Гентингтона, так и у соответствующих трансгенных мышей. Х. Tong et al. изучали влияние дисфункции астроцитов на патофизиологию этого заболевания на мышинных моделях болезни Гентингтона R6/2 и Q175. Было выяснено, что дебют заболевания сопровождается значительным увеличением содержания в астроцитах мутантного гентингина и снижением содержания функционально значимых белков (например, мембранного калиевого канала Kir4.1). Эти данные свидетельствуют о том, что мутантный гентингин ассоциирован с ранним нарушением экспрессии функционально значимых астроцитарных белков, что влияет на функцию астроцитов, не провоцируя, однако, астроглиоз. При этом наблюдалось прогрессирующее увеличение выраженности астроглиоза на поздних стадиях болезни Гентингтона в головном мозге как у мышей, так и у человека, что отражает нарастание нейродегенеративных изменений. Уменьшение

синтеза Kir4.1 приводит к снижению буферной способности в отношении калия и повышению его внеклеточного содержания: так, у мышей R6/2 содержание внеклеточного калия повышалось в 2 раза. Это, в свою очередь, приводило к повышенной возбудимости средних шипиковых нейронов полосатого тела. Затем с использованием аденоассоциированных вирусов мышам R6/2 вводили последовательности, кодирующие каналы Kir4.1–GFP, в астроциты полосатого тела. Это привело к улучшению ширины и длины шага у мышей. Было выявлено также, что экспрессия Kir4.1–GFP в астроцитах у мышей R6/2 приводила к восстановлению нарушенных свойств клеточной мембраны средних шипиковых нейронов. Таким образом, было установлено, что в основе нарушенной возбудимости средних шипиковых нейронов лежит нарушение способности астроцитов поддерживать содержание внеклеточного калия, что потенциально может являться новой терапевтической мишенью при болезни Гентингтона.

Tong X., Ao Y., Faas G.C. et al. Astrocyte Kir4.1 ion channel deficits contribute to neuronal dysfunction in Huntington's disease model mice // Nat. Neurosci. 2014. V. 17. P. 694–703.

Экспансия в гене *C9orf72* и фенкопии болезни Гентингтона

Примерно у 1% пациентов с подозрением на болезнь Гентингтона носительство мутации в гене *HTT* не подтверждается – это случаи так называемых фенкопий, дифференциально-диагностический поиск для которых проводится среди довольно широкого спектра заболеваний. Гексануклеотидная экспансия в интронной части гена *C9orf72* в норме составляет до 30 повторов и может повышаться до сотен и тысяч повторов. Функция этого гена остается

невьясненной – считается, что его деятельность связана с мембранным транспортом. Впервые роль интронной гексануклеотидной экспансии *C9orf72* в развитии нейродегенеративного процесса была выявлена в 2011 г. при лобно-височной деменции и боковом амиотрофическом склерозе. В дальнейшем было установлено, что такая экспансия *C9orf72* может приводить к развитию и других синдромов, в частности мозжечковых атаксий. D.J. Hensman Moss et al. обследовали 514 пациентов с клинической картиной болезни Гентингтона, но отрицательных по мутации *HTT* на наличие гексануклеотидной экспансии в гене *C9orf72*. Она была выявлена у 10 пациентов (1,95%) в сочетании с рисковым аллелем rs3849942 A (либо в гомозиготном, либо в гетерозиготном состоянии). Величина экспансии статистически значимо не отличалась от таковой при иных *C9orf72*-ассоциированных синдромах. Она также не различалась между синдромами с хореей/дистонией или без нее. Было сделано заключение, что гексануклеотидная экспансия в гене *C9orf72* на сегодняшний день – наиболее часто выявляемая (почти 2%) причина фенкопий болезни Гентингтона в Великобритании. При этом у 70% обследованных семейный анамнез был отягощен по нейродегенеративным заболеваниям. Таким образом, *C9orf72*-ассоциированные синдромы могут манифестировать довольно широким спектром клинических проявлений, включая симптомы, напоминающие болезнь Гентингтона, что необходимо учитывать при проведении дифференциально-диагностического поиска в случаях хорей неясного генеза.

