

Майкл Вульф

# Альцгеймер НЕ ПРОЙДЕТ!

Найдены способы блокирования молекулярных процессов, которые служат «пусковым механизмом» заболевания, разрушающего личность

Головной мозг человека — чрезвычайно сложный биологический компьютер, который воспринимает, перерабатывает и хранит огромное количество информации. Нарушения в его работе, возникающие при болезни Альцгеймера, затрагивают «жесткий диск» и стирают вначале самые свежие файлы, а потом и все остальные. Первым признаком заболевания становится обычно неспособность вспомнить подробности последних нескольких дней (телефонный разговор с приятелем, недавнее посещение магазина и т.д.), при этом все, что происходило ранее, помнится хорошо. По мере того, как заболевание прогрессирует, из памяти ускользают и давние события, и в конце концов больной перестает узнавать даже самых близких людей. Болезнь Альцгеймера страшна не физическими страданиями, а утратой ощущения жизни и самоидентификации.

К сожалению, аналогия между вышедшим из строя компьютером и состоянием мозга при болезни Альцгеймера не совсем точная. Поврежденный мозг невозможно восстановить, заменив испорченные «детали» и перезагрузив программы. Недуг не просто стирает информацию, он разрушает саму структуру

мозга, состоящего более чем из 100 млрд. нервных клеток (нейронов) со 100 триллионами связей между ними. Особенно страдают нейроны, связанные синапсами, у которых медиатором служит ацетилхолин. Действие большинства препаратов, использующихся для лечения страшной болезни, направлено на поддержание уровня ацетилхолина. Пораженные нейроны перестают синтезировать этот нейромедиатор, а лекарственные средства ингибируют фермент, в норме расщепляющий ацетилхолин, повышая тем самым его уровень. В результате происходит стимуляция постсинаптических нейронов, и память проясняется. К сожалению, имеющиеся средства перестают действовать уже через 6–12 месяцев, поскольку не могут компенсировать последствия отмирания нейронов. Лекарство другого типа, мемантин, смягчает симптомы заболевания на более поздних стадиях, снижая избыточную активность другого нейромедиатора — глутамата, однако пока неизвестно, действует ли он хотя бы в течение года.

Еще десять лет назад не верилось в возможность излечения от болезни Альцгеймера. О ее биологии было почти ничего не известно, происхождение и ход патологического ▶

процесса представлялись слишком сложными. Однако совсем недавно ситуация существенно изменилась: исследователям удалось разобраться во многих молекулярных процессах, которые находятся у истоков недуга, и сегодня они пытаются разработать способы их замедления или устранения. Все чаще в научной и медицинской среде звучит слово «надежда», ранее казавшееся несовместимым с диагнозом «болезнь Альцгеймера».

### Амилоидная гипотеза

100 лет назад немецкий психиатр и патологоанатом Алоиз Альцгеймер впервые описал два основных признака болезни: сенильные бляшки и нейрофибриллярные клубочки в коре головного мозга и лимбической системе — структурах, отвечающих за высшую нервную деятельность. Бляшки образуются вне нейронов и состоят из низкомолекулярного белка амилоид-бета (А-бета). Клубочки из волокон белка под названием тау локализируются в теле нейронов и их отростках (аксонах и дендритах). Когда эти аномалии были обнаружены, в медицинской среде разгорелся спор, длившийся большую часть XX века: ответственны ли бляшки и клубочки за дегенерацию нейронов или они лишь служат маркерами вышедших из строя участков головного мозга? За последнее десятилетие возобладала так называемая каскадная амилоидная гипотеза, согласно которой А-бета и тау напрямую связаны с началом дегенеративного процесса, причем запускает его образование А-бета.

А-бета представляет собой низкомолекулярный белок (пептид), который в 1984 г. был выделен и охарактеризован Джорджем Гленнером (George G. Glenner) и Кайне Вонгом (Cai'ne W. Wong) из Калифорнийского университета в Сан-Диего. Этот пептид является частью более крупного белка-предшественника (*APP*, *amyloid-beta precursor*). *APP* — трансмембранный белок, одна его часть выступает из клетки наружу, другая пронизывает мембрану и выходит

в цитоплазму. А-бета отщепляется от *APP* с помощью двух протеолитических ферментов (протеиназ): бета-секретазы и гамма-секретазы. Такой процесс в норме протекает почти во всех клетках нашего организма. Для чего клетке нужен А-бета, не ясно, возможно, он участвует в каких-то жизненно важных сигнальных механизмах.

