

УДК 577.29

© Коллектив авторов

## **ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МИШЕНЕЙ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО ПРЕПАРАТА ДИМЕБОН С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛИНИИ ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ**

***Т.А. Шелковникова<sup>1\*</sup>, А.А. Устюгов<sup>1</sup>, В.С. Кохан<sup>1</sup>, Т.В. Тарасова<sup>1</sup>,  
В.К. Медведева<sup>3</sup>, И.В. Хританкова<sup>1</sup>, С.О. Бачурин<sup>1</sup>, Н.Н. Нинкина<sup>1,2</sup>***

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт физиологически активных веществ Российской академии наук,  
142432, Черноголовка, Северный, 1; факс: +7 (496) 524 25 88;  
эл. почта: sta.ipas@gmail.com

<sup>2</sup>Кардиффский университет, Биологический факультет, Музеум Авеню,  
CF10 3AX; факс: +44 (0) 29 20879008

<sup>3</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение  
“Научно-исследовательский институт биомедицинской химии  
имени В.Н.Ореховича” Российской академии медицинских наук,  
Москва, Погодинская ул., 10; факс: +7 (499) 245 08 57

В настоящем исследовании нами была использована линия трансгенных мышей со сверхэкспрессией амилоидогенного белка гамма-синуклеина в нервной системе для исследования эффекта препарата димебон на прогрессию протеинопатии. Хроническое введение димебона увеличивало продолжительность жизни у трансгенных животных данной линии. С помощью гистологических и биохимических методов было показано, что димебон снижал число амилоидных отложений в спинном мозге трансгенных животных и способствовал снижению содержания убиквитинированных форм белка в нерастворимой фракции из спинного мозга. Данные эффекты препарата, по-видимому, имеют место на уровне агрегированных форм белка, тогда как экспрессия трансгена при воздействии препарата остается на прежнем уровне. Таким образом, патологическая агрегация белков является одной из мишеней димебона при нейродегенерации.

**Ключевые слова:** нейродегенерация, нейропротекция, белковая агрегация, трансгенные модели, димебон.

---

\* - адресат для переписки

**ВВЕДЕНИЕ.** Неконтролируемая агрегация определенных типов белков является ключевым звеном в развитии дегенеративных процессов, лежащих в основе патогенеза многих нейродегенеративных заболеваний. Накопление в нервной системе различных промежуточных (олигомеров, протофибрилл) и конечных (фибрилл и неструктурированных форм) продуктов агрегации, многие из которых обладают цитотоксическими свойствами, приводит к функциональным нарушениям в нейронах и к их гибели. Такой тип патологии, получивший название протеинопатия, объединил в одну группу неврологические расстройства с существенно различающимися клиническими проявлениями патологии. К протеинопатиям относят такие широко распространенные и в настоящее время неизлечимые нейродегенеративные расстройства (НДЗ), как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, фронтотемпоральная дегенерация, хорей Гентингтона, прионовые болезни, боковой амиотрофический склероз и другие [1, 2]. Попытки создания и использования препаратов узко направленного действия для лечения протеинопатий, таких, например, как ингибиторы гамма-секретазы для лечения болезни Альцгеймера или нестероидные противовоспалительные средства для ряда НДЗ не увенчались успехом [3, 4]. Ограниченность успеха симптоматической и узко специфической терапии протеинопатий объясняется прежде всего мультифакторным характером этой группы заболеваний и разнородностью патологических изменений в нервной системе, их сопровождающих. В связи с этим при обсуждении стратегии разработки терапевтических средств нового поколения на первый план выходит задача создания препаратов комплексного действия, способных влиять на различные аспекты молекулярных патогенетических процессов, которые лежат в основе развития протеинопатий. Предполагается, что ингибирование процесса образования или удаление уже сформированных агрегатов может способствовать если не предотвращению, то, по крайней мере, существенному замедлению развития патологии [5-7]. Таким образом, в настоящее время патогенная агрегация белков рассматривается как возможная мишень для создания нового поколения терапевтических средств, способных модифицировать процессы, лежащие в основе развития нейродегенерации, и тем самым замедлять течение болезни или даже останавливать патологический процесс. Именно таким соединением широкого спектра действия является отечественный препарат димебон (3,6-диметил-9-(2-метил-пиридил-5)-этил-1,2,3,4-тетрагидро-γ-карболина гидрохлорид), для которого нейропротекторные свойства подтверждены в ряде модельных систем с использованием различных методов. Недавно выявленный и наименее изученный эффект димебона – его способность стимулировать нейрогенез в зубчатой фасции гиппокампа и субвентрикулярной зоне – основных источниках стволовых клеток для восстановительных процессов в нервной системе взрослого человека [8, 9]. Возможно, что именно способностью стимулировать нейрогенез объясняется выявленная для димебона способность улучшать когнитивные функции у мышей [10], у макаков резус [11], а также при патологических состояниях, вызванных действием нейротоксинов [12]. При НДЗ димебон оказывает протекторный эффект на митохондрии *in vitro* и *in vivo* [13-15], способен ингибировать глутаматную токсичность [16, 17]. Кроме того, его мишенями могут служить серотониновые рецепторы 6 и 7 типа [18] и ряд других рецепторов и ферментов, вовлечённых в молекулярный патогенез НДЗ [19]. Поскольку общим звеном патогенеза НДЗ-протеинопатий является