Hensman Moss D.J., Poulter M., Beck J. et al. C9orf72 expansions are the most common genetic cause of Huntington disease phenocopies // Neurology. 2014. V. 82. P. 292–299.

Аутофагосомы при болезни Гентингтона

Аутофагия является одним из главных клеточных путей деградации поврежденных органелл и белковых агрегатов. Она сопровождается формированием аутофагосом, которые затем сливаются с лизосомами, приводя к деградации “груза” фагосом. Аутофагосомы постоянно образуются в окончаниях аксонов нейронов, а затем посредством обратного аксонального тока транспортируются к телу клетки. В процессе этого транспорта аутофагосомы проходят процесс созревания и постепенно подвергаются окислению вследствие слияния с лизосомами. Ретроградный транспорт регулируется белком ретроградного движения динеином и рядом других веществ. По данным многих работ, нарушенные процессы аутофагии являются одним из звеньев патогенеза болезни Гентингтона, так как растворимые и нерастворимые агрегаты мутантного гентингтина утилизируются преимущественно именно этим путем. Гентингтин и его адаптерный белок (гентингтин-ассоциированный белок-1, англ. huntingtin-associated protein-1, HAP1) могут связываться с двигательными белками и регулировать везикулярный транспорт, осуществляющийся при участии микротрубочек. Это достигается за счет того, что гентингтин связывается с динеином, а HAP1 – с кинезином (белком anterograde транспорта) и динактином (адаптерным белком ретроградного транспорта). Y.C. Wong, E.L. Holzbaug установили, что гентингтин и HAP1 являются регуляторами аксонального транспорта аутофагосом. В экспериментах они использовали визуализацию в культуре живых первичных нейронов, полученных от трансгенных мышей GFP-LC3. Было выявлено, что уменьшение содержания в нейронах как гентингтина, так и HAP1 приводит к



снижению ретроградной подвижности аутофагосом и повышению количества неподвижных аутофагосом по ходу аксона. Более того, экспрессия гентингина с измененной структурой, неспособного связываться с динеином или HAP1, также приводила к схожему нарушению транспорта аутофагосом. Это доказывает, что гентингин образует комплекс с HAP1 и динеином для регуляции последовательного транспорта аутофагосом в нейронах. Помимо этого было установлено, что экспрессия мутантного гентингина как в первичных нейронах, так и в клетках полосатого тела, полученных от гомозиготных нокин-мышинных (knock-in) моделей болезни Гентингтона, приводила к нарушению аксонального транспорта аутофагосом и их обездвиживанию. Примечательно, что как нормальный, так и мутантный гентингин взаимодействовали преимущественно с нейронспецифической изоформой динеина (DIC1A), а не с повсеместно экспрессируемой изоформой DIC2C. Это доказывает, что динеин-опосредованный транспорт аутофагосом может избирательно нарушаться в нейронах и вносить свой вклад в избирательную нейрональную дегенерацию при болезни Гентингтона. Кроме того, изучали возможность влияния нарушения регуляции аксонального транспорта аутофагосом на восходящий и нисходящий этапы процесса аутофагии. Было обнаружено, что гентингин не требовался ни для непрерывного образования аутофагосом в окончании аксона, ни для упаковки убиквитинированных белков и митохондрий в непрерывно образующиеся аутофагосомы. В то же время в нейронах с пониженным содержанием нормального гентингина, экспрессирующих мутантный гентингин, отмечалось нарушение транспорта аутофагосом, что приводило к неэффектив-

ной нисходящей деградации “груза” аутофагосом (например, поглощенных фрагментов митохондрий). Полученные результаты свидетельствуют о том, что нарушение регуляции активного транспорта аутофагосом вдоль аксона при болезни Гентингтона может вносить свой вклад в неэффективное созревание аутофагосом и деградиацию “груза”, по-видимому, за счет ингибирования слияния аутофагосом и лизосом на протяжении аксона. Это приводило к нарушению клиренса “груза”, включая олигомеры мутантного гентингина и его агрегаты; при этом митохондриальная дисфункция могла усугублять их нейрональную аккумуляцию, ускоряя тем самым нейродегенерацию.

