ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА ПРОБЛЕМ ХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ
И МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Броновицкий Евгений Вадимович

МОДУЛЯЦИЯ FUS-ПРОТЕИНОПАТИИ ШАПЕРОНОМ HSP70 В МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ДВИГАТЕЛЬНОГО НЕЙРОНА

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

1.5.4 – Биохимия

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Устюгов Алексей Анатольевич

Черноголовка – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ 5
ВВЕДЕНИЕ… 10
Цель и задачи исследования 13
Научная новизна работы 13
Теоретическая и практическая значимость 13
Методология и методы диссертационного исследования 14
Положения, выносимые на защиту 15
Степень достоверности и апробация результатов 15
Личный вклад автора 16
Публикации по теме диссертации 16
Структура и объём диссертационного исследования 17
Благодарности 17
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 19
1.1. Современный взгляд на молекулярно-генетические аспекты этиологии НДЗ 19
1.2. Молекулярно-генетические и биохимические аспекты БАС 22
1.3. Агрегация РНК-связывающих белков при БАС 25
1.3.1 TAR ДНК-связывающий белок 43 (TDP-43) 25
1.3.2 Белок Fused in sarcoma (FUS) 26
1.3. Текущее состояние терапии нейродегенеративных заболеваний 29
1.4. Основные направления в разработке терапевтических средств от БАС 31
1.4.1 Антисмысловые олигонуклеотиды (АСО) 33
1.4.2 Генная терапия 35
1.5.1 Активация макроаутофагии как терапевтическая стратегия 37
1.5.2 Шапероны как потенциальные терапевтические агенты 38
1.5.3 Молекулярные механизмы нейропротекторного действия Hsp70 40
1.5.4 Терапевтические стратегии с использованием системы Hsp70 49
1.5.5 Вызовы и ограничения AAV-опосредованной генотерапии Hsp70 при БАС 53
1.5.6 Выбор AAV-серотипа для доставки HSPA1A 54
1.5.7 Заключение по литературному обзору 55
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 57
2.1 Получение вирусного препарата 57
2.1.1 Наработка и очистка плазмидной конструкции 57
2.1.2 Продукция (сборка) рекомбинантных AAV-частиц, наработка вирусного препарата и его очистка…… 60

2.1.3 Оценка чистоты и качества вирусного препарата ... 62
2.1.4 Оценка продукта экспрессии трансгена *in vitro* ... 63
2.2 Экспериментальные животные ... 63
2.2.1 Линии животных и условия содержания ... 63
2.2.2 Обоснование выбора доз вирусного препарата для однократного системного введения ... 64
2.2.3 Формирование экспериментальных групп животных и схема эксперимента с введением вирусного препарата ... 65
2.3 Анализ эффективности трансдукции rAAV-Hsp70 ... 67
2.4 Биохимический анализ сыворотки крови ... 69
2.5 Анализ экспрессии генов маркеров нейровоспаления, нейропластичности и апоптоза ... 69
2.6 Анализ дофаминовой дисрегуляции у трансгенных животных S-FUS(1-359) ... 70
2.7 Поведенческое тестирование ... 71
2.8 Анализ экспрессии генов *Hsp* у трансгенных животных S-FUS(1-359) на основе данных РНК-секвенирования ... 71
2.9 Методы статистического анализа ... 72
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ... 73
3.1 Общие сведения об используемой тест-системе ... 73
3.1.1 Ретроспективный анализ основных фенотипических параметров модели ... 74
3.1.2 Влияние пола и дозы трансгена на фенотипические параметры модели ... 76
3.1.3 Динамика набора и потери массы тела у трансгенных животных ... 79
3.1.4 Длительность и частота двигательных нарушений ... 82
3.1.5 Модель S-FUS(1-359) в контексте существующих моделей БАС ... 84
3.1.6 Высокая индивидуальная вариабельность как свойство модели ... 86
3.1.7 Прогностическая ценность возраста начала симптоматической стадии ... 86
3.1.8 Влияние дозы трансгена и ограниченная роль пола ... 87
3.1.9 Динамика массы тела как отражение прогрессирования заболевания ... 87
3.1.10 Экспрессия трансгена FUS и генов маркеров нейровоспаления и нейропластичности ... 87
3.1.11 Экспрессия генов, регулирующих апоптоз, иммунный ответ и внутриклеточную сигнализацию ... 90
3.1.12 Анализ состояния дофаминовой системы ... 91
3.1.13 Истощение шаперонной системы на симптоматической стадии FUS-протеинопатии ... 94
3.2 Получение вирусного препарата и его верификация ... 97
3.2.1 Получение конструкции pAAV-CASI-HSPA1A-3xFLAG-WPRE ... 97

3.2.2 Очистка плазмидной ДНК 98
3.2.3 Продукция рекомбинантных AAV-частиц 100
3.2.4 Очистка рекомбинантных AAV-частиц и оценка чистоты вирусного препарата 100
3.2.5 Оценка продукта экспрессии трансгена в клеточных культурах SH-SY5Y и CHO-S 104
3.3 Эффект однократного системного введения вирусного препарата rAAV-Hsp70 на модели FUS-протеинопатии 107
3.4 Продукция Hsp70 в ЦНС 107
3.5 Клеточно-специфическая локализация Hsp70 в спинном мозге 107
3.6 Оценка системной безопасности rAAV-Hsp70 у мышей дикого 111
3.7 Влияние однократного системного введения rAAV-Hsp70 на выживаемость мышей линии S-FUS(1-359).. 115
3.8 Влияние rAAV-Hsp70 на фенотипические характеристики модели 116
3.9 Дозозависимое и регионарно-избирательное влияние rAAV-Hsp70 117
3.10 Динамика изменения массы тела мышей дикого типа после вдения AAV-Hsp70 120
3.11 Динамика изменения массы тела трансгенных мышей линии S-FUS(1-359) после введения rAAV-Hsp70… 121
3.12 Отсутствие значимого влияния rAAV-Hsp70 на двигательные функции трансгенных мышей S-FUS(1-359) 122
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 126
4.1 Пороговая модуляция FUS-протеинопатии 126
4.2 Предполагаемый механизм действия Hsp70 127
4.3 Эффект rAAV-Hsp70 – остановка прогрессии или смещение дебюта вправо? 129
4.4 Регионарная гетерогенность эффекта и функциональные тесты 131
4.5 Переносимость вирусного препарата и возможная периферическая экспрессия 132
4.6 Ограничения исследования и перспективы 133
ВЫВОДЫ…… 135
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 136

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Русскоязычные сокращения

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АМФК – аденозинмонофосфат-активируемая протеинкиназа

АСО – антисмысловые олигонуклеотиды

АСТ – аспартатаминотрансфераза

АФК – активные формы кислорода

БА – болезнь Альцгеймера

БАС – боковой амиотрофический склероз

БП – болезнь Паркинсона

БГ – болезнь Гентингтона

ВД – высокая доза (rAAV-Hsp70)

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГВК – гомованилиновая кислота

ДА – дофамин

ДИ – доверительный интервал

ДОФУК – 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота

ДТ – дикий тип (нетрансгенные животные)

иПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

КФК – креатинкиназа

Кон – контрольная группа

ЛВД – лобно-височная деменция

МСК – мезенхимальные стромальные/стволовые клетки

НД – низкая доза (rAAV-Hsp70)

НДЗ – нейродегенеративные заболевания

НСК – нервные стволовые клетки

НФК – нейрофибриллярные клубки

ПНС – периферическая нервная система

п.н. – пар нуклеотидов

РС – рассеянный склероз

СК – стволовые клетки

СО – стандартное отклонение

СМА – спинальная мышечная атрофия

ФНО – фактор некроза опухоли

ЦНС – центральная нервная система

ЩФ – щелочная фосфатаза

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭР – эндоплазматический ретикулум

3-МТ – 3-метокситирамин

5-НТ – серотонин (5-гидрокситриптамин)

Англоязычные сокращения

Aldh1a1 – альдегиддегидрогеназа 1A1

ANOVA – дисперсионный анализ

APOE – аполипопротеин E

APP – белок-предшественник β-амилоида

ARIA – амилоид-связанные аномалии визуализации

ATXN2 – атаксин-2

AAV – аденоассоциированный вирус

Aβ – β-амилоид

Aβ42 – β-амилоид 42

BAG3 – BCL-2-ассоциированный атаноген 3

BDNF – мозговой нейротрофический фактор

C9ORF72 – открытая рамка считывания 72 на хромосоме 9

CASI – гибридный промотор (CMV + chicken β-actin + UBC)

CASA – шаперон-зависимая селективная аутофагия

Casp3 – каспаза-3

Cav-1 – кавеолин-1

CHIP – белок, взаимодействующий с С-концом Hsc70

CHO-S – линия клеток яичника китайского хомячка (суспензионная)

CRISPR - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

CMV – промотор цитомегаловируса

Comt – катехол-О-метилтрансфераза

DMEM – среда Дульбекко, модифицированная Иглом

ECL – усиленная хемилюминесценция

EMA – Европейское агентство по лекарственным средствам

EWSR1 (EWS) – точка разрыва гена Саркомы Юинга 1

FBS – фетальная бычья сыворотка

FDA – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США

FUS – ген/белок «слияния в саркоме»

GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

GDNF – глия-производный нейротрофический фактор

GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок

GLP – надлежащая лабораторная практика

GRN – програнулин

Gsk3 – киназа гликогенсинтазы-3 бета

HEK293 – линия эмбриональных клеток почки человека

hnRNPA1 – гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A1

hnRNPA2/B1 – гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A2/B1

HR – отношение рисков

HRP – пероксидаза хрена

HSF1 – фактор транскрипции теплового шока 1

HSP – белок теплового шока

HSPA1A – ген индуцибельного белка теплового шока 70

HTT – гентингтин

Il-1b – интерлейкин-1 бета

Il-6 – интерлейкин-6

ITR – инвертированные терминальные повторы

LC3-II – липидированная форма белка LC3 (маркер аутофагосом)

LCD – домен низкой сложности

LLPS – жидкость-жидкостное фазовое разделение

LSD – наименьшая значимая разность (критерий Фишера)

Maoa – моноаминоксидаза A

Maob – моноаминоксидаза B

MAPT – белок тау

MATR3 – матрин-3

MCS – сайт множественного клонирования

mTOR – мишень рапамицина млекопитающих

NEF – нуклеотид-обменный фактор

NEFL – тонкий полипептидный нейрофиламент

NLS – сигнал ядерной локализации

NMDA – N-метил-D-аспартат

NMNAT2 – никотинамид мононуклеотид аденилилтрансфераза 2

OPTN – оптиневрин

p62/SQSTM1 – секвестосома-1 (p62)

PBS – фосфатно-солевой буфер

PES – полиэфирсульфон (мембранный фильтр)

PINK1 – PTEN-индуцированная киназа 1

PKC – протеинкиназа C

polyQ – полиглутаминовый тракт

PRKN – паркин

PSEN1 – пресенилин-1

PSEN2 – пресенилин-2

Puma – p53-регулируемый модулятор апоптоза

qPCR – количественная полимеразная цепная реакция

RBP – РНК-связывающие белки

rAAV – рекомбинантный аденоассоциированный вирус

REML – метод максимального правдоподобия с ограничениями

SDS-PAGE – электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия

SD – стандартное отклонение

SEM – стандартная ошибка среднего

sHSP – малые белки теплового шока

SH-SY5Y – линия клеток нейробластомы человека

SMN2 – ген выживания моторных нейронов 2

SNCA – ген α-синуклеина

SOD1 – супероксиддисмутаза-1

SPF – свободные от специфических патогенов

Stat3 – передатчик сигнала и активатор транскрипции 3

SV40 – вирус обезьян 40 (сигнал полиаденилирования)

SYT13 – синаптотагмин 13

TAF15 (TAF2N) – ассоциированный с TATA-бокс-связывающим белком фактор 15

TARDBP – TAR ДНК-связывающий белок 43

TBK1 – TANK-связывающая киназа 1

TDP-43 – TAR ДНК-связывающий белок 43

Tg – трансгенные животные

Th – тирозингидроксилаза

TIA1 (TIA-1) – T-клеточный внутриклеточный антиген-1

TLR – Toll-подобный рецептор

Tnf – ген фактора некроза опухоли

TNF-α – фактор некроза опухоли альфа (белок)

Trem2 – рецептор, экспрессируемый на миелоидных клетках 2

UBQLN2 – убиквилин-2

Ulk1 – Unc-51-подобная киназа 1

UPS – убиквитин-протеасомная система

WPRE – посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка

WT – дикий тип (wild type)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности проблемы. Нейродегенеративные заболевания (НДЗ) представляют собой гетерогенный класс неврологических расстройств, характеризующихся прогрессирующей дегенерацией нейронов и синаптических связей в центральной и периферической нервной системе. К числу наиболее значимых НДЗ относятся болезнь Альцгеймера (БА), болезнь Паркинсона (БП), боковой амиотрофический склероз (БАС), болезнь Гентингтона (БГ), лобно-височная деменция (ЛВД) и другие заболевания, для большинства из которых до настоящего времени отсутствуют эффективные болезнь-модифицирующие подходы к терапии [1, 2].