Часть молекулы А-бета находится внутри мембраны, между ее наружной и внутренней стенками. Внутренняя часть клеточных мембран образована гидрофобными «хвостами» липидных молекул, поэтому погруженные в нее сегменты белков обычно состоят из гидрофобных аминокислот. Когда А-бета отщепляется от *APP* с помощью бета- и гамма-секретаз и оказываются окруженными жидкостью, их гидрофобные участки стремятся объединиться, в результате молекулы А-бета образуют небольшие водорастворимые агрегаты. В начале 1990-х гг. Питер Ланзбури мл. (Peter T. Lansbury, Jr) из Гарвардской медицинской школы обнаружил, что при высоких концентрациях молекулы А-бета образует *in vitro* волокнистые структуры, аналогичные тем, что присутствуют в бляшках головного мозга больных. Растворимые агрегаты и волокна А-бета оказывают токсическое действие на нейроны в культуре, а агрегаты отрицательно влияют у мышей на процессы, связанные с запоминанием.

Приведенные данные свидетельствуют в пользу каскадной амилоидной гипотезы, но еще более серьезным ее подтверждением служат результаты обследования членов семей с повышенным риском возникновения болезни Альцгеймера. Все они оказываются носителями мутаций, предопределяющих развитие заболевания в сравнительно молодом возрасте, обычно до 60 лет. В 1991 г. Джон Харди (John A. Hardy) из Национального института геронтологии впервые обнаружил такие мутации в гене, кодирующем *APP*, причем особенно серьезные нарушения наблюдались в А-бета и примыкающих к нему участках. Вскоре Денис

Силке (Dennis J. Selkoe) из Гарвардского университета и Стивен Янкин (Steven Younkin) из Клиники Майо в Джексонвилле, Флорида, независимо друг от друга показали, что следствием мутаций служит образование большего количества А-белка как такового или особой его формы, чрезвычайно склонной к формированию бляшек. Более того, у больных с синдромом Дауна, несущих три копии хромосомы 21 вместо двух, болезнь Альцгеймера в молодом возрасте возникает гораздо чаще, чем в среднем в популяции. Поскольку хромосома 21 содержит *APP*-ген, то у таких больных уровень А-бета повышен с самого рождения, и амилоидные бляшки обнаруживаются иногда даже у 12-летних детей.

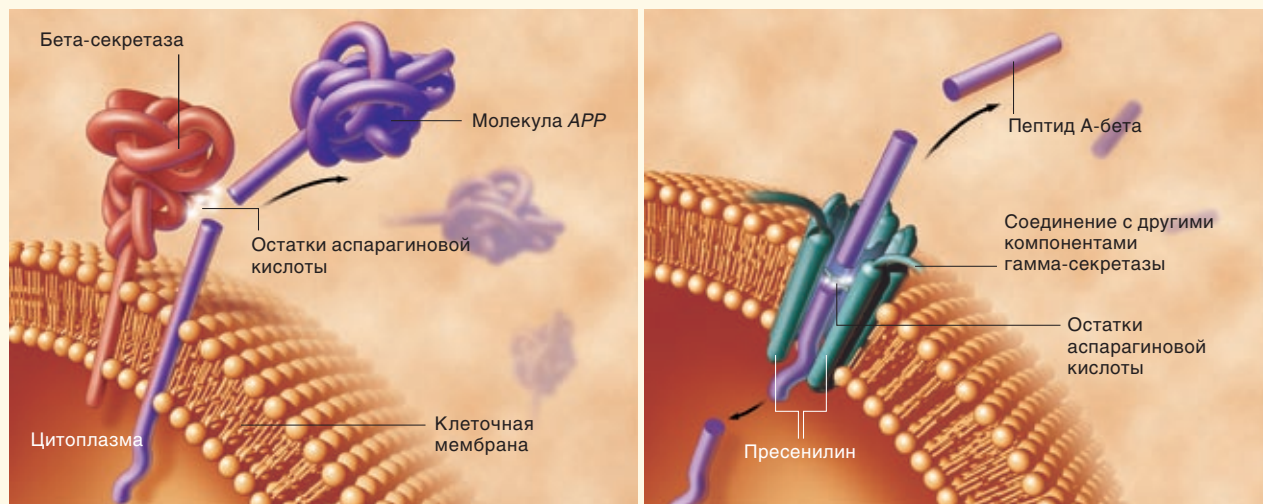
Вскоре между болезнью Альцгеймера и генами, регулирующими образование А-бета, была выявлена зависимость другого рода. В 1995 г. Питер Джордж-Хизлоп (Peter George-Hyslop) из Университета Торонто идентифицировал мутации в двух родственных генах, *presenilin 1* и *2*, которые ассоциируются с агрессивной формой болезни Альцгеймера, обычно возникающей в возрасте от 30 до 40 лет. Последующие изыскания показали, что мутации приводят к увеличению доли той разновидности А-бета, которая особенно склонна к агрегации. Выяснилось, что белки, кодируемые *presenilin*-генами, служат составной частью фермента гамма-секретазы.