Wong Y.C., Holzbaur E.L.
The regulation of autophagosome dynamics by huntingtin and HAP1 is disrupted by expression of mutant huntingtin, leading to defective cargo degradation // J. Neurosci. 2014. V. 34. P. 1293–1305.

Стимуляция A_{2A} -аденозиновых рецепторов тормозит апоптоз при болезни Гентингтона

A_{2A} -аденозиновые рецепторы широко представлены в головном мозге, однако наибольшая их плотность приходится на полосатое тело. F.L. Chiu et al. установили, что стимуляция A_{2A} -аденозиновых рецепторов в культуре клеток-моделей болезни Гентингтона обладает положительным антиапоптотическим действием. Исследователи использовали индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, полученные от здоровых добровольцев и пациентов с болезнью Гентингтона, которые были дифференцированы в ГАМКергические DARPP32-нейроны, экспрессирующие на своей поверхности A_{2A} -аденозиновые рецепторы. Подобная модификация делает их

похожими на средние шипиковые нейроны полосатого тела. Стимулируя эти рецепторы, наблюдали за тем, как это влияет на две клеточные линии. При этом клетки подвергались воздействию пероксида водорода для индуцирования окислительного стресса, вследствие которого происходили разрывы двухцепочечных молекул ДНК. Выяснилось, что количество разрывов ДНК было значительно больше в нейронах, полученных из клеток пациентов с болезнью Гентингтона. Примечательно, что воздействие на культуры клеток агонистами A_{2A} -рецепторов привело к улучшению фенотипа дифференцированных нейронов посредством активации протеинкиназы А, активность которой зависит от содержания циклического аденозинмонофосфата в клетке. Предложено использовать описанную платформу для скрининга новых лекарственных препаратов.

Chiu F.L., Lin J.T., Chuang C.Y. et al.
Elucidating the role of the A2A adenosine receptor in neurodegeneration using neurons derived from Huntington's disease iPSCs // Hum. Mol. Genet. 2015. V. 24. P. 6066–6079.

Генетические факторы, влияющие на возраст дебюта болезни Гентингтона

Как известно, величина CAG-экспансии в 1-м экзоне гена *HTT* до некоторой степени определяет возраст клинической манифестации болезни Гентингтона, однако эта закономерность не является точной, что свидетельствует о наличии и других генетических и, возможно, внешних факторов, взаимодействующих с мутацией в гене болезни. С целью выявления других генетических факторов, влияющих на возраст дебюта болезни Гентингтона, Консорциум по изучению генетических модификаторов болезни Гентингтона (Genetic Modifiers of Huntington's

Disease (GeM-HD) Consortium) предпринял попытку проведения полногеномного поиска ассоциаций (GWAS), при этом в качестве генетических маркеров использовали однонуклеотидные полиморфизмы (SNP). У 4082 пациентов с болезнью Гентингтона были взяты образцы ДНК. Выяснилось, что два варианта в локусе на 15-й хромосоме могут определять два независимых типа влияния на возраст дебюта заболевания: либо ускорять его на 6,1 года (rs146353869), либо отсрочивать на 1,4 года (rs2140734). Вариант в другом локусе на 8-й хромосоме (rs1037699) может ускорять наступление болезни Гентингтона на 1,6 года. Помимо этого близким к порогу статистической значимости при GWAS-исследовании оказался SNP rs144287831, локализованный на 3-й хромосоме. При анализе возможных патогенетических путей, обусловленных выявленными полиморфизмами, было установлено, что на возраст дебюта болезни Гентингтона может оказывать влияние нарушение процессов поддержания нормальной структуры и репарации ДНК.

Genetic Modifiers of Huntington's Disease (GeM-HD) Consortium. Identification of genetic factors that modify clinical onset of Huntington's disease // Cell. 2015. V. 162. P. 516–526.