Одной из ключевых проблем НДЗ является длительный бессимптомный период, в течение которого патологические изменения развиваются задолго до появления клинических признаков заболевания. Так, при БА патологический процесс может начинаться за 20-30 лет до первых когнитивных нарушений, а при БП продромальные изменения выявляются за 5-10 лет до постановки диагноза [3, 4]. При БАС диагностика также часто запаздывает и может занимать от 10 до 27 месяцев с момента появления первых симптомов [5]. В результате терапия нередко начинается на стадии, когда значительная часть нейрональных популяций уже повреждена, что существенно ограничивает возможность замедления прогрессирования заболевания [6]. Поэтому раннее выявление нейродегенерации и разработка болезнь-модифицирующих подходов остаются одними из наиболее актуальных задач современной нейробиологии и медицины [7, 8].

Недостаточная эффективность существующих методов лечения НДЗ во многом связана со сложной патофизиологией этих заболеваний. Нейродегенеративный процесс включает комплекс взаимосвязанных нарушений: конформационную перестройку и агрегацию белков, митохондриальную дисфункцию, окислительный стресс, эксайтотоксичность, нейровоспаление и повреждение ДНК. Наряду с нарушением протеостаза, важным компонентом патогенеза НДЗ является программируемая клеточная гибель: апоптоз, некроз и аутофагия, которые определяют судьбу нейронов при накоплении патологических белков [9–11]. Дополнительным препятствием является высокая генетическая и фенотипическая гетерогенность НДЗ, а также различия в скорости их прогрессирования и сроках начала терапии [12, 13]. При этом общим патогенетическим признаком многих НДЗ является накопление патологических белков с изменённой конформацией и формирование агрегатов. Несмотря на различия в природе агрегирующих белков, процессы агрегации и клеточного ответа на формирование патологических структур имеют общие черты, что делает протеостаз перспективной мишенью для разработки новых терапевтических стратегий [10]. Альтернативным направлением являются антисмысловые олигонуклеотиды [14]. Однако при БАС эффективность подходов на основе антисмысловых олигонуклеотидов (АСО) остаётся генетически специфичной: отдельные

препараты применимы только к конкретным мутациям, тогда как универсального подхода для большинства пациентов пока не существует [15].

На сегодняшний день генная терапия представляет собой одну из наиболее перспективных стратегий лечения НДЗ. В условиях активного развития методов ранней диагностики этот подход открывает возможность предотвратить прогрессирование заболеваний за счёт экзогенного введения генов или комплементарной ДНК, а также доставки терапевтических белков в участки центральной нервной системы (ЦНС) с очагом патологии. [16], избегая препятствие в виде гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [6, 17]. Доставленные при помощи вирусных частиц гены могут заменять или восстанавливать функции эндогенных генов, изменённых в результате патологических мутаций, а также обеспечивать продукцию нейротрофических факторов (например, BDNF, от. англ. Brain-Derived Neurotrophic Factor), способствующих выживанию нейронов при НДЗ [18]. Клиническая значимость генотерапевтических подходов подтверждается одобрением препарата на основе аденоассоциированного вируса (AAV) для терапии спинальной мышечной атрофии, направленного на доставку функциональной копии гена *SMN1* [19]. Альтернативным направлением являются антисмысловые олигонуклеотиды, включая Нусинерсен, одобренный для терапии спинально мышечной атрофии (СМА) [14]. Однако при БАС эффективность подходов, основанных на АСО остаётся генетически специфичной: отдельные препараты применимы только к конкретным мутациям, тогда как универсального подхода для большинства пациентов пока не существует [15]. В связи с этим дальнейшее развитие терапии НДЗ зависит не только от совершенствования способов доставки, но и от выбора терапевтических мишеней, связанных с общими механизмами нейродегенерации – поддержанием протеостаза и регуляцией ферментативной активности.

Социальная значимость поиска новых терапевтических подходов определяется стремительным ростом распространённости нейродегенеративных заболеваний, которыми в мире страдает более 57 миллионов человек, причём этот показатель, по прогнозам, удваивается каждые 20 лет [20]. В Российской Федерации эпидемиологические данные по отдельным НДЗ остаются ограниченными, однако имеющиеся оценки также указывают на значимость проблемы. В 2024 г. расчётная численность пациентов с болезнью Паркинсона составляла 180–200 тыс. человек; региональная заболеваемость БАС в Москве на уровне 1,25 на 100 000 населения в год, а расчётная численность пациентов с деменцией около 1,95 млн человек и распространённость деменции среди лиц старше 60 лет находится на уровне 10,4% [21–26]. Для болезни Гентингтона оценки варьируют от 1,91 случая на 100 000 населения до 3000-8000 симптомных носителей [27]. Эти данные подчёркивают необходимость разработки болезнь-модифицирующих подходов, направленных на общие механизмы протеинопатий.

К настоящему моменту большинство одобренных методов лечения НДЗ способствуют облегчению характерных для заболевания симптомов и не оказывает непосредственного эффекта на нейродегенеративный процесс [6]. Даже появление болезнь-модифицирующих препаратов для отдельных заболеваний, таких как леканемаб и донанемаб при БА, не решает проблему универсальной терапии, поскольку их применение ограничено спектром показаний, риском побочных эффектов и недостаточной эффективностью на поздних стадиях заболевания [28, 29]. При БАС одним из немногих таргетных методов лечения является применение препарата тоферсен, одобренный для пациентов с мутациями в гене *SOD1* [15]. Однако мутации *SOD1* специфичны для ограниченной группы пациентов с БАС и не отражают весь спектр молекулярных механизмов заболевания [30]. Поэтому особый интерес представляют патологические изменения белков FUS и TDP-43, кодируемых генами *FUS* и *TARDBP*, соответственно, поскольку они связаны с нарушением метаболизма РНК, аномальной цитоплазматической локализацией и агрегацией белков, характерными не только для БАС, но и для ряда других нейродегенеративных заболеваний [31]. БАС при этом остаётся одной из наиболее тяжёлых форм нейродегенерации, поскольку характеризуется избирательным поражением двигательных нейронов, быстрым прогрессированием и летальным исходом вследствие дыхательной недостаточности [32].

В связи с этим всё большее значение приобретают терапевтические стратегии, направленные не на один конкретный мутантный белок, а на общие механизмы нарушения протеостаза. Одним из таких направлений является использование молекулярных шаперонов – белков теплового шока (HSP). Как компоненты системы протеостаза – HSP способны участвовать в рефолдинге неправильно свёрнутых белков, препятствовать их агрегации, способствовать разборке патологических белковых комплексов и направлять повреждённые белки в системы деградации. В экспериментальных моделях показано, что белки теплового шока могут оказывать нейропротекторный эффект при патологиях, связанных с β-амилоидом (Aβ), тау-белком, α-синуклеином, TDP-43 и FUS [1, 33–36].

В настоящей работе AAV-опосредованное повышение экспрессии белка Hsp70 рассматривается как потенциальная стратегия коррекции FUS-ассоциированной протеинопатии, направленная не на специфическое подавление мутантного белка, а на усиление эндогенных механизмов протеостатической защиты нейронов. Такой подход позволяет оценить, способна ли длительная экспрессия и синтез соответствующего молекулярного шаперона – белка теплового шока массой 70 кДа (Hsp70) модифицировать течение FUS-опосредованного БАС-подобного фенотипа в трансгенной модели S-FUS(1-359).

Цель и задачи исследования

Цель. Целью работы является исследование терапевтического потенциала однократного системного введения рекомбинантного аденоассоциированного вируса серотипа PHP.eB, кодирующего белок теплового шока человека Hsp70 при FUS-ассоциированной протеинопатии.

Задачи

1. Провести комплексную молекулярно-фенотипическую и биохимическую характеристику трансгенной линии мышей S-FUS(1-359) как тест-системы для последующей оценки эффективности рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) с геном белка теплового шока Hsp70, включая анализ экспрессии рекомбинантного белка в отделах ЦНС, состояния дофаминовой системы, маркеров нейровоспаления, нейропластичности и апоптоза, а также анализ динамики экспрессии генов *Hsp* на основе данных РНК-секвенирования.

2. Сконструировать рекомбинантный AAV-вектор, кодирующий ген белка теплового шока Hsp70 человека с FLAG-меткой, оценить его функциональность *in vitro* и экспрессию рекомбинантного белка Hsp70 в спинном мозге после однократного системного введения животным.

3. Оценить общую переносимость и потенциал индукции хронического воспаления после однократного системного введения rAAV-Hsp70 у мышей дикого типа, включая анализ биохимических маркеров функции печени, почек и мышц в сыворотке крови и оценку экспрессии генов провоспалительных цитокинов (*Il1b, Il6, Tnf alfa*) как маркеров хронического нейровоспалительного ответа.

4. Выявить эффекты и биологическую активность экзогенного белка Hsp70 после системного введения вирусного препарата на развитие FUS-протеинопатии в трансгенной мышиной модели.

Научная новизна работы

1. Выявлена дисрегуляция дофаминовой системы (накопление дофамина и его метаболитов в стриатуме при снижении экспрессии *Maob*), указывающая на вклад окислительного стресса в нейрональную дисфункцию, и охарактеризована регион-специфичность нейровоспаления: в среднем мозге и стриатуме – цитокиновый ответ, в спинном мозге – астроглиоз. Также выявлено истощение эндогенной шаперонной системы на симптоматической стадии FUS-протеинопатии, проявляющееся в снижении экспрессии гена *Hspa1a* и других генов семейства Hsp70. На выборке n = 505 показана высокая индивидуальная вариабельность БАС-подобного фенотипа и связь возраста дебюта симптомов с общей выживаемостью.

2. Сконструирован и охарактеризован рекомбинантный AAV-вектор серотипа PHP.eB, кодирующий Hsp70 человека с FLAG-меткой. Функциональность подтверждена *in vitro*, экспрессия рекомбинантного Hsp70 выявлена в спинном мозге после однократного системного

введения. Продукт трансгена локализуется преимущественно в нейронах (совместная локализация с маркером нейронов NeuN) и не обнаруживается в микроглии (Iba1) и астроцитах (GFAP).

3. Впервые в модели S-FUS(1-359) показано, что однократное системное введение rAAV-Hsp70 в высокой дозе увеличивает продолжительность жизни трансгенных животных.

4. Установлено, что эффект rAAV-Hsp70 имеет пороговый характер и связан преимущественно с замедлением прогрессирования БАС-подобного фенотипа после появления симптомов.

5.

Теоретическая и практическая значимость

1. Работа расширяет представления о фенотипических особенностях трансгенной модели S-FUS(1-359). Впервые выявлена и охарактеризована дисрегуляция дофаминергической системы в данной модели, что создаёт основу для дальнейшего изучения её роли в патогенезе FUS-ассоциированной протеинопатии и БАС-подобного фенотипа. Показано истощение эндогенной шаперонной системы на симптоматической стадии FUS-протеинопатии, что подтверждает обоснованность терапевтической стратегии экзогенного повышения Hsp70. Обоснована необходимость учёта возраста манифестации симптомов при оценке и интерпретации общей выживаемости животных.

2. Полученные данные расширяют представления о роли Hsp70, показывая, что при повышении порогового уровня AAV-опосредованной экспрессии рекомбинантного белка Hsp70 может влиять на течение БАС-подобного фенотипа.

3. Выявленные параметры естественного течения заболевания и базовые биохимические и молекулярные параметры линии модельных животных могут быть использованы как референсные значения при планировании доклинических исследований на данной модели.

4. Разработанный и охарактеризованный вектор на основе rAAV серотипа PHP.eB может быть использован как система доставки Hsp70 и других белков-шаперонов для оценки их функций *in vivo*.

5. Определён пороговый эффект rAAV-Hsp70 после однократного ретроорбитального введения, который может быть учтён при выборе доз для планирования дальнейших доклинических исследований.