Итак, за развитие болезни Альцгеймера в молодом возрасте отвечают три гена. Один из них кодирует предшественника А-бета, два других — специфические компоненты протеиназы, способствующие образованию пептида с опасными свойствами. Более того, исследователи обнаружили, что носители специфической вариантной формы гена, кодирующего аполипопротеин *E*, белок, который помогает кластеризации молекул А-бета, подвергаются повышенному риску развития болезни Альцгеймера в старческом возрасте.

Каким образом растворимые агрегаты и нерастворимые волокна приводят к разрушению нейронов,

## БЕЗЖАЛОСТНЫЕ «МОЛЕКУЛЯРНЫЕ НОЖНИЦЫ»

Согласно каскадной амилоидной гипотезе, болезнь Альцгеймера начинается с образования избыточного количества пептида амилоид-бета (А-бета), который отщепляется от белка-предшественника (APP). Вначале (рис. слева) фермент под названием бета-секретаза отрезает молекулу APP, выступающую наружу из клеточной мембраны. Затем белок пресенилин, компонент другого фермента, гамма-секретазы, разрезает оставшийся трансмембранный сегмент в той его части, которая погружена в мембрану, с освобождением А-бета (рис. справа). Остановить эти процессы можно двумя способами: либо подавить активность гамма-секретазы, либо заставить фермент отщеплять APP по другому сайту с последующим образованием более короткой, чем обычно, формы А-бета



до конца не ясно. Имеющиеся данные позволяют предположить, что агрегаты А-бета вне нейронов запускают каскад процессов, в числе которых — изменение тау-белков, локализованных в самом нейроне. Например, агрегаты могут каким-то образом сказываться на активности клеточных ферментов под названием «киназы», которые присоединяют к белковым молекулам фосфатные группы. Дефектные киназы выполняют свою работу слишком активно, тау-белки оказываются перегруженными фосфатными группами, изменяют свои химические свойства и образуют перекрученные нити. Измененные тау-белки могут выводить из строя нейроны, разрушая микротрубочки, по которым вдоль аксонов и дендритов транспортируются белки и другие крупные молекулы. Мутации в гене тау тоже могут провоцировать образование тау-нитей и вызывать другие типы нейродегенеративных заболеваний помимо болезни Альцгеймера. Итак, тау-нити, по-видимому, имеют отношение к гибели нейронов, а А-бета — к запуску патологического процесса.