Роль тау-белка в патогенезе и формировании особенностей клинической картины болезни Гентингтона

Вопрос генетических модификаторов болезни Гентингтона является одним из наиболее актуальных и противоречивых на сегодняшний день. Выявлено, что более 24 генов могут так или иначе влиять на клинические и патогенетические особенности течения болезни Гентингтона. R. Vuono et al. продемонстрировали, что ген *MAPT*,

кодирующий тау-белок, необходимый для нормального функционирования микротрубочек, может быть ассоциирован с развитием патологического процесса при болезни Гентингтона. Так, по данным аутопсии было установлено, что в головном мозге у пациентов с этим заболеванием обнаруживаются скопления патологических изоформ тау-белка и его олигомеров (которые считаются наиболее токсичными вариантами тау-белка). Причем эти изменения отмечались как у пожилых пациентов с болезнью Гентингтона, так и у больных с ранним началом этого заболевания; это свидетельствует о том, что таупатия отражает именно течение нейродегенеративного процесса, а не возрастные особенности. Подчеркивается клиническая значимость выявленных изменений: на большой когорте пациентов с болезнью Гентингтона удалось показать, что один из генетических вариантов гена *MAPT* (гаплотип H2) влияет на выраженность когнитивных нарушений. Указанные особенности могут создавать предпосылки для поиска новых терапевтических мишеней при этом тяжелом нейродегенеративном заболевании.

Vuono R., Winder-Rhodes S., de Silva R. et al. The role of tau in the pathological process and clinical expression of Huntington's disease // Brain. 2015. V. 138. Pt. 7. P. 1907–1918.

Ультрасенситивный метод измерения содержания гентингина в цереброспинальной жидкости

Нехватка надежных и точных количественных биомаркеров, которые можно было бы использовать для диагностики ранних субклинических стадий болезни Гентингтона, является одним из основных лимитирующих факторов в разработке болезньюмодифицирующих терапевтических подходов. Такие био-

маркеры необходимы для отслеживания прогрессирования заболевания, стратификации пациентов и оценки эффективности проводимого лечения. Решением этой проблемы может быть количественное определение мутантного гентингина в центральной нервной системе. Вместе с тем мутантный гентингин накапливается в основном внутри клеток, и его концентрация в цереброспинальной жидкости крайне низкая. E.J. Wild et al. разработали новый ультрасенситивный метод, позволяющий регистрировать каждую молекулу мутантного гентингина в ликворе. В этом методе используются специфические антитела, связывающиеся только с мутантным, но не с нормальным гентингином; эти антитела мечены флуоресцирующим веществом. Каждый флуоресцентный сигнал соотносится с одной молекулой, что обеспечивает возможность точной оценки содержания гентингина в фемтомолярных концентрациях. Была исследована цереброспинальная жидкость, полученная от здоровых добровольцев и носителей мутации болезни Гентингтона. Было установлено, что содержание мутантного гентингина у асимптомных носителей мутации занимало промежуточное положение между таковым у здоровых добровольцев и симптомных носителей мутации. Более того, концентрация мутантного гентингина имела независимое прогностическое значение в отношении количества баллов отягощенности заболеванием и баллов по двигательной и когнитивным шкалам. Определяемый в цереброспинальной жидкости мутантный гентингин появляется в ней из гибнущих нейронов головного мозга. Дальнейшего исследования требуют вопросы о возможности использования этого метода количественного определения мутантного гентингина для прогнозирования возраста дебюта болезни



Гентингтона и темпов ее прогрессирования.

Wild E.J., Boggio R., Langbehn D. et al. Quantification of mutant huntingtin protein in cerebrospinal fluid from Huntington's disease patients // J. Clin. Invest. 2015. V. 125. P. 1979–1986.