Методология и методы диссертационного исследования

В работе использован комплекс методов молекулярной биологии, биохимии, вирусологии и физиологического анализа генетически модифицированных мышей. Объектом исследования является рекомбинантный аденоассоциированный вирус несущий в своём составе ген *HSPA1A*, кодирующий белок теплового шока Hsp70. Эффективность была изучена с помощью

тест-системы на основе трансгенной линии мышей S-FUS(1-359), моделирующей FUS-ассоциированную протеинопатию с фенотипом, подобным БАС человека. Генную терапию проводили с помощью рекомбинантного аденоассоциированного вируса серотипа PHP.eB, кодирующего Hsp70 человека. Функциональность конструкции *in vitro* оценивали методом иммунофлуоресцентного анализа, наличие продукта экспрессии трансгена *in vivo* подтверждали методом иммуноблоттинга в образцах спинного мозга, иммуногистохимически оценивали его клеточную локализацию. Уровни дофамина, его метаболитов и серотонина в стриатуме определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией, а экспрессию генов метаболизма дофамина – методом количественной ПЦР в реальном времени. Эффект оценивали по выживаемости, динамике массы тела, длительности симптоматической стадии, силе хвата передних конечностей и времени удержания на перевёрнутой сетке. Статистическую обработку проводили с применением параметрических и непараметрических методов в программе GraphPad Prism.

Положения, выносимые на защиту

1. Валидация тест-системы. Линия S-FUS(1-359) провалидирована для оценки модуляции FUS-протеинопатии. Выявлена регион-специфичная дофаминовая дисрегуляция (накопление дофамина и его метаболитов в стриатуме при снижении уровня экспрессии *Maob*), нейровоспаление в среднем мозге и гиппокампе, астроглиоз без цитокинового ответа в спинном мозге. Ретроспективный анализ (n = 505) подтвердил, что возраст дебюта симптомов – основной предиктор выживаемости. На симптоматической стадии выявлено истощение эндогенной шаперонной системы (снижение *Hspa1* и генов семейства Hsp70), обосновывающее экзогенное восполнение Hsp70.

2. **Доставка гена *HSPA1A* в ЦНС.** rAAV-Hsp70 обеспечивает экспрессию рекомбинантного белка Hsp70 *in vitro* (SH-SY5Y, CHO-S) и в спинном мозге животных после системного введения. Экспрессия экзогенного рекомбинантного белка Hsp70 сохраняется не менее 200 суток, продукт экспрессии находится преимущественно в нейронах без колокализации в клетках микроглии.

3. **Безопасность rAAV-Hsp70.** Биохимические показатели сыворотки крови (АЛТ, АСТ, ЩФ, мочевина, креатинин, КФК) находятся в пределах референсных диапазонов. Отсутствует хроническое повышения провоспалительных цитокинов в ЦНС.

4. **Пороговая модуляция FUS-протеинопатии.** Замедление прогрессирования БАС-подобного фенотипа после дебюта (+33% выживаемости, +30% длительности симптоматической стадии), без отсрочки двигательных нарушений.

Степень достоверности и апробация результатов

Основные результаты диссертационной работы были представлены в виде устных и стендовых докладов на конференциях: Международной научной конференции молодых учёных

«Наука на благо человечества – 2024» (Москва, 2024); Всероссийской конференции «Прогресс в биомедицине: от исследований до клинической практики (OrelBioMed)» (Орёл, 2025); Международной научной конференции молодых учёных «Наука на благо человечества – 2026» (Москва, 2026); Саммите разработчиков лекарственных препаратов «Сириус.Биотех – 2026» (Федеральная территория «Сириус», 2026; постерный доклад, отмечен дипломом «За лучший постерный доклад»); Всероссийской конференция с международным участием «НейроБайкал 2026» (Иркутская область, пос. Большие Коты); Всероссийской конференции с международным участием «Инженерная биология и биофармацевтика», приуроченной к 100-летию со дня рождения академика Д. Г. Кнорре (Новосибирск, 2026).

Личный вклад автора

Основные результаты диссертационной работы получены при непосредственном участии автора. Автор принимал непосредственное участие в разработке концепции, цели, задач, рабочих гипотез, а также в подготовке материалов для публикаций и для представления результатов на научных конференциях. Дизайн исследования и методология были разработаны совместно при консультативной и методической помощи соавторов и коллег, указанных в соответствующих разделах диссертации и публикациях. Экспериментальные данные получены автором лично и/или при участии сотрудников лабораторий: работа с трансгенными животными, функциональное тестирование и молекулярно-биологический анализ тканей проведены совместно с сотрудниками группы генетического моделирования нейродегенеративных процессов ИФАВ РАН; получение и очистка вирусных препаратов rAAV выполнены совместно лабораторией иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. Обработка и анализ полученных данных, формулировка основных положений и выводов диссертационной работы, а также написание текста диссертации выполнены автором самостоятельно.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 7 статей в рецензируемых научных журналах. Из них 5 статей опубликованы в изданиях, входящих в перечень ВАК (индексируются в международных базах Scopus и Web of Science, включая RSCI), 2 статьи – в зарубежных журналах, индексируемых в Scopus и Web of Science. Опубликовано 3 работы в сборниках тезисов российских и международных конференций. Также опубликован 1 препринт. Список печатных работ:

1. Robinson H.K., Deykin A.V., Bronovitsky E.V., et al. Early lethality and neuronal proteinopathy in mice expressing cytoplasm-targeted FUS that lacks the RNA recognition motif // Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration. – 2015. – Т. 16. – № 5-6. – С. 402-409. (WoS (Q3), Scopus (Q1))

2. Bronovitsky E., Chaprov K., Khizeva A., et al. Retrospective Study of the Physiological and Molecular Features of the S-FUS (1-359) Mouse Transgenic Model with an ALS-like Phenotype: Lifespan, Body Weight Dynamics, Movement Disorders, and Dysregulation of the Dopaminergic System // Journal of Molecular Neuroscience. – 2026. – Т. 76. – № 1. – С. 8. (WoS (SCIE), Scopus (Q1, Q2))

3. Дейкин А.В., Ковражкина Е.А., Овчинников Р.К., Броновицкий Е.В. и др. Модель бокового амиотрофического склероза на основе линии трансгенных мышей, экспрессирующих мутантную форму FUS белка человека // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2014. – Т. 114, № 8. – С. 62–69. (WoS, Scopus, RSCI, Перечень ВАК (К1))

4. Броновицкий Е.В., Дейкин А.В., Ермолкевич Т.Г. и др. Подавление гамма-карболином нейродегенеративного процесса в условиях трансгенной модели бокового амиотрофического склероза // Доклады Академии наук. – 2015. – Т. 462, № 5. – С. 609–612. (WoS, Scopus, RSCI, Перечень ВАК)

5. Резвых А.П., Штейнберг Д.С., Броновицкий Е.В., Устюгов А.А., Фуников С.Ю. Модельные системы FUS-протеинопатии: систематический обзор // Успехи биологической химии. – 2024. – Т. 64. – С. 73–116. (WoS (Q3, BIOSIS), Scopus (Q2), RSCI, Перечень ВАК)

6. Броновицкий Е.В., Чапров К.Д., Хизева А.А. и др. Фенотипические особенности мышиной модели FUS-протеинопатии с БАС-подобным фенотипом S-FUS (1-359) // Лабораторные животные для научных исследований. – 2025. – Т. 8, № 4. – С. 19–34. (Перечень ВАК (К2))

7. Броновицкий Е.В., Чапров К.Д., Фуников С.Ю., Евгеньев М.Б., Устюгов А.А. Терапевтический потенциал Hsp70 при БАС и других протеинопатиях: от молекулярных механизмов к генотерапии (обзор) // Научные результаты биомедицинских исследований. — 2026. – Т. 12, № 2. – С. 230–268. (WoS, Scopus (Q3), RSCI, Перечень ВАК)

8. Bronovitsky E., Esmagambetov I., Khizeva A., et al. rAAV-mediated Hsp70 gene delivery alleviates FUS-associated ALS-like pathology // PREPRINT (Version 1) Research Square – Sep 2026.

Структура и объём диссертационного исследования

Диссертационная работа состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы. Работа изложена на 168 страницах, иллюстрирована 49 рисунками и 10 таблицами. Список цитируемой литературы включает 322 наименования.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю, директору ИФАВ РАН, доктору биологических наук А.А. Устюгову за всестороннюю поддержку данного исследования, положительную оценку его научной значимости, предоставленную возможность работы на экспериментальной базе ИФАВ РАН, а также за ценные научные консультации и

помощь в планировании экспериментов. Особую благодарность автор выражает К.Д. Чапрову – руководителю группы генетического моделирования нейродегенеративных процессов, на базе которой выполнялась основная экспериментальная часть работы (включая работу с трансгенными животными, поведенческое тестирование и др.), за предоставленный доступ к уникальным животным моделям, оборудованию и ресурсам, за организационную поддержку и неоценимую помощь в интерпретации полученных результатов и глубокую вовлечённость. Автор глубоко признателен И.Б. Есмагамбетову – заведующему лабораторией иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. Отдельные слова благодарности автор адресует своей семье. В первую очередь – своей жене Юлии и детям Еве, Марку и Нелли, а также своей маме, за их безграничную поддержку, терпение и понимание на протяжении всего этого долгого пути. Их участие и вера в автора стали неиссякаемым источником сил и вдохновения.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современный взгляд на молекулярно-генетические аспекты этиологии НДЗ

Нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера (БА), болезнь Паркинсона (БП), боковой амиотрофический склероз (БАС) и др., характеризуются прогрессирующей потерей нейронов, которая приводит к двигательной и когнитивной дисфункции. Несмотря на то, что различные нейродегенеративные заболевания демонстрируют различную этиологию генетического и молекулярного характера, для данных неврологических состояний определены общие клеточные и молекулярные механизмы. В частности, были выделены несколько ключевых механизмов нейродегенерации, которые приведены на рисунке 1 [37].

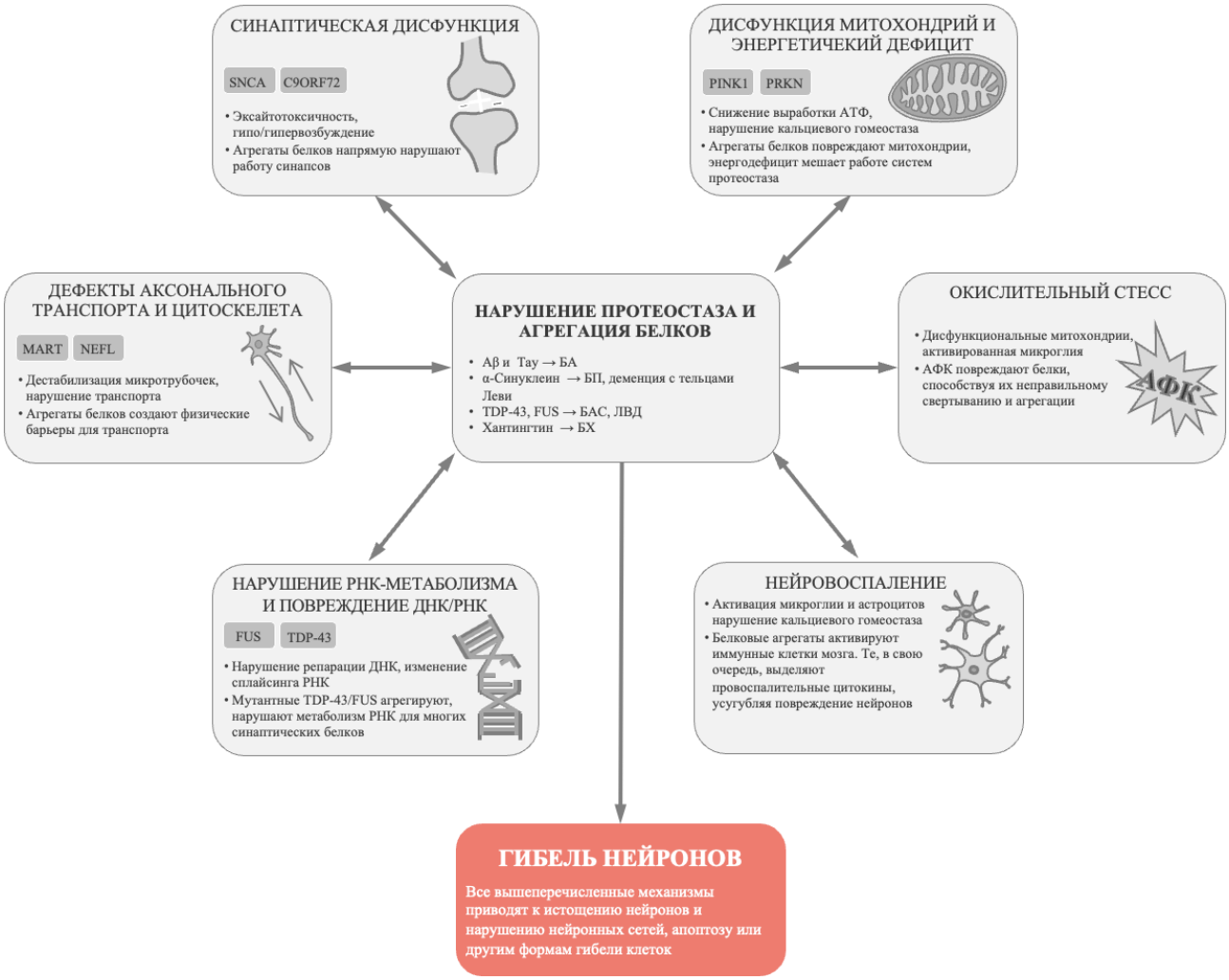


Рисунок 1 – Взаимосвязанные механизмы нейродегенерации. На схеме представлена иерархия молекулярных процессов при нейродегенеративных заболеваниях, где нарушение протеостаза и патологическая агрегация болезнь-специфических белков занимают центральное положение, активируя множественные вторичные механизмы и приводя к конечному общему пути - гибели нейронов. БА – болезнь Альцгеймера, БАС – боковой амиотрофический склероз, БХ – болезнь Гентингтона, БП – болезнь Паркинсона, ЛВД – лобно-височная деменция