### Как остановить «молекулярные ножницы»?

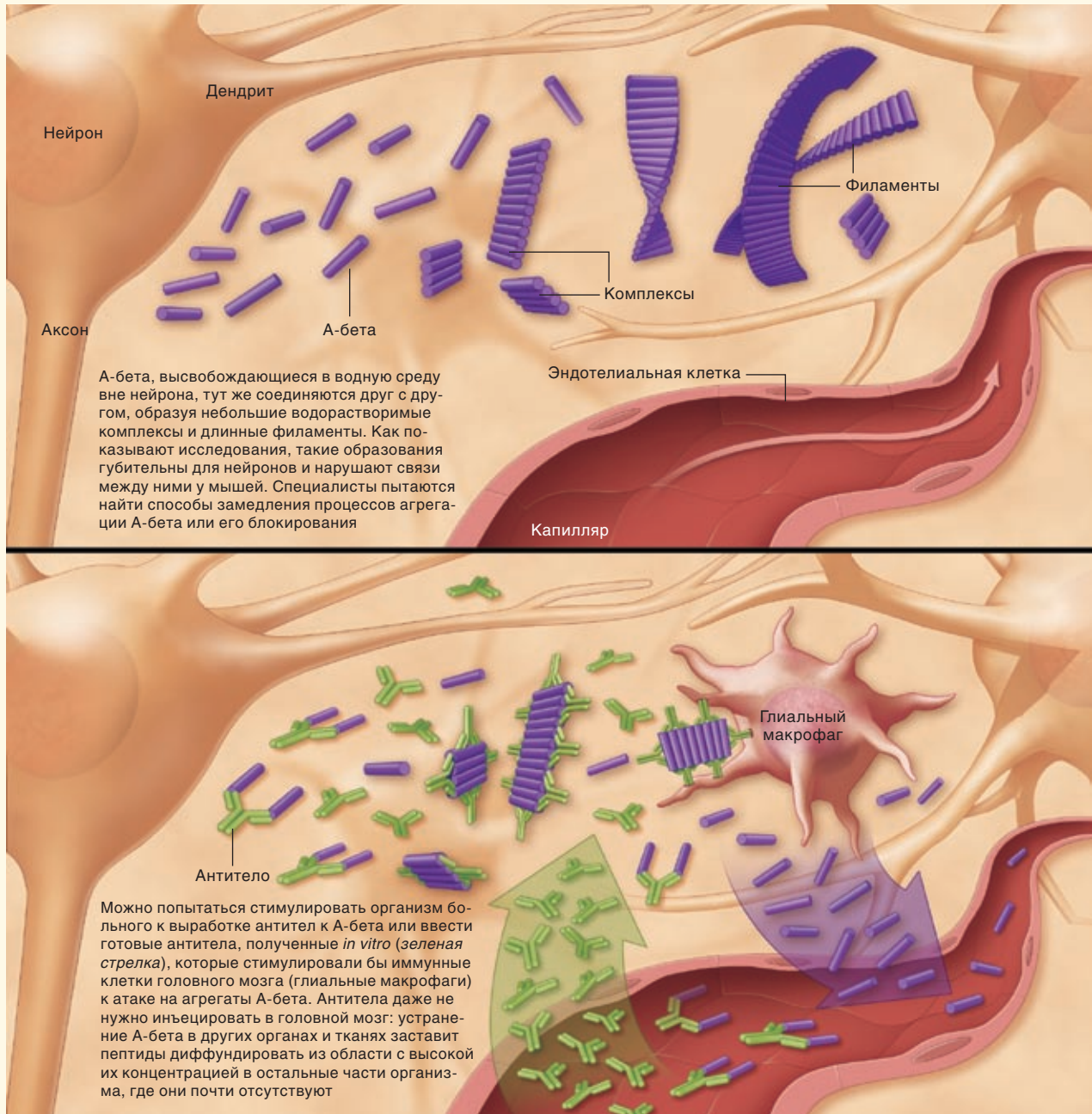
Поскольку А-бета играет ключевую роль «пускового механизма», нужно каким-то образом затормозить его образование, для чего необходимо подавить активность протеиназ, которые отщепляют данный пептид от APP. Доказано, что ингибиторы протеиназ оказывают положительное воздействие при лечении других заболеваний — СПИДа или гипертонической болезни. Первый шаг к образованию А-бета состоит в разрезании бета-секретазой APP на выходе их мембраны. Этот фермент, в больших количествах присутствующий в нейронах головного мозга, был открыт в 1999 г. независимо друг от друга пятью исследовательскими группами. Несмотря на то, что бета-секретаза погружена одним своим концом в мембрану, она сходна с группой протеиназ, целиком находящихся в водной среде внутри и вне клеток. Члены данной группы (в том числе протеиназа, участвующая в репликации ВИЧ, вируса, вызывающего СПИД) используют для ускорения своей работы аспарагиновую

кислоту (одну из аминокислот). Всем протеиназам при разрезании соответствующих белков нужна вода, а ферменты, относящиеся к группе аспартил-протеиназ, привлекают две молекулы аспарагиновой кислоты для активации молекулы воды.