процесс патологической агрегации белков, и все этапы этого процесса рассматриваются как потенциальные мишени для разработки новых терапевтических средств, исключительную важность приобретает описанное недавно свойство димебона влиять на формирование и/или стабильность патогенных белковых агрегатов [20, 21]. Однако остается неясным, действует ли димебон непосредственно на процесс белковой агрегации или же его эффект связан с активацией процессов разрушения уже сформированных белковых фибриллярных структур, также неясно, какие именно молекулярные механизмы ответственны за антиагрегационные свойства димебона.

Целью настоящего исследования является изучение действия препарата димебон на формирование амилоидных структур в пораженных отделах спинного мозга модельных животных с прогрессирующей протеинопатией. В работе использована линия трансгенных мышей со сверхэкспрессией амилоидогенного белка гамма-синуклеина в нервной системе, у которых с возрастом развиваются нейродегенеративные изменения, сопровождающиеся накоплением в тканях нервной системы гистопатологических структур, основным компонентом которых является агрегированный гамма-синуклеин [22, 23]. Известно, что накопление патогенных белковых отложений в отделах нервной системы при НДЗ прямо коррелирует с тяжестью патологических проявлений заболевания и используется в качестве маркерного показателя для характеристики стадий протеинопатий [24]. У взрослых мышей разработанной нами трансгенной линии гистопатологические включения детектируются во всех отделах спинного мозга уже в трёхмесячном возрасте, когда ещё отсутствуют признаки нейродегенерации. По мере накопления амилоидных структур в спинном мозге развивается двигательная дисфункция, становятся более выраженными признаки нейродегенеративного процесса, что приводит к преждевременной смерти трансгенных животных [23]. Ранее в этой модели нами было показано, что при хроническом введении димебон существенно замедляет прогрессию двигательной дисфункции у трансгенных мышей [21].

**МЕТОДИКА.** Хроническое введение препарата (димебон) осуществляли с питьевой водой, из расчёта 1,75 мг/кг в сутки, в первой группе – начиная с трёхмесячного возраста (досимптоматическая стадия протеинопатии), во второй группе – с шестимесячного возраста (генерализованная стадия протеинопатии). Число животных составило 12 в контрольной группе, 13 в группе 1 и 12 в группе 2. Контрольную группу трансгенных животных, не получавших препарата, содержали параллельно в идентичных условиях. Анализ числа амилоидных включений во всех группах производился по достижении животными возраста 9 месяцев. Спинной мозг фиксировали по отделам в 4%-ном параформальдегиде, обезжизняли в серии спиртов повышающейся концентрации и заливали в парафин. Гистологические поперечные срезы толщиной 8 мкм окрашивали амилоид-специфическим красителем конго красный (“Sigma”, США). Подсчёт числа отложений осуществляли в переднем роге в четырёх неперекрывающихся квадратах общей площадью 0,01 мм<sup>2</sup> (10-15 срезов на каждое животное), среднее число отложений на этом участке использовали для статистической обработки (непараметрический критерий U-тест Манна-Уитни).

