

НОВОСТИ НАУКИ

©Веселовский А.В.

ИНГИБИТОРЫ ДВОЙНОГО ДЕЙСТВИЯ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ И АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ ПРИ ЛЕЧЕНИИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА.

А.В. Веселовский

ГУ НИИ Биомедицинской химии РАМН им. В.Н.Ореховича,
119121 Москва, ул. Погодинская, 10; тел. (095)246-7115; факс (095)245-0857;
эл. почта veselov@ibmh.msk.su

Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой нейродегенеративное заболевание, которое является основной причиной сенильной деменции. Она характеризуется мультифакторной природой патогенеза и цитологически проявляется в образовании многочисленных бляшек, состоящих из β -амилоидного пептида, нейрофибриллярных клубков, а также дегенерацией нейронов головного мозга. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в последние годы в установлении процессов, лежащих в основе болезни Альцгеймера, окончательные причины, вызывающие это заболевание, не установлены.

В настоящее время ведущую роль в патогенезе БА отводят увеличению уровня секреции β -амилоидного пептида, который является компонентом бляшек и нейрофибриллярных клубков [1]. Этот пептид образуется в результате протеолитического расщепления большого трансмембранного белка-предшественника, который конститутивно экспрессируется в клетках многих типов. Избыточное образование амилоидного пептида и отложение его в бляшках может представлять ключевой процесс, который приводит к заболеванию. Поэтому данный пептид рассматривается в качестве первичной мишени при разработке новых подходов для эффективной терапии, включающей применение ингибиторов β - и γ -секретаз, которые могли бы предотвращать образование патогенного пептида [2], а также ингибиторов агрегации пептидов [3].

Кроме образования амилоидных бляшек характерной особенностью проявления болезни Альцгеймера является дегенерация нейронов головного мозга [4]. Дефицит в холинэргической нейротрансмиссии рассматривается как одна из основных причин ослабления памяти у больных. Поэтому ингибиторы ацетилхолинэстеразы (АХЭ) применяются для симптоматического лечения БА. В настоящее время ряд ингибиторов АХЭ используют в клинической практике для уменьшения расстройств памяти при болезни Альцгеймера: в России - физостигмин, амиридин [5], за рубежом - такрин, донепезил, галантамин и ривастигмин [6].

НОВОСТИ НАУКИ

АХЭ в основном локализована вместе с амилоидными бляшками и способна увеличивать агрегацию амилоидного пептида [7]. Было показано, что ингибиторы АХЭ, взаимодействующие с периферическим местом связывания, кроме блокирования работы этого фермента, могут ингибировать образование β -амилоидного пептида [8-10].

Однако, кроме основных проявлений при болезни Альцгеймера, наблюдаются другие нарушения, которые могут лежать в основе или способствовать расстройству памяти и нарушений в поведении, сопровождающих это заболевание. В частности, в мозге больных было показано снижение числа норадренергических нейронов [11]. Считается, что это является ранним проявлением заболевания, способствующим дальнейшему развитию БА [12]. Кроме того, дефицит норадренергических нейронов коррелирует с проявлением депрессии у БА больных [13, 14]. При этом наблюдается трехкратное увеличение активности моноаминоксидазы (МАО). Это увеличение активности также коррелирует с развитием амилоидных бляшек [15]. Многие эффективные антидепрессанты проявляют свойства слабых холинэргических антагонистов [16, 17], поэтому их использование в терапии БА ограничено.

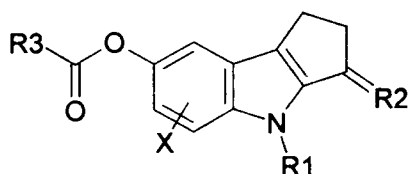
В связи с этим разработка нового поколения ингибиторов АХЭ и МАО двойного действия представляется перспективной задачей. Недавно опубликованы первые удачные результаты по поиску таких ингибиторов. Кроме того, появившиеся в последние годы данные о пространственной структуре комплексов МАО Б с обратимыми и необратимыми ингибиторами [18-20] позволяют проводить направленный поиск ингибиторов для АХЭ и МАО более эффективно. Оба фермента, несмотря на разную функцию и пространственную структуру белка, имеют схожую структуру активных центров. Активные центры этих ферментов представляют собой близкого размера каналы, направленные вглубь белковой глобулы, которые характеризуются повышенным содержанием гидрофобных и ароматических аминокислотных остатков.