Учитывая то, что бета-секретаза относится к упомянутому семейству ферментов, можно суммировать всю информацию о других членах этого же семейства с тем, чтобы составить полное представление о данном ферменте и о том, как его можно вывести из строя. Поскольку исследователями установлена трехмерная структура бета-секретазы, они могут использовать ее как шаблон при компьютерном подборе возможных ингибиторов. Результаты генетических исследований позволяют предположить, что блокирование ферментативной активности не приведет ни к каким нежелательным для организма последствиям. Во всяком случае, опыты на мышах показали, что удаление гена, кодирующего бета-секретазу, сопровождается исчезновением А-бета из головного мозга животных без побочных

## ГОЛОВНОЙ МОЗГ: ИММУННАЯ АТАКА

Один из способов лечения болезни Альцгеймера заключается в освобождении головного мозга от токсичных агрегатов А-бета



эффектов. Однако в настоящее время ингибиторы бета-секретазы, которые можно было бы предложить для клинических испытаний, не найдены. Самое главное препятствие заключается в размере молекулы вещества: чтобы проникнуть

в мозг, она должна быть небольшой. В отличие от кровеносных сосудов в других частях тела, капилляры в головном мозге выстланы изнутри эндотелиальными клетками, уложенными настолько плотно, что протиснуться между ними могут

только очень мелкие молекулы. Чтобы попасть в головной мозг, ингибиторы протеиназ должны пройти через клеточные мембраны, однако большинство крупных молекул не могут преодолеть гематоэнцефалический барьер.

Второй шаг к образованию А-бета состоит в отщеплении выступающего из мембраны гамма-секретазного «обрубка», который остается от APP после отрезания его бета-секретазой. При этом гамма-секретазы проявляет удивительную способность использовать воду, «работая» в гидрофобной среде, какой является внутренний слой мембраны. Понять свойства протеиназы помогли два обстоятельства. Во-первых, в 1998 г. Барт де Стропер (Bart De Strooper) из Католического университета в Лувье (Бельгия) обнаружил, что делегирование гена *presenilin 1* у мышей радикальным образом уменьшает частоту разрезания APP гамма-секретазой. Это значит, что белок, кодируемый упомянутым геном, необходим для работы фермента. Во-вторых, сотрудники моей лаборатории (я работал в то время в Университете Теннесси в Мемфисе) доказали, что вещество из класса обычных ингибиторов аспартил-протеиназ блокирует расщепление APP гамма-секретазой. Такое положение вещей предполагает, что гамма-секретазы, как и бета-секретазы, содержат два остатка аспарагиновой кислоты, необходимые для разрезания белка. На основании данной информации мы предположили, что пресенилин представляет собой необычную аспартил-протеиназу, «вшитую» в ткань клеточной мембраны. Когда я работал в Гарвардском университете, мы вместе с коллегами обнаружили в молекуле пресенилина два аспарагиновых остатка в той части аминокислотной цепи, которая погружена в мембрану, и доказали, что они необходимы для выполнения гамма-секретазой ее функции. Далее было установлено, что ингибиторы гамма-секретазы связываются непосредственно с пресенилином, который для выполнения своей работы должен объединиться с двумя другими погруженными в мембрану белками. Теперь гамма-секретазы считается родоначальником нового класса протеиназ, «втягивающих» внутрь клеточной мембраны воду, без которой они не могут функционировать.

Два года назад я прочел лекцию школьникам пятого класса, где учился мой сын. Я рассказал им о том, чем занимаются сотрудники моей лаборатории, объяснил, что такое амилоиды и откуда они берутся, поделился нашими планами относительно выведения из строя ферментов, участвующих в их образовании, и поиска лекарства для лечения болезни Альцгеймера. Один мальчик спросил меня: «А что, если ферменты необходимы организму для чего-нибудь другого? Ведь вы можете навредить человеку». Опасение, высказанное 10-летним ребенком, вовсе не лишено оснований: гамма-секретазы играет ключевую роль в клеточной дифференцировке в различных органах и тканях, в том числе в созревании стволовых клеток в костном мозге, в результате чего образуются эритроциты и лимфоциты. Кроме того, гамма-секретазы расщепляет находящийся на поверхности клетки белок, так называемый *Notch*-рецептор. Сегмент белка отсоединяется от мембраны, попадает внутрь клетки и посылает ядру сигнал, от которого зависит дальнейшая судьба клетки.