Поиск надежных конечных точек для клинических исследований болезньмодифицирующих подходов при болезни Гентингтона

Правильный и аргументированный выбор конечных точек в клиническом исследовании является залогом получения ценной информации в ходе его проведения. N.Z. Hobbs et al. изучали показатели, которые могут быть кандидатами на роль конечных точек в клинических исследованиях болезньмодифицирующих подходов к лечению болезни Гентингтона в 6-, 9- и 15-месячные интервалы времени. Были проанализированы клинические, когнитивные и нейровизуализационные (при исследовании на магнитно-резонансной томографе с величиной магнитной индукции 3 Т) показатели в группах здоровых добровольцев (n = 40) и пациентов с болезнью Гентингтона (n = 61), которым проводились соответствующие исследования при исходном обследовании, а также спустя 6 и 15 мес. Нейровизуализационный анализ включал в себя оценку общих и региональных макроструктурных изменений вещества головного мозга (объем отдельных структур и толщина коры) и его микроструктурных изменений, оцениваемых при проведении диффузионно-тензорной магнитно-резонансной томографии. Показателем эффективности использования параметра в качестве конечной точки была долгосрочная величина эффекта (effect size), поскольку ее знание позволяет рассчитывать необходимый для кли-

нического исследования объем выборки. Долгосрочными макроструктурными изменениями при нейровизуализационном обследовании оказались атрофия хвостатого ядра и расширение желудочков головного мозга, которые были значительно более выраженными у пациентов с болезнью Гентингтона по сравнению с группой здоровых добровольцев. Это отражалось в большой величине эффекта в 6-, 9- и 15-месячные интервалы времени. Аналогичные величины эффекта для измерений толщины коры головного мозга были меньше, с более широкими доверительными интервалами. Величины эффекта микроструктурных изменений головного мозга также были меньше в более короткие временные интервалы. Клинические и когнитивные показатели продемонстрировали малые долгосрочные величины эффекта (особенно в 6- и 9-месячные периоды) с широкими доверительными интервалами, что делает их менее точными. Был сделан вывод, что нейровизуализационные параметры (в частности, атрофию хвостатого ядра) следует рассматривать как кандидатов на выбор в качестве краткосрочных показателей в 6–9-месячных исследованиях по проверке концепции и в качестве вторичных конечных точек эффективности в течение более длительных промежутков времени (15 мес).

Hobbs N.Z., Farmer R.E., Rees E.M. et al. Short-interval observational data to inform clinical trial design in Huntington's disease // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 2015. V. 86. P. 1291–1298.

Употребление кофеина может ускорять дебют болезни Гентингтона

Данные эпидемиологических исследований свидетельствуют о том, что регулярное употребление кофеина снижает риск развития болезни Паркинсона и болезни

Альцгеймера. Кофеин является неселективным антагонистом аденозиновых рецепторов. Рядом исследовательских групп на мышиных моделях была показана роль A₁- и A_{2A}-аденозиновых рецепторов в модуляции двигательных симптомов болезни Гентингтона и (или) течения нейродегенеративного процесса. В связи с этим можно предполагать, что регулярное употребление кофеина может быть одним из факторов внешней среды, влияющих на проявления болезни Гентингтона, тем более что величина CAG-экспансии определяет возраст дебюта этого заболевания лишь на 60–70%. C. Simonin et al. изучали возможную зависимость возраста дебюта болезни Гентингтона и функциональных/двигательных нарушений в когорте из 80 пациентов с этим заболеванием от употребления кофеина. Для выяснения объема употребления кофеина использовали специальный опросник по определению рациона. При проведении анализа после введения поправок на пол, курение и величину CAG-экспансии выяснилось, что употребление кофеина в дозе более 190 мг/сут было ассоциировано с более ранним возрастом дебюта болезни Гентингтона. Примерная разница в возрасте манифестации заболевания у лиц, употреблявших кофеин в дозе менее 190 мг/сут, и у лиц, употреблявших больше кофеина, составила около 4 лет. Это одно из немногих исследований по влиянию факторов внешней среды на течение болезни Гентингтона. Учитывая, что кофеин является наиболее широко употребляемым психоактивным веществом в мире, полученные данные нуждаются в дальнейшей проверке на большем количестве носителей мутации.

Simonin C., Duru C., Salleron J. et al. Association between caffeine intake and age at onset in Huntington's disease // Neurobiol. Dis. 2015. V. 58. P. 179–182.