Для разработки ингибиторов двойного действия можно применять две стратегии. Первая заключается в использовании в качестве базовой структуры высокоэффективного ингибитора одного фермента, к которому присоединяют заместители и группы, которые определяли бы его связывание с другим ферментом, даже с возможностью некоторого снижения ингибиторной активности для исходной формы ингибитора. Другой подход связан с поиском ингибиторов одного фермента среди известных ингибиторов другого фермента.

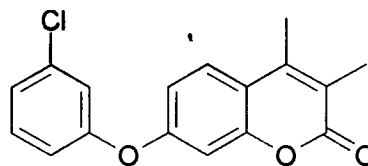
Обе эти стратегии были применены для разработки первых ингибиторов двойного действия для АХЭ и МАО. Первоначально были сконструированы соединения из класса индолкарбаматов (структура 1, рис. 1) [21]. При этом была применена стратегия комбинации известного ингибитора АХЭ со структурными элементами ингибиторов МАО. Однако синтезированные соединения необратимо ингибировали МАО и показали плохую биодоступность в экспериментах на тканях мозга, поэтому были неперспективными для дальнейшего исследования. Тем не менее они показали принципиальную возможность создания ингибиторов такого типа.

Применение другой стратегии привело к обнаружению анти-АХЭ активности среди известных ингибиторов МАО Б из класса кумаринов [22]. Исследованные производные кумаринов ингибировали МАО в микромолярном (для МАО А) и наномолярном (для МАО Б) уровне и имели K_i для АХЭ в микромолярном диапазоне концентраций. Лучшее соединение (7-[3-(хлоробензил)окси]-3,4-диметилкамарин, структура 2) имело K_i равную 3,4 мкМ.

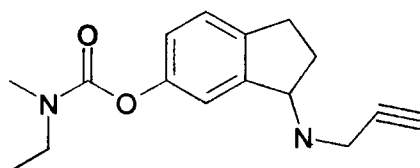
Недавно было показано, что другой ингибитор двойного действия для МАО и АХЭ (TV3326, структура 3) также регулирует зависимое от митоген-активируемой протеинкиназы (МАР-киназы) образование растворимого белка-предшественника α -амилоидного пептида (sAPP α), что предотвращает формирование амилоидных агрегатов. Параллельно было установлено, что



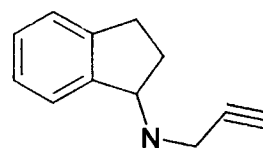
1



2



3



4

Рисунок.

Структуры ингибиторов двойного действия для МАО и АХЭ: 1 - базовая структура индолкарбаматов; 2 - 7-[3-(хлоробензил)окси]-3,4-диметилкамарин; 3 - TV3326. Структура 4 - селективный ингибитор МАО Б разагилин.

ингибитор МАО Б - разагилин (структура 4), который был исходным соединением при разработке TV3326, также регулирует этот процесс [23, 24].

Если учесть, что некоторые ингибиторы АХЭ могут предотвращать образование амилоидных агрегатов, то ингибиторы, действующие одновременно на АХЭ и МАО, по-видимому, кроме улучшения состояния больных, могут тормозить развитие заболевания. Таким образом, ингибиторы двойного действия для МАО и АХЭ могут быть перспективным классом соединений для разработки лекарственных средств против болезни Альцгеймера, особенно отягощенной депрессивными состояниями.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Zerovnik E. (2002) Eur. J. Biochem., **269**, 3362-3371
2. Wolfe M.S. (2002) Curr. Topics Med. Chem., **2**, 371-383
3. Mason J.M., Kokkonen N., Stott K., Doig A.J. (2003) Curr. Opin. Struct. Biol., **13**, 526-532
4. Palmer A.M., Stratman G.C., Procter A.W., Bowen D.M. (1988) Ann. Neurol., **23**, 616-620
5. Машковский М.Д. (1993) Лекарственные средства. М.: Медицина, т.1.