Экстракцию агрегированных форм гамма-синуклеина проводили методом дифференциального фракционирования в буферных растворах, содержащих

или не содержащих детергенты. Ткани спинного мозга гомогенизировали в высокосолеовом буфере (800 мМ NaCl, 50 мМ Трис-HCl, pH 7,5, 2 мМ ЭДТА) в присутствии ингибиторов протеаз Complete Mini ("Roche", Великобритания), отделяли постмитохондриальную фракцию центрифугированием при 1600 g в течение 20 мин при 4°C и осаждали нерастворимые белковые агрегаты центрифугированием при 100000 g в течение 20 мин, осадок ресуспендировали в том же буфере, содержащем 1% Тритон X-100, и снова центрифугировали при 100000 g в течение 20 мин. Конечную детергент-нерастворимую фракцию ресуспендировали в буфере для нанесения образцов на полиакриламидный гель для денатурирующего электрофореза по Лэммли и кипятили в течение 5 минут. Детекцию убиквитина проводили методом иммуноблоттинга с помощью поликлональных антител ("Santa Cruz Biotechnology", США, в разведении 1:1000), нормализацию содержания белка в образцах проводили относительно бета-актина (моноклональные антитела "Sigma" в разведении 1:3000).

Тотальную РНК для реакции обратной транскрипции выделяли из замороженных тканей спинного мозга или головного мозга с помощью набора RNeasy ("Qiagen", Германия). Относительные уровни экспрессии мРНК, кодирующей гамма-синуклеин, были определены методом количественной ПЦР в реальном времени после синтеза комплементарной одноцепочечной ДНК на матрице тотальной РНК в реакции обратной транскрипции. Количественную ПЦР в реальном времени проводили на аппарате StepOne Real-Time PCR System ("Applied Biosystems", Великобритания) с использованием набора DyNAmo HS SYBR Green supermix ("Finnzymes", Финляндия) и ROX в качестве референсного красителя. Реакции проводили в тонкостенных 48-луночных ПЦР-планшетах ("Bioplastics", Нидерланды) в трёх повторениях. В качестве внутреннего контроля использовали уровень экспрессии гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФДГ). Праймеры 5'-CACTGAGCATCTCCCTCACA-3' и 5'-GTGGGTGCAGCGAACTTTAT-3' были использованы для амплификации кДНК ГАФДГ, и 5'-CCATGGACGTCTTCAAGAAAGG-3' и 5'-CGTTCTCSTTG-GTTTTGGTG-3' – гамма-синуклеина. Дизайн праймеров для ПЦР был выполнен "через интрон", что позволяло анализировать только процессированные РНК молекулы. Различия между группами считались статистически значимыми при уровне значимости  $p < 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Линия трансгенных по гамма-синуклеину мышей характеризуется сниженной продолжительностью жизни по сравнению с животными дикого типа [23]. Для исследования возможного эффекта димебона на данную характеристику проводили регистрацию гибели животных в контрольной (не получавшей димебон) и экспериментальной (димебон с 3-месячного возраста) группах. Несмотря на то, что уровень выживаемости трансгенных мышей был по-прежнему ниже по сравнению с животными дикого типа, в группе получавших димебон мышей наблюдалась тенденция к увеличению продолжительности жизни (рис. 1). Так, до 17-месячного возраста в группе контрольных трансгенных животных не дожило ни одно животное, тогда как в группе димебона к этому возрасту были живы около четверти всех мышей. Таким образом, хроническое введение димебона способствовало улучшению общего состояния животных с прогрессирующей протеинопатией, что выражалось в статистически значимом увеличении продолжительности жизни.