Синаптическая дисфункция – один из факторов, представляющих критическое значение для работы нейронной сети и развития НДЗ [1]. Синаптическая дисфункция, включающая в себя гипо-/гипервозбуждение и/или эксайтотоксичность, является предшествующим событием патологического изменения нейронов и возникает на ранних стадиях БА, БП, БАС и др. [38–40]. Синаптическая недостаточность и деградация синапсов были обнаружены до нарушения целостности нейронов и нейронной сети при БА [41]. Глутамат-зависимая эксайтотоксичность, в свою очередь, вызывает гибель нейронов из-за чрезмерного притока Ca^{2+}, который вызывает дисфункцию митохондрий и сопутствующее энергетическое истощение, деградацию белков и липидов, нарушение регуляции физиологических функций и, в конечном счёте, приводит к гибели клеток [1]. Например, повышенная возбудимость нейронов и глутамат-зависимая эксайтотоксичность вносят значительный вклад в этиологию БАС [39]. Кроме того, известно, что мутации в некоторых генах, отвечающих за синаптической функцию, являются причиной определённых НДЗ, в частности, ген α-синуклеина (*SNCA*) при болезни Паркинсона и ген открытой рамки считывания 72 на хромосоме 9 (*C9ORF72*) при боковом амиотрофическом склерозе [42, 43].

Изменение цитоскелета нейронов – следующий фактор, влияющий на прогрессию НДЗ. Данные заболевания непосредственно связаны с дефектами нейронального цитоскелета, который состоит из микротрубочек, нейрофиламентов и микрофиламентов, и поддерживает структуру нейронов и динамику аксонального транспорта [44, 45]. В процессе нейродегенерации также наблюдается снижение эффективности аксонального транспорта и, как следствие, неправильное распределение транспортных везикул и органелл, что оказывает влияние на энергетический метаболизм и синаптическую функцию нейронов [1]. В частности, нарушения в процессе аксонального транспорта были отмечены для БА, БП, БАС и рассеянного склероза [44, 45]. При этом мутации в генах *NEFL*, кодирующем лёгкую цепь нейрофиламента, и *MAPT* – тау-белок, ассоциированный с микротрубочками, напрямую связывают с изменениями цитоскелета, характерными для нейродегенеративных заболеваний [46].

Изменение энергетического метаболизма нейронов – является ещё одной причиной развития НДЗ. Для поддержания активности нейронов требуются высокие затраты энергии, производимой митохондриями. При этом, в условиях НДЗ наблюдается дисфункция митохондрий, что, в свою очередь, влияет на выработку АТФ и высокоэнергетические процессы, такие как поддержание ионного баланса, кальциевого гомеостаза и др., и что приводит к дефектам в энергетическом метаболизме клетки [45, 47]. Данные изменения также могут способствовать индукции окислительного стресса, приводящего к гибели нейрональных клеток [48]. Более того, синаптическая дисфункция и изменения, связанные с цитоскелетом нейронов, также вносят вклад в развитие митохондриальной дисфункции и сниженной энергетической

активности клетки [1]. Мутации в генах, регулирующих контроль качества митохондрий: паркин (*PRKN)* и PTEN-индуцированная киназа 1 (*PINK1*) – играют важную роль в развитии НДЗ [49].

Повреждение ДНК и РНК. При развитии нейродегенеративных заболеваний наблюдаются повреждения в ДНК и РНК. Основной причиной нарушения целостности ДНК и РНК является окислительный стресс, который является одним из факторов развития НДЗ. В частности, в условиях прогрессии БА наблюдается нарушенная регуляция репарации повреждённой активными формами кислорода ДНК [1, 50]. Кроме того, многие характерные признаки НДЗ могут быть непосредственно связаны с мутациями в генах, отвечающих за регуляцию активности синапсов, митохондрий и внутриклеточного транспорта [46, 49]. Нарушение регуляции РНК, включая изменение физиологических функций и токсичность РНК, также способствует развитию НДЗ. Например, неправильно локализованный TDP-43, который функционирует как РНК-связывающий белок, вызывает изменение сплайсинга и транспорта РНК [51], а мутации FUS вызывают нарушения метаболизма РНК, кодирующих белки, регулирующие синаптические функции, при БАС [52].

Воспаление и окислительный стресс. Нейровоспаление представляет собой хроническую активацию микроглии, вызванную агрегацией белков, продукцией активных форм кислорода (АФК) и высокой концентрацией ионов Ca^{2+}, и наблюдается при БА, БП, БАС и др. [53, 54]. В норме микроглия выполняет функцию макрофагов в мозге, осуществляя защиту ЦНС за счёт устранения болезнетворных микроорганизмов, мёртвых клеток, избыточных синапсов, белковых агрегатов и антигенов, однако развитие НДЗ приводит к чрезмерной активации микроглии. При этом, микроглиальные клетки взаимодействуют с астроцитами и активируют их, таким образом влияя на функционирование нейронов и поддержание ионного гомеостаза [55]. В это же время, в ответ на активацию, как микроглия, так и астроциты начинают производить АФК и провоспалительные цитокины, вносящие дополнительный вклад в накопление окислительного стресса в клетках и поддержания хронического воспаления [48].

Все вышеперечисленные признаки приводят к критическому фактору патогенеза НДЗ, гибели нейрональных клеток, который считается конечным результатом развития НДЗ и характерен для всех типов расстройств. В организме нейрональные клетки подвержены высокому риску повреждения и гибели ввиду их постмитотической природы, высокого энергетического метаболизма и зависимости от глиальных клеток. При этом, эксайтотоксичность, дисфункция митохондрий и окислительный стресс являются ключевыми триггерами гибели нейронов. Таким образом, перечисленные отличительные признаки НДЗ и приводят к истощению популяции нейронов и, в результате, нарушению функциональности нейронной сети [1].

Однако выше не были упомянуты ещё два признака, а именно, патологическая агрегация белков и нарушенная регуляция протеостаза. В настоящее время в качестве центрального механизма прогрессии нейродегенеративных заболеваний рассматривается именно изменённая патологическая конформация белков и их агрегация в виде олигомеров или фибрилл [56]. При этом, нарушенная регуляция протеостаза позволяет белкам избежать процесса деградации и приводит к чрезмерному накоплению агрегированных белков в клетке, что приводит к изменению их физиологической функции [10]. Патологические молекулярные изменения, связанные с накоплением и агрегацией белков с патологической конформацией, приводят к нейродегенерации и такому состоянию как протеинопатия, которые включают в себя болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона, деменцию с тельцами Леви, множественную систематическую атрофию, боковой амиотрофический склероз, лобно-височную деменцию и др. [57, 58].

Протеинопатия как патологическое состояние характеризуется единым патофизиологическим процессом, заключающимся в повышенной агрегации белков с изменённой конформацией и снижении скорости их клиренса. Эти нарушения затрагивают ключевые клеточные процессы и непосредственно обуславливают развитие нейродегенеративного каскада. Согласно этой гипотезе этиологии НДЗ, патогенетическая терапия должна быть нацелена на таргетное устранение специфических белковых агрегатов. Очевидно, что нарушение протеостаза с последующей агрегацией белков является одним из центральных звеньев в патогенезе рассмотренных нейродегенеративных заболеваний. Этот процесс, будучи общим для многих НДЗ, в каждом конкретном случае имеет свои уникальные черты, определяемые природой агрегирующего белка. Чтобы глубже понять, как конформационные изменения отдельных белков способны запускать целый каскад клеточных нарушений, приводящий к специфической клинической картине, обратимся к анализу бокового амиотрофического склероза – заболевания, в котором протеинопатия играет первостепенную роль.

1.2. Молекулярно-генетические и биохимические аспекты БАС

Боковой амиотрофический склероз или болезнь Лу Герига – это хроническое стремительно прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, поражающее верхние и нижние двигательные нейроны и неизбежно приводящее к летальному исходу. Дисфункция двигательных нейронов, характерная для данного заболевания, приводит к мышечной атрофии и фасцикуляции, и в конечном счёте, потере контроля над осознанными движениям. При этом БАС является наиболее распространённым заболеванием среди группы болезней двигательного нейрона, для которого выживаемость после постановки диагноза составляет всего 3-5 лет. БАС может быть классифицирован по своей форме на семейный, или наследственный, и

спорадический. Семейный тип БАС составляет около 10% всех случаев заболевания, и 40-55% из них приходится на мутации в известных генах, характерных для БАС. При помощи современной диагностики был определён лишь малый процент патологий, лежащих в основе прогрессии бокового амиотрофического склероза спорадической природы, и этиология данного типа БАС остаётся необъяснимой у более чем 90% пациентов, что существенно ограничивает развитие терапии этого заболевания [59].

Среди ключевых генов, ассоциированных с развитием БАС, выделяют *C9ORF72*, *SOD1*, *TARDBP* и *FUS*. Данные гены вовлечены в патогенные процессы, в том числе, агрегацию неправильно свёрнутых белков, дисрегуляцию метаболизма РНК, активацию стресса эндоплазматического ретикулума (ЭР) и окислительного стресса, митохондриальную дисфункцию, эксайтотоксичность, нейровоспаление, нарушение аксонального и везикулярного транспорта, и являются признаками БАС как протеинопатии. Ключевые патогенетические пути при RBP-протеинопатии представлены на рисунке 2.