В больших концентрациях ингибиторы гамма-секретазы оказывают токсическое действие на подопытных мышей вследствие подавления *Notch*-сигнала, что делает проблематичным их применение в медицине. Тем не менее, фирма *Eli Lilly* провела тест на безопасность (I фаза клинических опытов) одного из ингибиторов и собирается приступить ко II этапу испытаний на пациентах на ранней стадии заболевания. Кроме того, идентифицированы вещества, изменяющие активность гамма-секретазы таким образом, что она перестает катализировать образование А-бета, но по-прежнему расщепляет *Notch*-рецептор. Данные вещества не взаимодействуют с остатками аспарагиновой кислоты фермента, зато они связываются с молекулой во многих других местах и изменяют ее конформацию.

Некоторые ингибиторы оказывают на фермент совсем другое действие: под их влиянием он катализирует

образование не той версии А-бета, что склонна к агрегации, а более коротких пептидов, которые кластеризуются менее охотно. Один такой препарат, флуризан, получен Эдвардом Ку (Edward Koo) из Калифорнийского университета в Сан-Диего и Тодом Голдом (Todd Golde) из Клиники Майо в Джексонвилле. В результате его испытаний на пациентах на ранней стадии болезни Альцгеймера получены обнадеживающие результаты, позволяющие перейти к III фазе испытаний.

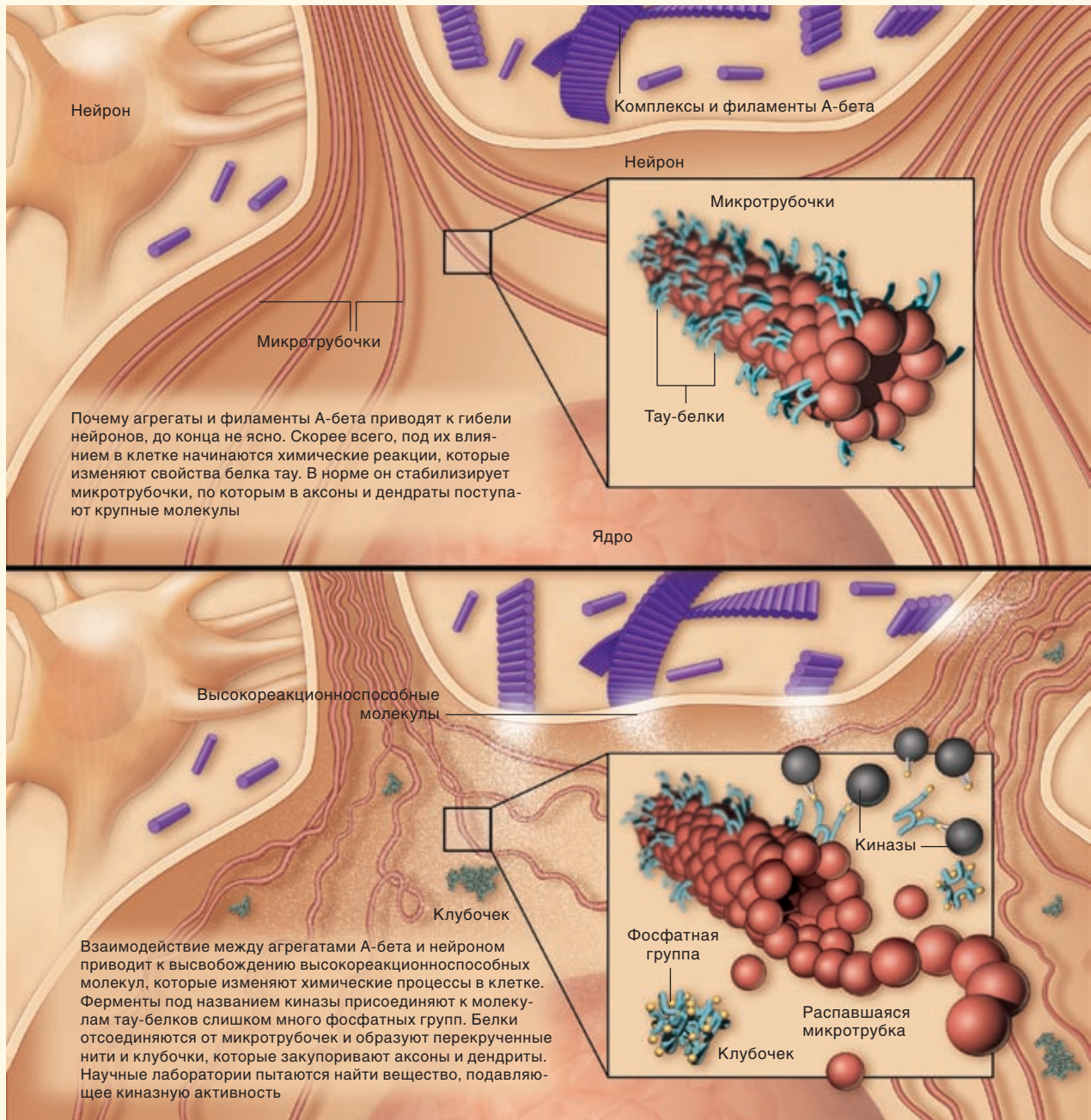
### В головном мозге — ничего постороннего