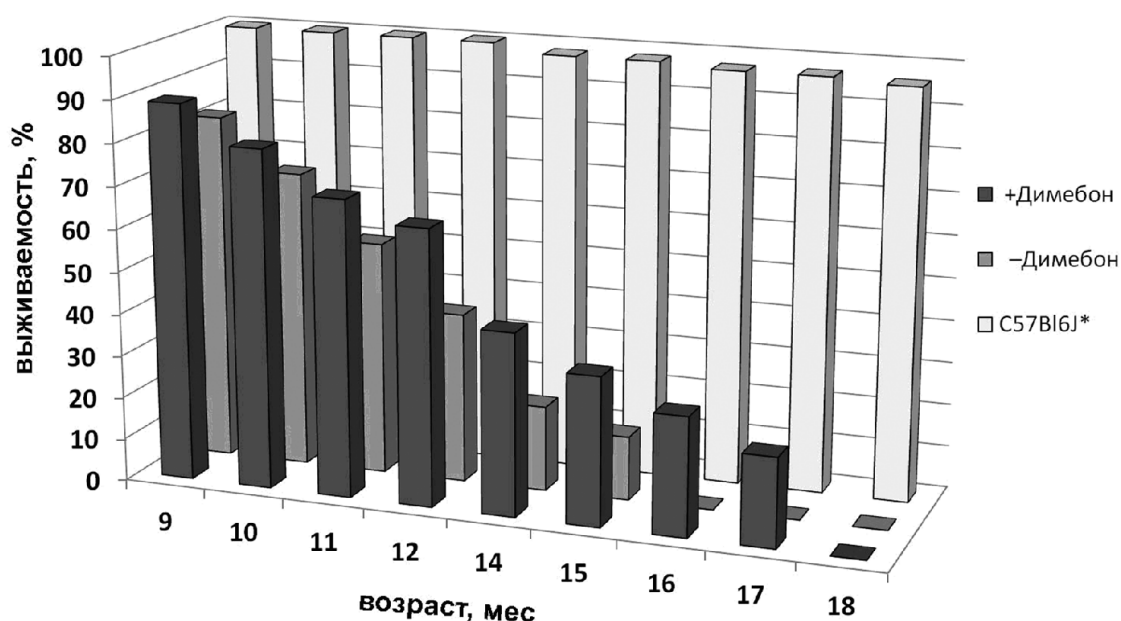


Рисунок 1.

Влияние хронического введения димебона на выживаемость трансгенных животных.

\*C57Bl6J - нетрансгенные животные того же генетического фона (дикий тип).

Неоднократно было продемонстрировано, что число гистопатологических структур в нервной системе при протеинопатии непосредственно коррелирует со стадией заболевания [24]. Для оценки эффекта димебона на число амилоидных включений в пораженных отделах спинного мозга был проведен гистологический анализ срезов спинного мозга трансгенных мышей, хронически получавших димебон на разных стадиях протеинопатии. Необходимо отметить, что к моменту получения тканей для анализа животные всех трёх групп находились на продвинутой стадии протеинопатии с выраженной неврологической симптоматикой. Белковые включения на гистологических срезах были визуализированы при помощи флуоресцентного красителя конго красный, специфически связывающегося с бета-складчатыми структурами, характерными для отложений амилоидного типа. В группе животных, которым димебон начали вводить с 6-месячного возраста (на симптоматической стадии заболевания, когда уже имела место двигательная дисфункция), число белковых агрегатов снизилось на 27,5% по сравнению с контрольной группой трансгенных животных, не получавших димебон ( $p=0,049$ ) (таблица). При этом в экспериментальной группе с ранним началом введения препарата (с 3-месячного возраста, досимптоматическая стадия) был зарегистрирован еще более выраженный эффект – снижение числа агрегатов на 41,2% по сравнению с контрольной группой ( $p=0,033$ ), и на 13,7% по сравнению с первой экспериментальной группой. Несмотря на то, что различия между двумя экспериментальными группами не достигли уровня статистической значимости ( $p=0,120$ ), тенденция к снижению числа амилоидных включений при раннем начале и более длительном введении препарата была очевидной (таблица). Полученные результаты согласуются с результатами поведенческой оценки двигательной дисфункции у этих животных [21], согласно которым введение димебона на досимптоматической стадии протеинопатии обеспечивает более выраженный его эффект в отношении моторной функции трансгенных мышей.