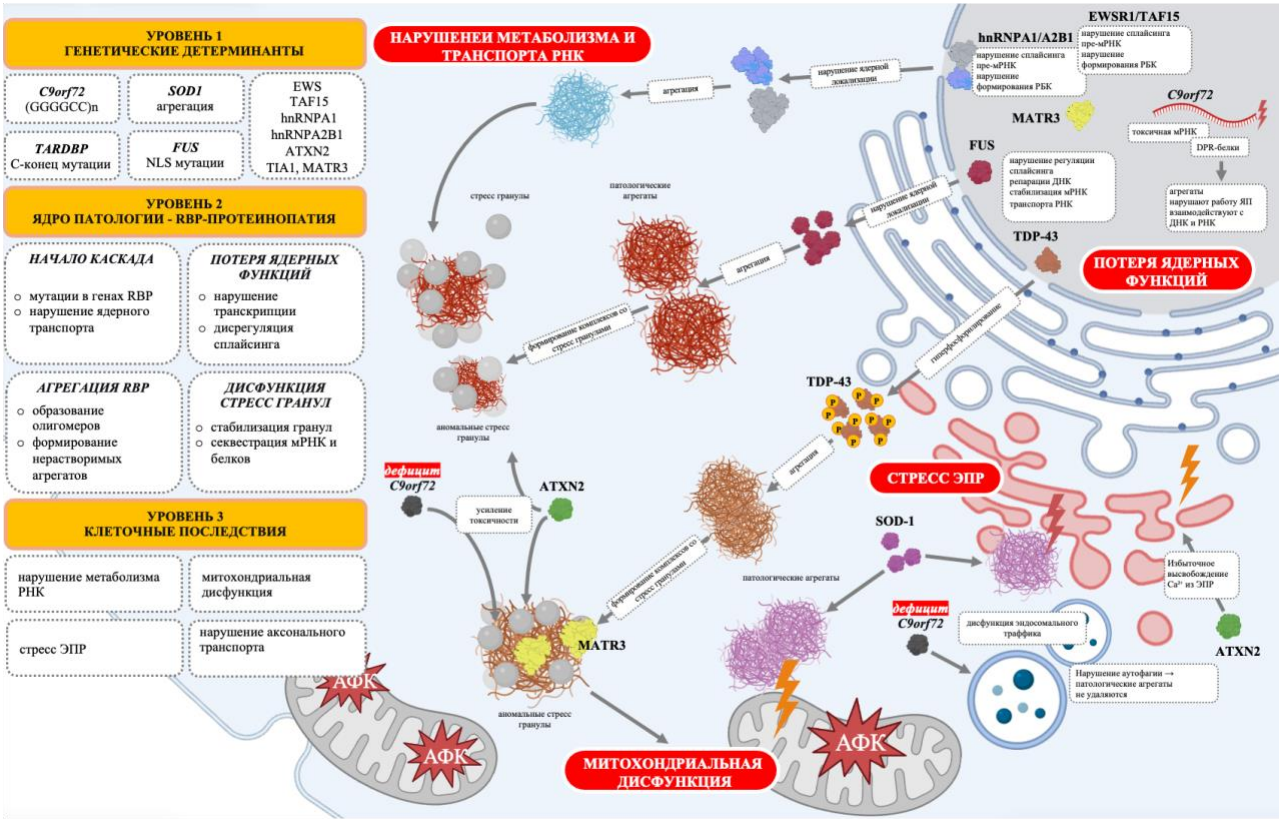


Рисунок 2 – Ключевые патологические аспекты РНК-связывающих белков при БАС

Около трети всех семейных и некоторых спорадических случаев развития БАС приходится на мутации в гене *C9ORF72*. При развитии заболевания наблюдается увеличение числа гексануклеотидных повторов (GGGGCC), которое может достигать тысяч повторов в некодирующей области гена *C9ORF72* [60]. Исследования последних лет установили роль участия *C9ORF72* в процессах транскрипции и сплайсинга РНК, аутофагии, везикулярного

транспорта и формирования стресс-гранул [61, 62]. Около 20% всех случаев развития наследственного БАС опосредовано возникновением мутаций в гене *SOD1*, продуктом которого является белок супероксид дисмутазы, отвечающий за дисмутацию супероксидных свободных радикалов [63]. Мутантная форма белка SOD1 характеризуется изменённой конформацией и повышенной способностью к агрегации, и является матрицей для формирования токсичных белковых агрегатов. Важно отметить, что белковые включения содержат не только мутантные варианты SOD1, но и нативную изоформу белка [31]. При этом, описанные белковые агрегаты могут формироваться в митохондриях нейрональных клеток и впоследствии влиять на энергетический метаболизм, уровень окислительного стресса и др. [47, 64]. Агрегаты, включающие SOD1, откладываются в эндоплазматическом ретикулуме и колокализуются с маркерами стресса ЭР, вызывая его дисфункцию [65]. Мутантная форма SOD1 негативно воздействует на везикулярный транспорт в клетке. Мутации в SOD1 приводят к сродству данного белка к компонентам цитоскелета клетки, а именно, к актину и микротрубочкам, что ухудшает рост нейронов и митохондриальное деление [31]. Несмотря на то, что роль мутантного SOD1 в процессах окислительного стресса, агрегации белков, аксонального транспорта и митохондриальной дисфункции хорошо изучена, точные механизмы не до конца понятны [66]. Для лечения SOD1-опосредованного БАС в настоящее время применяется генная терапия в виде единственного одобренного препарата на основе АСО. Разработка терапии БАС, направленной на элиминацию агрегирующего мутантного белка SOD1, служит одним из «примеров» для дальнейшего применения генной терапии других протеинопатий, но изменения в гене *SOD1* являются крайне специфическими для БАС, что накладывает ограничения на применение данного подхода для терапии других типов протеинопатий [30].

Другие случаи проявления наследственного БАС являются результатом мутаций в гене *FUS* и гене *TARDBP*, кодирующего белок FUS и TDP-43, соответственно. Мутации в гене *FUS* приводят к тяжёлой и стремительной прогрессии заболевания [67]. FUS и TDP-43 являются ДНК-/РНК-связывающими белками, но при патологических процессах склонны к агрегации [68]. Оба могут быть секвестрированы в цитоплазме клеток, вызывая недостаток РНК-связывающих белков в ядре и нарушения в процессе транскрипции и процессинге РНК при БАС [63]. Важно отметить, что ЛВД и БАС являются тесно связанными расстройствами со схожими комплексами симптомов. Накопление патологических агрегатов FUS и TDP-43 характерно в том числе и для БА и БП [10, 69]. Интересно отметить, что большинство пациентов со спорадическим БАС, для которых была выявлена патология TDP-43, не имеют мутации в гене *TARDBP*, что может указывать на ключевую патологическую роль самого TDP-43 при БАС [70].

Таким образом, отсутствие эффективных болезнь-модифицирующих терапий для большинства форм БАС, особенно FUS-ассоциированных, диктует необходимость поиска

принципиально новых подходов, направленных на коррекцию фундаментальных механизмов протеостаза. Одним из наиболее перспективных подходов является усиление эндогенной шаперонной активности, способной специфически распознавать и нейтрализовать агрегацию ключевых патологических белков БАС. Однако для рационального дизайна терапии, нацеленной на агрегацию, необходимо исчерпывающее понимание молекулярных мишеней – патологических конформаций РНК-связывающих белков, чьи свойства и механизмы агрегации требуют детального рассмотрения.

1.3. Агрегация РНК-связывающих белков при БАС

Накопление неправильно свёрнутых белков – отличительная черта многих НДЗ, включая БАС [71]. В частности, БАС характеризуется возникновением мутаций и дальнейшей агрегацией изменённых РНК-связывающих белков, таких как TDP-43, FUS, ассоциированный с TATA-бокс-связывающим белком фактор 15 (TAF15, TAF2N), точка разрыва гена Саркомы Юинга 1 (EWSR1, EWS), гетерогенный ядерный рибонуклеопротеид A1 (hnRNPA1), гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A2/B1 (hnRNPA2/B1), атаксин-2 (ATXN2), Т-клеточный внутриклеточный антиген-1 (TIA1) и матрин-3 (MATR3). В норме эти белки участвуют в метаболизме РНК и при стрессе временно локализуются в стресс-гранулах, что является защитной реакцией клетки. Однако мутации в генах, кодирующих эти белки, приводят к нарушению их функции и запускают патологические процессы: расстройство РНК-гомеостаза, нарушение ядерно-цитоплазматического транспорта, избыточное удержание РНК в гранулах и, как следствие, быстрое развитие БАС [70].

1.3.1 TAR ДНК-связывающий белок 43 (TDP-43)

Высококонсервативный белок TDP-43 состоит из 414 аминокислот и имеет N-терминальный домен, два мотива распознавания РНК, и С-терминальный домен, включающий богатые глицином и глутамином/аспарагином регионы. Кроме того, TDP-43 содержит сигнал ядерной локализации (NLS, от англ. Nuclear Localization Signal), благодаря которому белок преимущественно локализован в ядре, и принимает участие в процессах транскрипции, сплайсинга, стабилизации мРНК и т.д. [31, 51]. При этом TDP-43 может быть экспортирован в цитоплазму клеток для выполнения некоторых других функций. При развитии БАС наблюдается нарушение ядерного импорта данного белка и последующее увеличение концентрации фосфорилированного TDP-43 в цитоплазме, что в последствии приводит к образованию патологических белковых включений и ингибированию активности убиквитин-протеасомной системы (UPS, от англ. Ubiquitin-Proteasome System) [72]. Данные изменения могут быть опосредованы несколькими факторами, в том числе, наличием участков фосфорилирования в глицин-насыщенном домене С-конца гена *TARDBP* и появлением большинства мутаций в данном регионе, а также нарушениями в NLS. При этом истощение запасов TDP-43 в ядре также

влечёт за собой нарушение физиологических функций TDP-43 в клетке, а гиперфосфорилирование усиливает агрегационный потенциал данного белка [73]. Кроме того, аберрантная активность каспаз при БАС может способствовать формированию высокотоксичных С-концевых фрагментов, склонных к формированию нерастворимых фибрилл [74]. Так, и истощение запасов TDP-43, и его гиперэкспрессия являются причинами развития заболевания, и подчёркивают необходимость регуляции концентрации TDP-43 в компартментах клетки [73, 75]. Уровень TDP-43 тщательно контролируется системой ауторегуляции, в которой ключевую роль играет С-концевая область TDP-43, и это подтверждает важность данного белкового домена для развития заболевания [76]. Дополнительно, было установлено, что TDP-43 присутствует в белковых включениях в полиубиквитинированном состоянии, что способствует его усиленному цитоплазматическому накоплению. В настоящее время убиквитинирование рассматривается как патологическая посттрансляционная модификация TDP-43, ассоциированная с БАС [74, 77]. В частности, аккумуляция убиквитинированного TDP-43 может привести к изменению регуляции генов и факторов, участвующих в процессах деградации внутриклеточных белков, способствуя протеинопатии TDP-43 [78]. В свою очередь, мутации в *TARDBP* приводят к митохондриальной дисфункции, митофагии и нарушению аксонального транспорта [31, 79]. Однако точные молекулярные механизмы нейротоксичности, вызванной TDP-43, остаются в значительной степени неизвестными. Протеинопатия, вызванная TDP-43, характеризуется цитоплазматической локализацией нейротоксичных агрегатов, наличием гиперфосфорилированных и убиквитинированных форм белка и их осаждением, а также образованием токсичных С-концевых фрагментов TDP-43 [73, 78, 80].

1.3.2 Белок Fused in sarcoma (FUS)

Другим РНК-связывающим белком, участвующим в патогенезе БАС, является белок FUS. Несмотря на то, что FUS изначально был идентифицирован как продукт гена, вовлечённого в хромосомные транслокации при формировании опухолей, его роль в метаболизме РНК и процессе нейродегенерации была также подтверждена. Данный белок состоит из 526 аминокислот, а его ген характеризуется повсеместной экспрессией и схожими с TDP-43 структурой и физиологическими функциями [78]. Кроме того, данный белок преимущественно локализован в ядре, но может перемещаться в цитоплазму клеток для участия в трансляционной регуляции, транспорте и процессинге мРНК, и др. В норме FUS регулирует восстановление ДНК путём гомологичной рекомбинации и негомологичного соединения концов, а также поддерживает синаптическую пластичность при активации рецепторов глутамата в ЦНС [31, 68]. Возникновение мутаций в области сигнала ядерной локализации приводят к неправильной локализации нейротоксического FUS в цитоплазме и развитию БАС. В отличие от TDP-43, цитоплазматическая агрегация FUS обнаруживается только у пациентов с мутантными

вариантами гена *FUS* [70]. При этом, мутантная изоформа данного белка не подвергается убиквитинированию, гиперфосфорилированию или фрагментации при включении в белковые агрегаты, а мутации, возникающие в гене FUS, представляют собой, в основном, миссенс-мутации и в некоторых случаях – вставки и делеции [63, 69]. Цитоплазматические включения аберрантного FUS связывают и изолируют транспортные белки, тем самым нарушая системы внутриклеточной доставки, включая рибонуклеотиды [81]. Белковые агрегаты FUS включают компоненты стресс-гранул и способствуют формированию более крупных и многочисленных стресс-гранул, что коррелирует со снижением выживаемости клеток [81, 82]. Накопление мутантной формы FUS в цитоплазме также может индуцировать фрагментацию митохондрий и повышение продукции АФК [83, 84]. Однако, конкретные механизмы, посредством которых мутации в гене *FUS* приводят к развитию фенотипа БАС, остаются недостаточно изученными. Предполагается, что изменённая форма белка FUS схожа по свойствам с прионными белками и при агрегации вовлекает нативные изоформы. При этом FUS-содержащие агрегаты не включают TDP-43, EWS и TAF15, что свидетельствует о независимости FUS-обусловленных нейродегенеративных процессов от неправильной локализации других белков и подчёркивает ключевую роль FUS в патогенезе БАС [78]. Важно отметить, что FUS также регулирует экспрессию нескольких генов, ассоциированных с БАС, таких как *SOD1*, *убиквилин-1* и *убиквилин-2*, что дополнительно подтверждает его значимость в развитии заболевания и перспективность разработки таргетной терапии, направленной на FUS [85].