Альтернативный метод лечения болезни Альцгеймера состоит в освобождении головного мозга от комплексов А-бета уже после их образования, в частности, с помощью иммунной системы самого больного. В 1999 г. Дейл Шенк (Dale B. Schenk) из *Elan Corporation* (Сан-Франциско) сделал интересное открытие: введение А-бета трансгенным мышам со склонностью к образованию бляшек вызывало иммунную реакцию, в результате которой не только не появлялись новые образования в головном мозге молодых животных, но и рассасывались уже существующие у старых. У иммунизированных мышей продуцировались антитела, которые распознавали А-бета и побуждали клетки головного мозга разрушать пептидные агрегаты (рис. на стр. 54). Положительные результаты опытов на грызунах позволили очень скоро перейти к клиническим испытаниям.

Тест на безопасность препарата прошел успешно, однако во время II этапа у некоторых пациентов возникло серьезное осложнение — энцефалит (воспаление головного мозга), поэтому работы были прерваны. Дальнейшие исследования показали, что воспаление могло возникнуть вследствие слишком сильной реакции Т-клеток иммунной системы на кластеры А-бета. Испытания показали, что у многих больных в организме стали вырабатываться антитела к А-бета и улучшилось состояние. ▶

## ФАТАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ

Как прервать цепочку процессов, происходящих на более поздних стадиях заболевания?



Небезопасность активной иммунизации привела медиков к мысли об альтернативном способе — пассивной иммунизации, т.е. введению в организм готовых антител. Последние были получены из клеток мышей и модифицированы так,

чтобы избежать их отторжения организмом человека, исключить гиперактивацию Т-клеток и связанные с ней осложнения. Метод пассивной иммунизации, разработанный *Elan Corporation*, проходит сейчас II фазу клинических испытаний.

Каким образом активная или пассивная иммунизация может привести к удалению А-бета из головного мозга — не совсем понятно, поскольку неизвестно, легко ли антитела преодолевают гематоэнцефалический барьер. Впрочем, есть

предположения, что им и не нужно делать ничего подобного: растворение бляшек А-бета в остальных частях тела может привести к массовому «исходу» этих пептидов из головного мозга просто за счет диффузии в сторону меньшей их концентрации. На сегодня пассивная иммунизация представляется наиболее перспективной, но ее альтернативу тоже не стоит сбрасывать со счетов. Как показывают результаты предварительных исследований, проведенных в Гарвардском университете, иммунизация с использованием определенных сегментов молекулы А-бета, а не целого пептида стимулирует выработку В-клеток, а Т-клетки при этом не образуются и воспаления не возникает.