## ЭФФЕКТ ДИМЕБОНА В ТРАНСГЕННОЙ МОДЕЛИ ПРОТЕИНОПАТИИ

*Таблица.* Влияние хронического введения димебона на число амилоидных включений в переднем роге грудного отдела спинного мозга у гамма-синуклеин трансгенных мышей на симптоматической стадии протеинопатии.

Начало введения димебона (возраст в мес)	Стадия протеинопатии в этом возрасте	Длительность введения димебона	Число амилоидных включений на 0,01 мм <sup>2</sup> , среднее±ошибка средней	% по отношению к контролю
3 месяца	Досимптоматическая	6 месяцев	20,0±1,6	41,2%
6 месяцев	Симптоматическая	3 месяца	24,6±1,0	27,5%
не получали (контроль)	-	-	34,0±5,4	100%

Обнаруженное нами снижение числа амилоидных включений может осуществляться при помощи различных механизмов. Одна из возможных мишеней димебона в данном случае – регуляция экспрессии гамма-синуклеина на уровне РНК, приводящая к снижению скорости синтеза амилоидогенного белка. Для исследования этой возможности было определено содержание мРНК гамма-синуклеина в разных отделах спинного мозга и в головном мозге мышей контрольной и экспериментальной (димебон с 3-месячного возраста) групп с помощью количественной ПЦР. Было показано, что уровень мРНК экзогенного гамма-синуклеина во всех изученных отделах нервной системы остается стабильно высоким и не меняется под действием димебона (рис. 2). Таким образом, обнаруженный нами эффект препарата опосредуется либо путем ингибирования процесса патогенной агрегации амилоидогенного белка, либо путем активации систем контролируемой деградации белков, например, убиквитин-протеасомной системы (УПС), и не связан с влиянием на экспрессию трансгена. В последнем случае в белковых образцах из тканей экспериментальных животных, получавших димебон, должно происходить повышение содержания маркеров активации УПС. Анализ уровня мономерного убиквитина и высокомолекулярных убиквитинированных форм белков в растворимых и нерастворимых фракциях является хорошим маркером для оценки активности данной внутриклеточной защитной системы. Как показало исследование различных фракций спинного мозга с помощью иммуноблоттинга с антителами против убиквитина, содержание мономерного убиквитина в растворимой фракции из спинного мозга животных экспериментальной группы было существенно повышено по сравнению с контрольной группой животных, не получавших димебон (рис. 3), что может являться свидетельством общего повышения активности УПС. При этом содержание убиквитинированных белков с молекулярной массой 55 кДа и более было существенно ниже как во фракции растворимых белков, так и во фракции белков, растворимых только в присутствии детергента. Можно предположить, что димебон способствует снижению содержания промежуточных убиквитинированных продуктов агрегации гамма-синуклеина, что сопровождается высвобождением мономерного убиквитина и его накоплением в растворимой фракции. Обнаруженные нами свидетельства активации УПС при хроническом воздействии димебона, безусловно, требуют дальнейших детальных исследований и подтверждения на биохимическом уровне. Тем не менее, полученные нами данные позволяют предположить, что снижение содержания амилоидных включений при гистологическом анализе срезов спинного мозга опытных животных может являться

следствием разрушения убиквитинированных включений, сформированных гамма-синуклеином, несмотря на то, что, по-видимому, лишь часть убиквитинированных белков, детектируемых с помощью данного метода, приходится на долю модифицированного гамма-синуклеина.