НОВОСТИ НАУКИ

6. Barril X., Ozoreo M., Luque F.J. (2001) *Mini Rev.Med. Chem.* **1**, 255-266
7. Alvarez A., Opazo C., Alarcon R., Garrido J., Inestrosa N.C. (1997) *J. Mol. Biol.*, **272**, 348-361
8. Inestrosa N.C., Alvarez A., Perez C.A., Moreno R.D., Vi-cente M., Linker C., Casanueva O.I. Soto C. Garrido A. (1996) *Neuron*, **16**, 881-891
9. Giacobini, E., Mori F., Lai C.C. (1996) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **777**, 393-398
10. Schalk I., Ehret-Sabatier L., Bouet F., Goeldner M., Hirth C. (1994) *Eur. J. Biochem.*, **219**, 155-159
11. Bondareff W., Mountjoy C.Q., Roth M. (1982) *Neurology*, **32**, 164-168
12. Newman S.C. (1999) *J. Affect. Disord.*, **52**, 169-176
13. Zweig R.M, Ross C.A, Hedreen J.C, Steele C., Cardillo J.E., Whitehouse P.J., Folstein M.F., Price D.L. (1988) *Ann Neurol.*, **24**, 233-242
14. Zubenko G.S., Moossy J. (1988) *Arch. Neurology*, **45**, 1182-1186
15. Saura J., Luque J.M., Cesura A.M., Da Prada M., Chan-Palay V., Huber G., Loffler J., Richards J.G. (1994) *Neuroscience*, **62**, 15-30
16. Edwards J.G. (1995) *CNS Drugs*, **4**, 141-159
17. Perry E.K., Kilford L., Lees A.J., Burn D.J., Perry R.H. (2003) *Ann. Neurol.*, **54**, 235-238
18. Binda C., Newton-Vinson P., Hubalek F., Edmondson D.E., Mattevi A. (2002) *Nature Struct. Biol.*, **9**, 22-26
19. Binda C., Li M., Hubalek F., Restelli N., Edmondson D.E., Mattevi A. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 9750-9755
20. Binda C., Hubalek F., Li M., Herzig Y., Sterling J., Edmondson D.E., Mattevi A. (2004) *J. Med. Chem.*, **47**, 1767-1774
21. Fink D.M., Palermo M.G., Bores G.M., Huger F.P., Kurys B.E., Merriman M.C., Olsen G.E., Petko W., O'Malley G.J. (1996) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **6**, 625-630
22. Bruhlmann C., Ooms F., Carrupt P.A., Testa B., Catto M., Leonetti F., Altomare C., Carotti A. (2001) *J. Med. Chem.*, **44**, 3195-3198
23. Yogev-Falach M., Amit T., Bar-Am O., Weinstock M., Youdim M.B. (2002) *FASEB J.*, **16**, 1674-1676
24. Yogev-Falach M., Amit T., Bar-Am O., Youdim M.B. (2003) *FASEB J.*, **17**, 2325-2327

УСКОРЕННЫЙ ПРОТЕОЛИЗ β -АМИЛОИДНОГО БЕЛКА ПРЕДУПРЕЖДАЕТ ОБРАЗОВАНИЕ АМИЛОИДНЫХ БЛЯШЕК В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Болезнь Альцгеймера - наиболее распространенный тип нейродегенеративных заболеваний человека, обусловленных прогрессирующим накоплением белков, структура которых характеризуется преобладанием β -складчатых листов. Генетические мутации, способствующие образованию или стабильности этих белков, утяжеляют течение болезни. Все это свидетельствует о том, что накопление таких белков в нервной системе фактически может вызвать соответствующие клинические синдромы.

Ученые сходятся во мнении, что накопление бета-амилоидного белка в мозге при болезни Альцгеймера отражает дисбаланс образования и деградации этого самоагрегирующего пептида. Регуляция протеаз, осуществляющих деградацию β -амилоидного белка, представляет новый терапевтический подход, который позволяет понизить стационарный уровень этого белка, однако последствия такой регуляции *in vivo* пока не изучены.