Интерес представляют и иммунологические методы предотвращения агрегации А-бета с помощью веществ, которые связываются с пептидами и поддерживают их в растворимом состоянии в жидкой среде вне нейронов головного мозга. Фирмой *Neurochem* из Квебека получено низкомолекулярное вещество альцгемед, имитирующее действие гепарина, природного антикоагулянта. Гепарин препятствует «склеиванию» тромбоцитов в крови и образованию тромбов, но когда этот полисахарид связывается с А-бета, пептид, напротив, приобретает еще большую склонность к образованию бляшек. Поскольку альцгемед связывается с теми же сайтами А-бета, что и гепарин, он блокирует действие последнего и уменьшает агрегацию пептида. Альцгемед почти не оказывает неблагоприятного воздействия даже при высоких дозах и положительно влияет на симптоматику. Сейчас полным ходом идут клинические испытания этого вещества (III фаза).

### Мишень — белок тау

Образование амилоидных бляшек — лишь одна из бед, которые поджидают людей, попавших в цепкие лапы болезни Альцгеймера. Вторая, не менее страшная, — тау-нити, формирующие клубочки внутри нейронов. Их устранение так же

необходимо для предотвращения дегенерации нейронов, как и разрушение амилоидных бляшек. Усилия исследователей направлены на поиск веществ (ингибиторов киназ), которые перегружают фосфатными группами белок тау, создавая предпосылки к появлению нитей. Пока никаких кандидатов на роль ингибиторов, с которыми можно было бы проводить клинические испытания, не найдено. Но ученые надеются, что их усилия увенчаются успехом, и наступление сразу на двух фронтах (амилоидные бляшки и белок тау) в конце концов позволят победить болезнь.

Возможно, перспективным окажется еще один метод лечения болезни Альцгеймера — использование статинов, лекарственных препаратов, понижающих уровень холестерина в крови. Их широко используют для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний. Согласно эпидемиологическим данным, люди, принимающие статины, реже становятся жертвами болезни Альцгеймера. В чем причина такой корреляции, не вполне понятно. Вероятно, снижая уровень холестерина, данные препараты способствуют также падению уровня APP, а может быть, они воздействуют непосредственно на процесс образования А-бета, подавляя активность соответствующих секретаз. Сейчас поводится тестирование способности одного из статинов, препарата под названием липитор (фирмы *Pfizer*), предотвращать развитие болезни Альцгеймера.

Другое интересное направление — клеточная терапия. Марк Тусзински (*Mark Tuszynski*) из Калифорнийского университета в Сан-Диего провел следующий эксперимент: он взял кожный биоптат у пациента, имеющего раннюю стадию болезни Альцгеймера, и ввел в его клетки ген, кодирующий фактор роста нервов (ФРН). Затем генетически модифицированные клетки были введены в передний мозг больного. Смысл процедуры заключался в том, что имплантированные клетки начнут вырабатывать ФРН, который

предотвратит утрату ацетилхолин-продуцирующих нейронов и тем самым остановит нейродегенеративные процессы. Клеточная терапия является единственным способом доставки ФРН в головной мозг, поскольку столь крупная молекула не может преодолеть гематоэнцефалический барьер. Пока все исследования проводились на небольшом числе пациентов, причем без участия контрольной группы, что считается серьезным недостатком. И тем не менее, есть указания на то, что у больных наметилось некоторое смягчение симптомов: улучшение памяти, когнитивных функций и т.д.

Конечно, далеко не все из описанных методов окажутся столь многообещающими, как думалось вначале. Но врачи надеются, что найдется хотя бы одно средство, способное замедлить или даже остановить разрушительные процессы, опустошающие головной мозг жертв болезни Альцгеймера. Тогда можно будет приступить к следующему этапу борьбы с недугом — восстановлению утраченных функций.

Лекарственные препараты, нацеленные на А-бета, останавливают патологический процесс только на ранних стадиях, будут ли они эффективны, если болезнь зайдет слишком далеко, пока не ясно. Но у исследователей есть повод для оптимизма. Многочисленные открытия недавнего времени утвердили нас во мнении, что поиски способов лечения такого страшного недуга, как болезнь Альцгеймера, в конце концов принесут свои плоды. ■

### ОБ АВТОРЕ

**Майкл Вульф** (*Michael S. Wolfe*), профессор неврологии Гарвардской медицинской школы, занимается изучением молекулярных основ болезни Альцгеймера и разработкой методов ее лечения. В начале 2006 г. организовал в Гарварде лабораторию по разработке лекарственных средств для лечения болезни Альцгеймера.