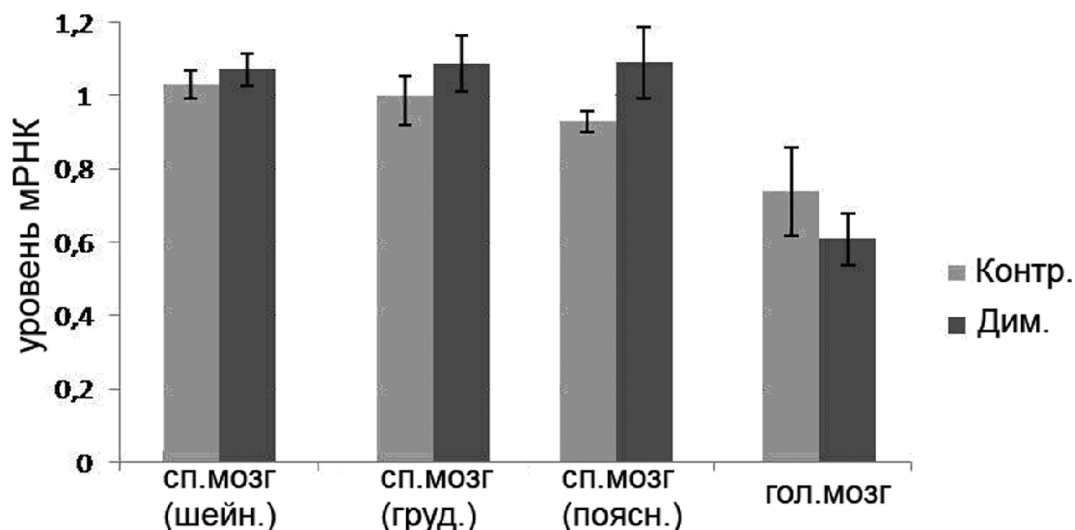


Рисунок 2.

Содержание мРНК гамма-синуклеина в тканях нервной системы получавших (Дим.) и не получавших димебон (Контр.) гамма-синуклеин трансгенных мышей на симптоматической стадии протеинопатии (возраст начала введения препарата - 3 мес). Значения, указанные для каждого образца, выражены относительно уровня мРНК в грудном отделе спинного мозга контрольной группы, принятого за единицу,  $\pm$  ошибка средней.



Рисунок 3.

Эффект димебона на содержание мономерного убиквитина и убиквитинированных белков в тканях спинного мозга трансгенных мышей на симптоматической стадии протеинопатии. Представлены растворимая (раст.), детергент-растворимая (детерг.-раст.) и детергент-нерастворимая (детерг.-нераст.) фракции. Для нормализации содержания тотального белка в различных фракциях использован бета-актин.