К числу протеаз, которые способны осуществлять деградацию β -амилоидного белка *in vitro*, относятся инсулиндеградирующий фермент (ИДФ), неприлизин и эндотелин-превращающий фермент-1 и -2. Их возможная роль в регуляции уровня β -амилоидного белка в мозге мышей *in vivo* подтверждена экспериментами по делеции соответствующих генов. Хотя пока неясно, могут ли дефекты в одном или нескольких генах, кодирующих эти протеазы, инициировать болезни Альцгеймера, уже есть данные о генетической связи и/или аллельной корреляции между геном ИДФ и развитием классического варианта болезни Альцгеймера в различных популяциях людей.

В статье "Enhanced proteolysis of β -amyloid in amyloid precursor protein-transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death", опубликованной в журнале "Neuron" за 2003 (том 40, стр. 1087-1093) коллективом авторов (Malcolm A. Leissring, Wesley Farris, Alice Y. Chang, Dominic M. Walsh, Xining Wu, Xiaoyan Sun, Matthew P. Frosch and Dennis J. Selkoe) из Центра неврологических заболеваний при Гарвардском медицинском институте (Бостон, США), приводятся доказательства того, что трансгенная сверхпродукция в нейронах ИДФ или неприлизина значительно снижает уровень β -амилоидного белка, замедляет или полностью предотвращает образование амилоидных бляшек и связанных с ними молекулярных нарушений в клетках, а также позволяет избежать преждевременную гибель мышей, трансгенных по амилоидному белку-предшественнику (amyloid precursor protein, APP).

Действительно ли протеазы, участвующие в деградации бета-амилоидного белка, вносят вклад в развитие болезни Альцгеймера пока неясно. Однако повышающая регуляция или растормаживание одной из перечисленных выше протеаз при помощи низкомолекулярных активаторов представляет собой привлекательный, но пока неизученный терапевтический подход. Соединения, которые ингибируют Р- или Y-секретазы, генерирующие бета-амилоидный белок, уже идентифицированы и в настоящее время готовятся к клиническим испытаниям, а иммунотерапевтический подход с использованием вакцинации амилоидным белком прошел первоначальные испытания на людях. Поскольку обе этих стратегии имеют существенный теоретический и практический риск, альтернативная стратегия, предусматривающая увеличение деградации бета-амилоидного белка, должна пройти строгую предварительную клиническую оценку для того, чтобы определить безопасность и эффективность подхода в процессе снижения бета-амилоидного белка в организме человека.

С этой целью ученые исследовали последствия увеличения активности инсулиндеградирующего фермента (ИДФ) или неприлизина в организме мышей.

НОВОСТИ НАУКИ

Результаты исследований свидетельствуют о том, что хронически повышенная активность любой из этих протеаз в нейронах снижает уровни бета-амилоидного белка в мозге, бляшкообразования и связанной с ними цитопатологии. При этом снижается риск преждевременной смерти APP-трансгенных мышей.

НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЙ ФАКТОР ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ ЛЕЧЕНИИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Болезнь Паркинсона (БП) представляет собой прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, которое характеризуется гибелью дофаминергических нейронов черной субстанции *pars compacta* (SNpc) мозга. Это приводит к различным характерным двигательным расстройствам таким как тремор, брадикинезия и ригидность, а также ряду "немоторных" когнитивных, аффективных и автономных нарушений, которые могут выходить за рамки дофаминергической дегенерации.

Подходы к лечению этого заболевания в основном сосредоточены на центральном звене - потере дофаминергических нейронов черной субстанции *pars compacta* (SNpc) и заместительной терапии прогрессирующего дефицита дофамина путем введения его предшественника - L-DOPA, а также агонистов дофаминовых рецепторов, действующих непосредственно на постсинаптические дофаминовые рецепторы. Это лечение позволяет замедлить развитие симптоматики на ранних стадиях заболевания.