Помимо TDP-43 и FUS, другие белки также вносят вклад в развитие БАС как протеинопатии, например, члены семейства FET – EWS и TAF15. Данные белки структурно и функционально схожи с FUS, и также участвуют в процессах, связанных с метаболизмом РНК, репарацией ДНК и реакциями клетки на стресс. Мутации в генах *EWSR1* и *TAF15* были описаны для небольшой когорты пациентов БАС [67, 86]. Изменения в данных генах при БАС были связаны с внеядерной локализацией белков в клетке, нарушением процесса репарации ДНК и транскрипции, а также приводили к усиленному агрегационному потенциалу из белковых продуктов. Кроме того, чрезмерная экспрессия *TAF15* коррелировала с сокращением продолжительности жизни животных моделей, а увеличение числа копий гена *EWSR1* способствовало развитию нейродегенерации [87, 88].

Мутации в генах *hnRNPA2B1* и *hnRNPA1* также могут оказывать влияние на развитие БАС. Белки hnRNPA1 и hnRNPA2B1 относятся к семейству гетерогенных ядерных рибонуклеопротеинов (hnRNP), которое включает менее 20 белков, связывающих и процессирующих пре-матричную РНК [70]. В частности, hnRNPA1 и hnRNPA2B1 имеют схожие функции, которые заключаются в регуляции созревания мРНК, сплайсинге, трансляции и

поддержании её стабильности [89]. Кроме того, hnRNPA1 может рекрутироваться клеткой для формирования стресс-гранул [90]. Было обнаружено, что мутации как в hnRNPA2B1, так и в hnRNPA1, приводят к аномальному накоплению данных белков в двигательных нейронах, нарушая процессинг РНК, и в конечном итоге, способствуют развитию БАС [31, 91]. Предполагается, что белки атаксин-2, Т-клеточный внутриклеточный антиген 1 (TIA-1) и матрин-3 также могут участвовать в процессе развития бокового амиотрофического склероза [70]. Атаксин-2 представляет собой РНК-связывающий белок, который участвует в регуляции метаболизма РНК, включая поддержание стабильности мРНК, полиаденилирование и трансляцию. В отличие от TDP-43 и FUS, атаксин-2 преимущественно локализуется в цитоплазме клеток и привлекается для формирования стресс-гранул, а также участвует в реорганизации цитоскелета и поддержании кальциевого гомеостаза [92, 93]. Структура атаксина-2 характеризуется наличием повторов полиглутамина, а их увеличение идентифицируется как значительный фактор риска прогрессии БАС. Изменённая форма атаксина-2 также может взаимодействовать с NADPH-оксидазой, и как следствие, приводить к увеличению уровня АФК, повреждению ДНК и митохондриальному стрессу [94]. Атаксин-2 играет ключевую роль в регулировании токсичности агрегатов TDP-43 и FUS посредством белок-белковых взаимодействий. Было показано, что увеличение уровня атаксина-2 также усиливает токсичность TDP-43 в моделях животных, тогда как снижение уровня данного белка оказывало положительное влияние на TDP-43-опосредованную нейротоксичность [95]. TIA-1 также является RBP, принимающим участие в процессах сплайсинга мРНК и трансляции, и регулирует экспрессию генов, отвечающих за апоптоз, развитие воспаления и пролиферацию клеток. Кроме того, TIA-1 является ключевым компонентом стресс-гранул [96, 97]. Мутации в гене данного белка могут влиять на его агрегационную способность, нарушать процесс разборки стресс-гранул и секвестрировать молекулы РНК *in vitro*, что представляет собой факторы развития БАС [98]. Матрин-3 также, в норме, регулирует транскрипцию, процессинг РНК, альтернативный сплайсинг, экспорт и поддержание стабильности мРНК. В настоящее время существует ограниченное количество данных о механизме патогенности мутантного матрина-3 в развитии БАС, однако данный белок был выявлен в цитоплазматических включениях TDP-43 при этом заболевании. Кроме того, сообщается, что матрин-3 может косвенно влиять на формирование стресс-гранул [99, 100]. Оценка основных патологических механизмов представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Матрица патологических процессов при БАС

Ген	Нарушение ядерного транспорта	Агрегация в цитоплазме	Дисфункция стресс-гранул	Нарушение метаболизма РНК	Митохондриальная дисфункция	Стресс ЭПР	Нарушение аксонального транспорта
C9orf72	•	••	•	•	•	•	•
TDP-43	•••	••••	••	••••	••	••	••
FUS	••••	••••	••••	•••	•••	•	•••
SOD1		••••			••••	••••	•••
TAF15/EWS	••	••	•	•	-	-	-
hnRNPA1/A2B1	-	••	•	•••	-	-	-
ATXN2	-	-	•••	-	•	-	-
TIA1	-	•	••••	•	-	-	-
MATR3	•	-	•	••	-	-	-

Примечания – • – слабая/косвенная вовлеченность, •• – умеренная вовлеченность, ••• – сильная вовлеченность, •••• – ключевая/центральная роль, **(-)** – не участвует / минимальная роль. Оценка основана на литературных данных о прямых и основных патологических механизмах. Некоторые белки могут оказывать дополнительные косвенные эффекты.

В основе патогенеза БАС лежит глубинное нарушение протеостаза, проявляющееся в конформационной нестабильности и агрегации РНК-связывающих белков. Данный механизм объединяет БАС с другими нейродегенеративными заболеваниями протеинопатической природы – БА (β-амилоид, тау-белок), БП (α-синуклеин) и ЛВД (TDP-43). Однако при сопоставлении этих молекулярных механизмов с современными подходами к терапии выявляется фундаментальное несоответствие. Большинство существующих препаратов, включая рилузол и эдаравон при БАС, леводопу при БП и ингибиторы ацетилхолинэстеразы при БА, воздействуют на вторичные симптомы или отдельные звенья патогенеза, не затрагивая корневую причину – нарушение фолдинга, конформации и агрегации белков. Даже новейшие методы лечения, такие как антисмысловые олигонуклеотиды (тоферсен) и моноклональные антитела (леканемаб, донанемаб), демонстрируют ограниченную эффективность и применимость лишь к определенным подгруппам пациентов. Таким образом, для большинства пациентов с протеинопатиями сохраняется своего рода «терапевтический вакуум», что определяет настоятельную необходимость поиска средств, способных напрямую модулировать процессы фолдинга и клиренса ключевых патологических белков. В этом заключается фундаментальный потенциал «шаперонной терапии», способной воздействовать на универсальные механизмы протеостаза, общие для различных нейродегенеративных заболеваний.

1.3. Текущее состояние терапии нейродегенеративных заболеваний

Согласно статистике, численность населения в возрасте 60 лет и старше увеличится с 1 до 2,1 миллиарда человек, в то время как количество людей, достигших возраста 80 лет и старше, увеличится до 426 миллионов к 2050 году [101]. При этом наблюдается как увеличение продолжительности жизни людей, так и ускоренное глобальное старение населения и

сокращение рождаемости [102] по всему миру, что приводит к значительному росту возраст-ассоциированных заболеваний, в том числе, нейродегенеративных заболеваний. Сегодня прогнозируется, что мировые финансовые издержки, связанные с терапией НДЗ, увеличатся почти в десять раз и достигнут 9,12 триллионов долларов США к 2050 году, среди которых более 1 триллионов долларов США будет направлено на лечение и уход только за пациентами с БА [103, 104]. В настоящее время большинство из одобренных препаратов для терапии НДЗ не позволяют существенно замедлить прогрессию данных заболеваний и значительно продлить жизнь пациентов, а следовательно, и исследования в области терапии нейродегенеративных заболеваний приобрели первостепенное значение на сегодняшний день.

За последние три десятилетия было проведено множество клинических исследований препаратов нейропротекторного, антиоксидантного, противовоспалительного и антиглутаматергического действия, однако ни один из них не продемонстрировал в полной мере положительного влияния на развитие заболевания [105]. В связи с этим, разработка болезнь-модифицирующей терапии НДЗ, которая могла бы воздействовать на ключевые процессы патогенеза данных заболеваний, остаётся приоритетным направлением исследований. Для терапии БА одобрено восемь препаратов, включая симптоматические (ингибиторы ацетилхолинэстеразы: донепизил, галантамин, ривастигмин; блокатор NMDA-рецепторов: мемантин, бензгалантамин) и болезнь-модифицирующие (леканемаб, донанемаб, адуканумаб) [28]. Леканемаб связывает растворимые протофибриллы β-амилоида, донанемаб – укороченную форму β-амилоида в бляшках, активируя микроглию [106, 107]. Одобренные препараты направлены лишь на облегчение симптомов, но не модифицируют течение заболевания [108]. В настоящее время активно разрабатываются новые патогенетически ориентированные терапии, включая ингибиторы β/γ-секретаз, анти-Aβ вакцины и средства анти-тау терапии. Разрабатываются ингибиторы β/γ-секретаз, анти-Aβ вакцины и анти-тау средства, но пока без значимого преимущества над плацебо [109].

Терапия БП и БГ остаётся преимущественно симптоматической. При этом БП характеризуется наиболее стремительным развитием среди всех нейродегенеративных заболеваний. Современная терапия БП основана на дофамин-замещающих препаратах [110]. Наиболее эффективным средством является леводопа [111]. Среди исследуемых болезнь-модифицирующих подходов следует отметить моноклональные антитела к α-синуклеину (цинпанемаб, празинезумаб), которые не показали значимой клинической эффективности [112, 113]. Перспективными представляются агонисты рецепторов глюкагон-подобного пептида [114]. Тем не менее, создание препаратов, способных модифицировать течение БП, продолжает оставаться актуальной задачей [110].

Симптоматическая терапия БГ направлена на коррекцию хореи и для стабилизации психического состояния [115–117]. Активно исследуется таргетная терапия БГ с применением антисмысловых олигонуклеотидов. АСО томинерсен, нацеленный на продукты гена *HTT*, показал недостаточную эффективность в испытаниях III фазы [118]. Также разрабатываются подходы с использованием малых молекул различных классов (ингибиторов криопирина, антагонистов дофаминовых рецепторов, ингибиторов сиртуина-1 и др.) [119]. Ситуация с терапией лобно-височной деменции ещё более ограничена – лечение сводится к применению антидепрессантов и антипсихотиков, причём препараты для других видов деменций при ЛВД неэффективны [120].

Проведённый анализ выявляет общую тревожную тенденцию для основных нейродегенеративных заболеваний – наличие «терапевтического вакуума» в отношении болезнь-модифицирующего лечения. Большинство доступных стратегий оказывают лишь симптоматический эффект, а новейшие подходы демонстрируют ограниченную эффективность, серьёзные побочные эффекты, или применимы лишь к узким когортам пациентов. Сложность патогенеза БАС, сочетающая черты нескольких протеинопатий, и стремительное течение делают его своего рода «испытательным полигоном» для болезнь-модифицирующих стратегий. Анализ современных подходов к его лечению, предпринятый в следующей главе, покажет, насколько существующие методы соответствуют его сложным молекулярным механизмам, и позволит оценить, формируется ли для этого заболевания аналогичный «терапевтический вакуум» или же здесь намечаются прорывные стратегии, способные стать образцом для терапии других НДЗ.

1.4. Основные направления в разработке терапевтических средств от БАС

Глобальная распространённость БАС составляет 5,5 случаев на 100 000 человек [121]. Ранняя диагностика БАС до сих пор представляет собой серьёзную клиническую проблему, что обуславливает отсроченное начало непосредственного лечения заболевания. Диагностика БАС значительно затруднена, в зависимости от формы заболевания в среднем занимает около двух лет с момента появления первых симптомов, что приводит к отсроченному началу терапии на продвинутых стадиях заболевания, когда патологический процесс уже широко распространён [5]. В связи с этим, изучение природы патогенеза БАС и разработка эффективных терапевтических стратегий, способных существенно замедлить или предотвратить прогрессию данного заболевания, остаётся одной из приоритетных задач.