Выявленные на молекулярно-клеточном уровне изменения в прогрессии протеинопатии под действием димебона, а именно, снижение числа амилоидных включений в пораженных отделах нервной системы и смещение соотношения детргент-растворимых и детергент-нерастворимых форм основного амилоидогенного белка в сторону последних являются составляющими тех процессов, которые способствуют замедлению прогрессии нейродегенеративного процесса, что в конечном итоге выражается на существенном увеличении продолжительности жизни трансгенных мышей.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.** Патологическая агрегация белков – процесс, имеющий место при ряде нейродегенеративных расстройств и потенциальная мишень для терапевтического воздействия, привлекательная своей универсальностью. Разработка препаратов, способных препятствовать образованию агрегированных патогенных форм белков или активировать внутриклеточные защитные системы, осуществляющие контролируемую деградацию патогенных продуктов белковой агрегации, сегодня по праву считается одним из наиболее перспективных подходов к предупреждению и коррекции подобных заболеваний [5-7]. При этом, использование линий трансгенных животных позволяет оптимизировать исследования по разработке и изучению такого типа нейропротекторных лекарственных средств. В данном исследовании с использованием трансгенной модели протеинопатии было показана принципиальная способность нейропротекторного препарата димебон оказывать влияние на гистопатологические белковые структуры, образование и накопление которых наблюдается при прогрессии протеинопатии и сопровождает нейродегенеративные изменения. Частичное освобождение тканей нервной системы от белковых агрегатов у мышей использованной линии привело к улучшению общего состояния животных, что выразилось в увеличении продолжительности жизни и улучшении их двигательной функции [21]. Необходимы дальнейшие исследования биохимических механизмов обнаруженного нами эффекта, а также исследование эффектов препарата в отношении протеинопатий, при которых наблюдается агрегация других белков, чтобы установить, насколько универсальным является обнаруженный нами эффект. Тем не менее, полученные результаты представляются крайне обнадеживающими и позволяют задать направление исследований, результатом реализации которого может стать разработка эффективных лекарственных средств для неизлечимой в настоящее время группы расстройств.

Работа выполнена при поддержке федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы” (государственный контракт №16.11.512.2080) и гранта Президиума РАН “Фундаментальные науки – медицине”.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Skovronsky D.M., Lee V.M., Trojanowski J.Q. (2006) *Annu. Rev. Pathol.*, **1**, 151-170.
2. Шелковникова Т.А., Куликова А.А., Цветков Ф.О., Петерс О., Бачурин С.О., Бухман В.Л., Нункина Н.Н. (2012) *Мол. биол.*, **46**(3), 402-415.
3. Imbimbo B.P., Giardina G.A. (2011) *Curr. Top. Med. Chem.*, **11**(12), 1555-1570.

4. Hüll M., Berger M., Heneka M. (2006) *Drugs*, **66**(16), 2075-2093.
5. Martinez-Vicente M., Cuervo M.A. (2007) *Lancet Neurol.*, **6**(4), 352-261.
6. Huang Q., Figueiredo-Pereira M.E. (2010) *Apoptosis*, **15**(11), 1292-1311.
7. Nedelsky N., Todd P.K., Taylor J.P. (2008) *Biochim Biophys Acta*, **1782**(12), 691-699.
8. Pieper A.A., Xie S., Capota E., Estill S.J., Zhong J., Long J.M., Becker G.L., Huntington P., Goldman S.E., Shen C.H., Capota M., Britt J.K., Kotti T., Ure K., Brat D.J., Williams N.S., MacMillan K.S., Naidoo J., Melito L., Hsieh J., De Brabander J., Ready J.M., McKnight S.L. (2010) *Cell*, **142**, 39-51.
9. MacMillan K.S., Naidoo J., Liang J., Melito L., Williams N.S., Morlock L., Huntington P.J., Estill S.J., Longgood J., Becker G.L., McKnight S.L., Pieper A.A., De Brabander J.K., Ready J.M. (2011) *J. Amer.Chem.Soc.*, **133**, 1428-1437.
10. Vignisse J., Steinbusch H.W., Bolkunov A., Nunes J., Santos A.I., Grandfils C., Bachurin S., Strekalova T. (2011) *Progr. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **35**(2), 510-522.
11. Webster S.J., Wilson C.A., Lee C.H., Mohler E.G., Terry A.V. Jr, Buccafusco J.J. (2011) *Br. J. Pharmacol.*, **164**, 970-978.
12. Bachurin S., Bukatina E., Lermontova N., Tkachenko S., Afanasiev A., Grigoriev V., Grigorieva I., Ivanov Y., Sablin S., Zefirov N. (2001) *Ann. NY Acad. Sci.*, **939**, 425-435.
13. Bachurin S.O., Shevtsova E.P., Kireeva E.G., Oxenkrug G.F., Sablin S.O. (2003) *Ann. NY Acad. Sci.*, **993**, 334-344.
14. Zhang S., Hedskog L., Petersen C.A., Winblad B., Ankarcrona A. (2010) *J. Alzheimers Dis.*, **21**, 389-402.
15. Naga K.K., Geddes J.W. (2011) *Neuromolecular. Med.*, **13**, 31-36.
16. Grigorev V.V., Dranyi O.A., Bachurin S.O. (2003) *Bull. Exp. Biol. Med.*, **136**, 474-477.
17. Лермонтова Н.Н., Редкозубов А.Е., Шевцова Е.Ф., Серкова Т.П., Киреева Е.Г., Бачурин С.О. (2001) *Бюлл. эксп. биол. мед.* **132**, 1079-1083.
18. Okun I., Tkachenko S.E., Khvat A., Mitkin O., Kazey V., Ivachtchenko A.V. (2010) *Curr. Alzheimer Res.*, **7**, 97-112.
19. Wu J., Li Q., Bezprozvanny I. (2008) *Mol. Neurodegener.*, **3**, 15
20. Yamashita M., Nonaka T., Arai T., Kametani F., Buchman V.L., Ninkina N., Bachurin S.O., Akiyama H., Goedert M., Hasegawa M. (2009) *FEBS Lett.*, **583**, 2419-2424.
21. Бачурин С.О., Устюгов А.А., Петерс О., Шелковникова Т.А., Бухман В.Л., Нинкина Н.Н. (2009) *Докл. РАН*, **428**(2), 262-265.
22. Buchman V.L., Adu J., Pinon L.G., Ninkina N.N., Davies A.M. (1998) *Nat. Neurosci.*, **1**, 101-103.
23. Ninkina N., Peters O., Millership S., Salem H., van der Putten H., Buchman V.L. (2009) *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 1779-1794.
24. Thal D.R., Rüb U., Orantes M., Braak H. (2002) *Neurology*, **58**, 1791-1800.
25. Ninkina N.N., Baka I.D., Buchman V.L. (1997) *Gene*, **184**(2), 205-210.