Однако наряду с заместительной терапией активно проводится разработка и других подходов, предназначенных для фактического восстановления паркинсонического мозга. Эти подходы в основном фокусируются на использовании невральнх трансплантатов и нейротрофических факторов. Идеологи такого подхода предполагают, что своевременная доставка нейротрофического фактора во время начального клинического проявления болезни могла бы не только приостановить ее развитие, но и полностью излечить пациента. Последнее предполагает "спасение" пула дофаминергических нейронов в мигрирующем проводящем пути нервной системы даже в случае патологии за его пределами.

В качестве отправной точки "спасения" дофаминергических нейронов и их стриатных проекций такой подход представляется полезным, и в связи с этим нейротрофический фактор глиальных клеток GDNF (от англ. glial cell derived neurotrophic factor) может служить одним из нейротрофических факторов, способствующих решению поставленной проблемы. Начиная с 1993, когда были открыты его "дофаминотрофические" свойства, GDNF широко исследовали на моделях болезни Паркинсона. По данным опытов *in vitro*, GDNF оказывает мощный эффект на выживание дофаминергических нейронов. Это согласуется с данными о том, что при болезни Паркинсона отмечается снижение этого фактора в базальном ганглии.

В экспериментах на мартышках, у которых паркинсонизм вызывали введением нейротоксина 6-гидроксидофамина, введение GDNF непосредственно в боковые желудочки или паренхиму мозга оказывало защитный эффект (как при введении до или после нейротоксина). Наиболее выраженное улучшение дофаминергической системы, оцениваемое по выживанию дофаминергических нейронов, поведенческим тестам и т.д., отмечено при интратриатном введении. Интранигальное и интрацеребровентрикулярное введение GDNF также оказывало положительный эффект. Подобное позитивное действие было продемонстрировано и на других моделях болезни Паркинсона.

В качестве альтернативы этому прямому введению GDNF в эксперименте на крысах в стриатум или в черную субстанцию мозга имплантировали

НОВОСТИ НАУКИ

инкапсулированные клетки почки детеныша хомяка, вырабатывающие GDNF. В условиях экспериментального паркинсонизма этой приводило к увеличению роста дофаминергических волокон снижению некоторых поведенческих нарушений, однако у "паркинсонических" обезьян были обнаружены некоторые негативные эффекты таких клеток.

Имплантация других типов клеток, таких как GDNF-продуцирующие фибробласты, клетки карциномы P19 или астроциты, показала, что они все способны предотвратить смерть нигростриатных дофаминергических нейронов после повреждения, вызванного нейротоксином. Кроме того, интратриатная имплантация микросфер с GDNF или нервных стволовых клеток, сконструированных для производства GDNF, может также улучшить клеточное поведение и предотвратить дофаминергическую дегенерацию у грызунов, с экспериментальным паркинсонизмом.

ЯДЕРНЫЕ ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ ГЕПАТОЦИТОВ СЛУЖАТ СВЯЗУЮЩИМ ЗВЕНОМ МЕЖДУ ПЕЧЕНЬЮ И ОСТРОВКОВОЙ ТКАНЬЮ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ САХАРОМ ДИАБЕТЕ

Сахарный диабет второго типа (СД-2) представляет собой сложное, гетерогенное заболевание, вызываемое как факторами окружающей среды, так и генетическими факторами. Патофизиология обычной полигенной формы СД-2 (которая характеризуется поздним проявлением заболевания) обусловлена ранним появлением резистентности к инсулину, сопряженным с функциональными дефектами в секреции инсулина β -клетками островков поджелудочной железы. Однако точные факторы, ответственные за развитие этого заболевания, не известны. Моногенная форма СД молодых (т.н. MODY-форма от англ. maturity-onset diabetes of the young) обусловлена дефектами, прямо затрагивающими функционирование островковых β -клеток поджелудочной железы. Из шести известных форм MODY, одна форма (MODY2) возникает вследствие мутаций гена глюкокиназы, другие формы вторичны по отношению к мутациям в генах, кодирующих транскрипционные факторы β -клеток. MODY4 и MODY6 вызваны мутациями в генах, кодирующих гомеодоминантный транскрипционный фактор поджелудочной железы (PDX-1) и транскрипционный фактор, необходимый для нормального развития островковых клеток поджелудочной железы (NeuroD1/BETA2). Три формы заболевания - MODY1, MODY3 и MODY5 - вызваны мутациями в генах, кодирующих соответствующие ядерные транскрипционные факторы гепатоцитов (hepatocyte nuclear factors, HNF) HNF4 α , HNF1 α , и HNF1 β .