В настоящее время доступно ограниченное количество одобренных болезнь-модифицирующих препаратов, что обусловлено рядом факторов: особенностями фармакокинетики препаратов, ограниченной проницаемостью через ГЭБ и отсутствием избирательного воздействия средств на ключевые факторы патогенеза НДЗ. В связи с этим, продолжается разработка новых терапевтических агентов, включая малые молекулы. Препараты

на основе низкомолекулярных соединений могут преодолевать ГЭБ и прецизионно регулировать биохимические и молекулярные механизмы, принимающие участие в развитии НДЗ [122]. Далее будут рассмотрены одобренные на сегодняшний день к применению в клинической практике, низкомолекулярные препараты для терапии БАС.

Рилузол – 6-(трифторметокси)бензотиазол-2-амин

Рилузол является первым одобренным Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) препаратом для лечения страдающих БАС пациентов, который в течение продолжительного времени являлся единственным доступным для терапии медикаментом [123, 124]. Рилузол является антагонистом глутамата, препятствуя высвобождению и распознаванию данной молекулы в синаптической щели. Действие данного препарата направлено на снижение глутамат-опосредованной эксайтотоксичности, предположительно, посредством модуляции активности Na^+-каналов на пресинаптическом окончании, астроцитарных транспортеров глутамата, обеспечивающих клиренс глутамата из синаптической щели, а также рецепторов глутамата, локализованных на постсинаптической мембране [124]. Несмотря на то, что рилузол после его выхода на рынок в 1995 является единственным доступным для клинического применения препаратом. Его эффективность в среднем ограничена замедлением прогрессии заболевания всего на 2-3 месяца [125].

Эдаравон – 1-фенил-3-метил-5-пиразолон

В 2017 году FDA одобрило применение второго средства для терапии БАС – эдаравона (1-фенил-3-метил-5-пиразолон). Данный препарат выступает в качестве антиоксиданта, действие которого, в частности, направлено на снижение окислительного стресса в нейронах. Эдаравон препятствует продукции АФК и реактивных форм азота, и как следствие, модулирует нейровоспалительную реакцию организма, хотя точный механизм его работы не до конца исследован [126]. Клинические испытания препарата демонстрируют менее выраженную эффективность эдаравона в отношении выживаемости пациентов по сравнению с применением рилузола [127], а его использование может вызывать побочные реакции, а именно, анафилактический шок, экзему, лёгочную недостаточность и нарушение ходьбы, в связи с чем, EMA не одобрило его использование на территории ЕС [122, 124]. Важно отметить, что также была оценена эффективность комбинированного применения эдаравона и рилузола с целью воздействия на несколько факторов патогенеза БАС, таких как окислительный стресс и эксайтотоксичность. Данная комбинация действительно продемонстрировала влияние на течение заболевания и была принята в некоторых странах в качестве стандарта по уходу за страдающими БАС пациентами, однако комбинирование применение препаратов не оказывает прямого воздействия на формирование белковых агрегатов как ключевой патологический БАС-ассоциированный процесс [123].

Таурурсодиол и фенилбутирата натрия

Третьим препаратом, одобренным FDA в 2022 году для терапии БАС, является комбинация таурурсодиола (тауроурсодезоксихолевая кислота) и фенилбутирата натрия. Данные препараты проявляли нейропротекторную активность и способствовали выживанию нейронов путём снижения уровня АФК, уменьшения стресса в ЭР и коррекции митохондриальной дисфункции [128, 129]. Их точный механизм действия также полностью не ясен, однако доклинические исследования характеризовали таурурсодиол-фенилбутират натрия как «химический шаперон», который препятствовал неправильному сворачиванию белка, и таким образом ингибировал развитие стресса эндоплазматического ретикулума [130]. Применение комбинации данных веществ приводило к замедлению прогрессии БАС приблизительно на 35% по сравнению с плацебо-группой и способствовало увеличению медианой выживаемости пациентов примерно на 6,5 месяцев [131]. Однако на основании неудовлетворительных результатов III фазы клинических испытаний, в 2024 году производитель добровольно отозвал одобрение FDA на производство данного препарата [132].

Таким образом, несмотря на одобрение FDA низкомолекулярных препаратов для терапии БАС, их эффективность ограничена, а применение сопровождается серьёзными побочными реакциями. Эти средства не препятствуют дальнейшему развитию заболевания. За последние 25 лет приоритетным направлением в терапии НДЗ оставалась разработка малых молекул и белковых соединений, однако их функциональные характеристики не обеспечивали значимого замедления прогрессии [127]. В связи с этим фокус современных исследований смещается в сторону таргетных методов, способных воздействовать на патогенетические факторы БАС и оказывать болезнь-модифицирующий эффект.

1.4.1 Антисмысловые олигонуклеотиды (АСО)

Одним из наиболее перспективных классов мишеней в рамках болезнь-модифицирующей терапии является РНК, которая непосредственно вовлечена в патогенез НДЗ. В частности, воздействие на аберрантные транскрипты РНК, являющиеся основой для трансляции неправильно свёрнутых белков и формирования белковых агрегатов, привлекает особое внимание исследователей. Так, в настоящее время в качестве РНК-таргетной терапии НДЗ активно используются синтетические АСО [133]. АСО представляют собой короткие одноцепочечные химически модифицированные нуклеотидные последовательности, которые специфически связываются с целевыми фрагментами РНК и регулируют экспрессию с помощью нескольких механизмов. АСО препятствуют процессингу и трансляции мРНК посредством влияния на добавление посттрансляционных модификаций и нарушения сборки субъединиц рибосомы или её продвижения вдоль транскрипта [134]. Применение АСО может модулировать процесс сплайсинга, нарушая рамку считывания [135], а также способствовать процессу

деградации РНК, который осуществляется с помощью рибонуклеазы H1 [133]. Дополнительно, АСО могут избирательно связываться с некодирующими РНК, которые действуют как энхансеры или сайленсеры генов. Было продемонстрировано взаимодействие АСО с эндогенными микроРНК, которые участвуют в развитии различных заболеваний [136].

В настоящее время FDA одобрило применение единственного препарата на основе АСО для пациентов с БАС. Препарат тоферсен – это антисмысловой олигонуклеотид второго поколения, нацеленный на 3′-нетранслируемую область гена *SOD1* и вызывающий деградацию его мРНК, и таким образом, снижающий его экспрессию в клетке [123, 137]. Мутации в *SOD1* характерны примерно для 20% и 1-2% случаев развития наследственного и спорадического БАС, соответственно [63]. Введение данного препарата больным БАС в течение 28 недель клинических испытаний привело к снижению концентрации нейрофиламентных белков, которые являются маркерами нейроаксонального повреждения, и концентрации SOD1. Данные молекулярные изменения способствовали замедлению прогрессии заболевания, сохранению двигательной функции и усилению выживаемости двигательных нейронов, однако они не были статистически значимыми по сравнению с изменениями в плацебо-группе [15]. Несмотря на это, производитель инициировал клинические испытания тоферсена в отношении пациентов с предсимптомной БАС, которые имеют мутации в гене *SOD1* и пороговые для развития заболевания уровни нейрофиламентных белков [123]. Тем не менее, данный препарат обладает рядом недостатков. Во-первых, введение тоферсена обусловлено инъекцией препарата в спинномозговой канал поскольку он не способен самостоятельно преодолевать ГЭБ. Во-вторых, при клинических испытаниях наблюдались серьёзные побочные эффекты, которые включали миелит и/или радикулит, асептический менингит, повышенное внутричерепное давление и др. [138]. В-третьих, в настоящее время проводятся дополнительные исследования в отношении долгосрочной клинической эффективности тоферсена, и отмечается, что терапия основе АСО может вызывать повышение уровня нейровоспалительных маркеров, и способствовать развитию воспалительных реакций [139].

В настоящее время другой препарат на основе АСО включён в III фазу клинических испытаний для лечения пациентов с FUS-ассоциированным развитием бокового амиотрофического склероза. Введение ION363 *in vivo* моделям с индуцированным БАС способствовало снижению уровня FUS в головном и спинном мозге, препятствуя дегенерации двигательных нейронов [140]. Использование данного препарата для лечения пациентов с определённой мутацией в гене *FUS* привело к значительному снижению экспрессии *FUS* в ЦНС. Кроме того, цитоплазматическая агрегация FUS также была снижена до критических значений после введения ION363 [133].

Кроме того, ведутся клинические испытания АСО препаратов, нацеленных на другие мутации, связанные с развитием БАС. Один из них, WVE-004, направлен на ген *C9ORF72* и находится на I/II фазе исследований. Его механизм действия основан на подавлении патологических транскриптов гена *C9ORF72* с увеличенным числом гексануклеотидных повторов. Предполагается, что нейротоксический эффект при этой форме БАС связан не с самим продуктом экспрессии *C9ORF72*, а именно с этими молекулами РНК. Поэтому снижение уровня продукта *C9ORF72* с помощью АСО может не дать терапевтического эффекта. Это особенно важно, так как при мутациях в *SOD1* и *FUS* болезнь развивается из-за избытка соответствующих белков, тогда как при мутациях в *C9ORF72* наблюдается обратная ситуация – гаплонедостаточность [141, 142]. При этом полная элиминация *C9ORF72* у мышей не приводила к нейродегенерации и развитию БАС [143].

Разработанный в 2020 году АСО препарат BIIB105 таргетировал мутантную форму гена *ATXN2*, характеризующуюся экспансией полиглутаминовых повторов, которая провоцирует агрегацию TDP-43 и FUS [95]. Несмотря на первоначальные обнадёживающие результаты I фазы, показавшие снижение уровня TDP-43 и положительное влияние на болезнь, в 2024 году клинические исследования были остановлены из-за неудовлетворительных результатов фазы I/II [144]. Таким образом, применение АСО в качестве болезнь-модифицирующей терапии БАС остаётся многообещающим, но сложным направлением современных исследований. Перспективность подхода обусловлена возможностью таргетного воздействия на ключевые звенья патогенеза благодаря широкому спектру химических модификаций в структуре олиго и высокой специфичности распознавания целевой РНК. Вместе с тем, за кажущейся универсальностью метода скрывается его принципиальное ограничение: стратегия «один олигонуклеотид – одна мишень» требует разработки индивидуального препарата для каждой мутации, что существенно сужает потенциальную область применения и увеличивает временные и финансовые затраты. Кроме того, успешность терапии ограничивается сложностями доставки АСО в поражённые нейроны и отсутствием точных данных о терапевтической концентрации, необходимой для эффективного влияния на прогрессирование заболевания.

1.4.2 Генная терапия

Генная терапия рассматривается как перспективный подход для лечения широкого круга НДЗ. Её преимущества перед традиционными подходами заключаются в возможности преодоления гематоэнцефалического барьера с помощью вирусных векторов, липосом или наночастиц для доставки генетического материала непосредственно в целевые области ЦНС [145], а также в потенциале для однократного или курсового применения, что позволяет избежать проблем, связанных с постоянным повышением дозировки и побочными эффектами

при длительном лечении. Более того, посредством генной терапии возможно усилить экспрессию генов, чьи продукты оказывают нейропротекторное действие, и в результате, способствовать модуляции патогенетических процессов, участвующих в развитии НДЗ [18, 146]. Наиболее успешно генная терапия реализована для лечения спинальной мышечной атрофии (СМА), которая, как и БАС, является патологией двигательных нейронов. Для СМА разработано несколько этиотропных препаратов, включая АСО: нусинерсен, низкомолекулярный препарат: рисдиплам и генотерапевтический препарат: онасемноген абепарвовек. Действие нусинерсена и рисдиплама направлено на коррекцию сплайсинга *SMN2*, что повышает выработку функционального белка SMN и достоверно улучшает двигательные функции пациентов [147–149]. В свою очередь, онасемноген абепарвовек доставляет с помощью AAV9 вектора функциональную копию *SMN1* непосредственно в двигетельные нейроны, обеспечивая длительный терапевтический эффект после однократного введения [150, 151]. Совокупно эти препараты демонстрируют высокую болезнь-модифицирующую активность [152].

Ключевым ограничением данной терапии является её исключительная высокая стоимость. По данным официального сайта Единой информационной системы в сфере закупок (https://zakupki.gov.ru) годовой курс нусинерсена оценивается в диапазоне от 23 до 48 млн. рублей, рисдиплама – до 24 млн. рублей, а разовая инфузия онасемноген абепарвовек – составляет в среднем 93,5 млн. рублей. Хотя разработка сопряжена с рисками и значительными затратами компаний, высокая стоимость может быть отчасти оправдана форматом «один укол – один раз» и значительным снижением общего социо-экономического бремени заболевания при эффективном лечении [153–155]. В России расчёты показывают, что скрининг и ранняя терапия СМА позволяют ежегодно снижать связанные с заболеванием затраты более чем на 7% [156].