Поступила: 27. 02. 2012.

STUDY INTO MOLECULAR TARGETS OF A NEUROPROTECTIVE COMPOUND  
DIMEBON USING A TRANSGENIC MICE LINE

*T.A. Shelkownikova<sup>1</sup>, A.A. Ustyugov<sup>1</sup>, V.S. Kokhan<sup>1</sup>, T.V. Tarasova<sup>1</sup>, V.K. Medvedeva<sup>3</sup>,  
I.V. Khrytankova<sup>1</sup>, S.O. Bachurin<sup>1</sup>, N.N. Ninkina<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Physiologically Active Compounds of Russian Academy of Sciences, 1 Severnyi proezd, Chernogolovka, 142432 Russia; fax: +7 (496) 524 25 88; e-mail: sta.ipac@gmail.com

<sup>2</sup>Cardiff University, BIOSI3, Cardiff, Museum Avenue CF10 3AX, UK; fax.: +44 (0) 29 20879008

<sup>3</sup>Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry of the Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya ul., 10, Moscow, 119121 Russia; fax: +7 (499) 245 08 57

In the present study we have used a transgenic mice overexpressing an amyloidogenic protein, gamma-synuclein, in the nervous system to address the effect of dimebon on proteinopathy progression. Neuroprotective effect of chronic dimebon administration in these mice at organismal level was confirmed by the increased lifespan. Using histological and biochemical approaches we have demonstrated that dimebon reduced the number of amyloid inclusions in spinal cord of transgenic animals and decreased the content of ubiquitinated proteins in detergent-insoluble fractions. These effects are likely to occur at the level of aggregated protein species, since transgene expression was not altered. Thus, pathological protein aggregation serves as one of dimebon targets in neurodegeneration.

**Key words:** neurodegeneration, neuroprotection, protein aggregation, transgenic models, dimebon.