В недавнем выпуске журнала Science (2004, том 303, стр.1378) опубликована работа D.T. Odom и его коллег из Института биомедицинских исследований Уайтхеда (США) "Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors". Авторы провели анализ генов, регулируемых тремя ядерными транскрипционными факторами гепатоцитов (HNF), в печени и в клетках островков Лангерганса поджелудочной железы человека. Ученые предполагают, что дефекты в одном из этих транскрипционных факторов, HNF4 α , могут способствовать развитию позднего проявления симптомов диабета второго типа.

Регулируя экспрессию определенных групп генов, транскрипционные факторы определяют специфику и поддерживают тканевое разнообразие в большинстве организмов, включая млекопитающих. HNF транскрипционные факторы регулируют развитие и функционирование печени и других тканей, в том числе и островков Лангерганса.

НОВОСТИ НАУКИ

Три транскрипционных фактора HNF1 α , HNF4 α и HNF6 образуют регуляторную сеть в гепатоцитах, однако до работы группы D.T. Odom их роль в островковых β -клетках поджелудочной железы в организме человека оставалась неясной. Используя сочетанную иммунопреципитацию хроматина с промоторными микрочипами, ученым удалось идентифицировать в печени и в клетках ткани поджелудочной железы транскрипционные регуляторные петли, включающие HNF1 α , HNF4 α и HNF6.

Эти результаты исследований приобретают особую важность в свете недавно установленной связи между геном HNF4 α и поздним началом развития СД-2. Например, миссенс-мутация (T130I), влияющая на консервативную аминокислоту в ДНК-связывающем домене HNF4 α , ассоциируется с поздним началом СД-2 у японцев.

Комментируя эти результаты R.N.Kulkarni и C.R.Kahn, высказывают предположение о том, что инсулин и, возможно, другие молекулы могут индуцировать и модулировать активность транскрипционных факторов в гепатоцитах и островках поджелудочной железы.

Резистентность к инсулину - один из самых ранних признаков СД-2. Измененная передача сигнала инсулина в гепатоциты может непосредственно вызвать раннее нарушение HNF-зависимой регуляции в печени или ускорять развитие заболевания у лиц, несущих специфические варианты HNF. Действительно, инсулин регулирует деятельность транскрипционного фактора печени HNF3 β (Foxa2), который контролирует экспрессию генов HNF4 α и HNF1 α . Потеря функциональных инсулиновых рецепторов в гепатоцитах может изменить экспрессию генов печени и привести к тяжелой интолерантности глюкозы.

Хотя до сих пор не доказано, что инсулин регулирует транскрипционный фактор, есть данные о том, что в β -клетках островков поджелудочной железы, HNF3 β контролирует дифференциацию и функционирование последних. В ряде лабораторий показана важная роль компонентов, опосредующих сигналы инсулина и инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1). Так, у мышей с дефицитом инсулина или рецептора ИФР-1 обнаружены изменения в экспрессии HNF1 β , HNF3 β и генов, определяющих чувствительных к глюкозе. Это привело к появлению зависимой от возраста интолерантности к глюкозе и к сахарному диабету.

Возможно, регуляторные сигналы инсулина взаимодействуют с процессами HNF-зависимой транскрипции в печени и β -клетках, связывая резистентность к инсулину с дефектами инсулиновой секреции.

В организме мышей, одновременно лишенных рецепторов инсулина в β -клетках поджелудочной железы и гепатоцитах, развивался тяжелый диабет и наступала преждевременная смерть. Определение регуляторных сетей, связывающих upstream-сигналы транскрипции (как в случае инсулина и ядерных транскрипционных факторов гепатоцитов) с их генами-мишьями, поможет лучше понять патофизиологию этого эпидемического заболевания.

Материал подготовлен при участии О.Н. Рьженковой