Успешный опыт разработки таргетной терапии для СМА, патологии двигательных нейронов, служит важным прецедентом для создания аналогичных стратегий для БАС, открывая путь для применения генной терапии и других этиотропных методов. В настоящее время область генотерапевтических средств для лечения БАС находится преимущественно на предклинической стадии развития [145, 150]. В 2020 году на животных моделях была успешно применена стратегия по редактированию мутантного *SOD1*. Система основана на использовании редактирования генома методом CRISPR-Cas9 с AAV-вектором для проведения нуклеотидной замены [157]. Было установлено, что проведённое генетическое редактирование эффективно подавляло прогрессирование мышечной атрофии и процессов денервации, а также способствовало восстановлению нервно-мышечных функций. Более того, у мышей, прошедших курс данной терапии, зафиксировано снижение количества включений SOD1 на 40% по сравнению с контрольной группой животных. При этом следует отметить, что большинство разрабатываемых

в настоящее время генно-терапевтических подходов к лечению БАС ориентированы на доставку нейротрофических факторов, а не на прямую замену дефектных генов их функциональными копиями [146]. В частности, исследования продемонстрировали, что сверхэкспрессия таких факторов, как синаптотагмин-13 (SYT13) и кавеолин-1 (Cav-1), стимулировала удлинение аксонов, поддерживала нормальную нейрональную активность и, как следствие, оказывала положительное влияние на продолжительность жизни модельных мышей [158]. Ряд препаратов, обладающих потенциалом к модификации течения БАС, достиг ранних фаз клинических исследований. В частности, применение одного из таких средств на основе AAV-опосредованной доставки микроРНК, таргетирующей *SOD1*, позволило снизить уровень патологического белка SOD1 и улучшить двигательную функцию пациентов. Несмотря на обнадёживающие результаты, дальнейшее развитие данной терапевтической программы не было продолжено [159]. Значимым событием стало получение компанией SineuGene Therapeutics в 2025 году разрешения FDA на проведение I/II фазы клинических испытаний препарата SNUG01. Этот генотерапевтический подход основан на использовании AAV-вектора для доставки *TRIM72*, призванного обеспечить нейропротекторный эффект на двигательные нейроны, подверженные патологическим изменениям [160].

Таким образом, несмотря на значительный прогресс, развитие генной терапии БАС сталкивается с фундаментальным ограничением: в отличие от высокоэффективных подходов при моногенных заболеваниях (таких как СМА), её применение оказывается значительно более сложным для полигенных патологий, к категории которых относится и БАС. Современные генотерапевтические стратегии при БАС в основном сосредоточены на обеспечении нейропротекции и поддержании жизнеспособности нейронов, что, однако, не решает ключевой проблемы заболевания – системного нарушения протеостаза и патологической агрегации белков [145]. Это фундаментальное ограничение стимулирует научное сообщество к поиску принципиально иных, универсальных терапевтических стратегий, которые были бы направлены не на коррекцию отдельных генов, а на воздействие на ключевые патогенетические механизмы, общие для всего спектра заболеваний, связанных с нарушением белкового гомеостаза (протеинопатий).

1.5.1 Активация макроаутофагии как терапевтическая стратегия

Активация макроаутофагии – перспективное направление коррекции протеинопатий, поскольку у пациентов с НДЗ выявлены дефекты аутофагии, сопровождающиеся накоплением мутантных белков [1, 161]. Усиление аутофагальной активности в моделях *in vivo* БА, БП и БГ позволило модулировать нейродегенеративный процесс [162, 163]. Ингибиторы mTOR (рапамицин, GTM-1) усиливали экспрессию *LC3-II* и снижали уровень агрегированной формы Aβ42 в гиппокампе мышей с моделью БА, улучшая пространственную память [163]. Активаторы

АМФК (метформин, ресвератрол) уменьшали концентрацию патологических форм Aβ и тау-белка [164, 165], а метформин показал профилактический эффект у пациентов с развивающейся деменцией [166]. При БП активация аутофагии способствует клиренсу α-синуклеина. Ибудиласт, косвенно ингибирующий mTOR, усиливает транскрипцию генов аутофагии и способствует элиминации агрегатов мутантных форм SOD1 и TDP-43, характерных для [163]. Однако прямое фармакологическое вмешательство в аутофагию имеет ограничения (риск чрезмерной активации и т.д.), поэтому альтернативой может быть шаперон-опосредованная селективная аутофагия (CASA) с участием Hsp70.

1.5.2 Шапероны как потенциальные терапевтические агенты

Ключевой характеристикой протеинопатических НДЗ является агрегация неправильно свёрнутых белков. При прогрессии БА, БП, БАС и других заболеваний наблюдаются деструктивные изменения, связанные с нарушением фолдинга белков. В связи с этим молекулярные шапероны, обеспечивающие поддержание нативной конформации белков, рассматриваются как важнейший механизм первичной клеточной защиты при НДЗ [167, 168]. Молекулярные шапероны представляют собой высококонсервативные белки, присутствующие во всех живых организмах и выполняющие широкий спектр функций, включая регуляцию белкового гомеостаза, клеточную сигнализацию и транслокацию белков внутри клетки. Белки теплового шока могут воздействовать на белки-мишени как на стадии начального фолдинга, так и на протяжении всего их жизненного цикла, модулируя функциональную активность и стабильность [167–169]. При этом шапероны обычно не несут структурной информации о «правильной» структуре белка, а преимущественно предотвращают энергетически неблагоприятные межмолекулярные взаимодействия, способствуя корректному сворачиванию белков и препятствуя их агрегации. Таким образом, при приобретении белками патологической конформации, характерной для НДЗ, ключевая роль HSP заключается в распознавании таких белков и обеспечении их рефолдинга или направления в деградационные пути [169].

Классификация HSP основана прежде всего на их молекулярной массе и включает следующие семейства: Hsp110, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 и малые HSP (sHSP) [167, 170]. Кроме того, HSP подразделяются на функциональные классы – холдазы, фолдазы и дезагреганты, в зависимости от характера взаимодействия с белками-мишенями [171]. Холдазы представляют собой АТФ-независимые белки, основная функция которых заключается в распознавании и стабилизации частично собранных белков. HSP способны идентифицировать открытые гидрофобные участки в таких белках и предотвращать неспецифические межмолекулярные взаимодействия, обеспечивая защиту от стресс-индуцированной агрегации и опосредуя последующее взаимодействие с фолдазами [169]. Большинство белков теплового шока обладают смешанной функциональной активностью, включая холдазную, тогда как малые HSP являются

единственным семейством, реализующим исключительно холдазную функцию [172]. Например, белки семейств sHSP: Hspb1 и Hspb5 способны связываться с Aβ и α-синуклеином, подавляя образование фибрилл и снижая их цитотоксичность *in vitro* [173]. Показано также, что Hspb1 и Hspa8 препятствуют образованию токсичных агрегатов тау-белка при БА [174], а также Hspb1 способен взаимодействовать с белком FUS [109], патологическая агрегация которого наблюдается при БАС.

Другим функциональным классом HSP являются АТФ-зависимые фолдазы, которые непосредственно участвуют в процессе сворачивания белков. АТФ-зависимая фолдазная активность, характерная для семейств Hsp60, Hsp70 и Hsp90, обеспечивает рефолдинг неправильно свёрнутых белков и восстановление их нативной конформации [171]. Например, индуцированная экспрессия *Hspa11* (семейство Hsp70) у мышей с мутациями в *APP/PSEN1* при БА снижала уровень провоспалительных цитокинов [175]. Трансгенная сверхэкспрессия *HSPA1* и *HSPB1* в мышиных моделях БА уменьшала образование сенильных бляшек и положительно влияла на когнитивные функции [176]. Кроме того, Hsp60 подавлял агрегацию гентингтина, предположительно путём изменения его конформации и направления к протеасоме в модели *in vitro* [177]. Показано также, что Hsp70 повышается в нейронах префронтальной коры пациентов с БАС, а его сверхэкспрессия у дрозофилы оказывала нейропротекторное действие против нейротоксичности, вызванной TDP-43 [34]. Шаперонная сеть семейства Hsp70 проявляет нейропротекторный потенциал, снижая уровень нерастворимого TDP-43 в цитоплазме и способствуя его ядерной локализации в клетках человека [178]. С другой стороны, ингибирование экспрессии *HSPC1* (семейство Hsp90) усугубляло симптомы нейродегенеративных заболеваний и стимулировало агрегацию специфических белков [173], а нокдаун гена *HSPA1A* повышал уровень накопления TDP-43 в нейрональных клетках из-за снижения его клиренса [171].

Активность шаперонов-дезагрегантов направлена на диссоциацию белковых агрегатов, что определяет их потенциальную терапевтическую ценность при протеинопатиях. Среди всех семейств белков теплового шока Hsp70 и Hsp90 привлекают особый интерес поскольку обеспечивают рефолдинг белков-мишеней и действуют как дезагреганты, способствуя распаду мутантных белковых комплексов [179]. В частности, Hsp90 регулирует взаимодействие между тау-белком и микротрубочками, опосредует транспорт повреждённого MAPT для протеасомной деградации, а также взаимодействует с тау-фибриллами, изменяя конформацию мутантных форм белка и предотвращая его патологические структурные изменения [171]. При этом взаимодействие Hsp90 с мутантными формами α-синуклеина также приводит к изменению их конформации и обеспечивает распознавание, что подчёркивает важную роль Hsp90 при различных НДЗ [180, 181]. Совместное действие Hsp90 с никотинамидмононуклеотид-

аденилилтрансферазой 2 (NMNAT2) опосредует повторный фолдинг повреждённых белков, участвующих в образовании токсичных агрегатов [182]. Hsp70 также способен распознавать и связывать гидрофобные области тау-белка и α-синуклеина, которые в нативной конформации экранированы, причём прямое взаимодействие Hsp70 с этими белками может свидетельствовать о развитии патологического протеинопатического процесса. Отмечено также, что при прогрессии БП Hsp70 колокализуется с α-синуклеином, и предполагается, что в таких условиях этот шаперон может способствовать дезагрегации фибриллярных структур [171].

Фармакологическая модуляция HSP позволяет усиливать нейропротекторные функции молекулярных шаперонов. В частности, аримокломол, предположительно стимулирующий продукцию HSP, обеспечивает связывание Hsp70 с тау-белком и SOD1, а также направляет эти белки к протеасомам или аутофагосомам. В результате концентрация их свободных форм в цитоплазме снижается, что препятствует образованию нейрофибриллярных клубков при БА и белковых агрегатов при БАС соответственно. Одновременно малая молекула YM-1 модулирует активность Hsp70 и Hsp27, участвующих в стабилизации α-синуклеина, что снижает нейротоксичность мутантного белка [168, 183].

Выявляют широкий спектр протеостатических механизмов, благодаря которым HSP реализуют нейропротекторные свойства и воздействуют на высокоагрегируемые патологические изоформы белков, характерные для НДЗ [173]. Хотя в настоящее время не существует одобренной болезнь-модифицирующей терапии на основе белков теплового шока, активно исследуется возможность применения HSP-вакцин для индукции эндогенных защитных реакций организма [184]. Наблюдаемые эффекты молекулярных «сопровождающих» подчёркивают высокий потенциал шаперон-ориентированной терапии как перспективного направления для коррекции патологических процессов при нейродегенеративных заболеваниях. Особое внимание в разработке терапевтических стратегий НДЗ, основанных на шаперон-опосредованных механизмах, уделяется семейству белков теплового шока с молекулярной массой 70 кДа как потенциальным антиагрегационным агентам.

1.5.3 Молекулярные механизмы нейропротекторного действия Hsp70

Многофункциональность Hsp70 в защите нейронов при БАС проявляется через три взаимосвязанных механизма, которые образуют многоуровневую систему защиты:

1. предотвращение первичной агрегации белков;
2. дезагрегация уже сформировавшихся олигомеров;
3. направление необратимо повреждённых белков на деградацию.

На первом уровне Hsp70 действует как «предохранитель», предотвращая инициацию агрегации. Второй – когда агрегаты уже образовались, Hsp70 пытается их разобрать с помощью механизма энтропийного вытягивания. Третий уровень обеспечивает утилизацию белков, не

поддающихся рефолдингу, через интеграцию с системами деградации. Hsp70 тесно связан с системами деградации белков (убиквитин-протеосомной и аутофагией), выступая в роли своеобразной железнодорожной стрелки, которая направляет повреждённые белки на утилизацию через системы деградации. Общая схема роли Hsp70 в поддержании протеостаза представлена на рисунке 3.

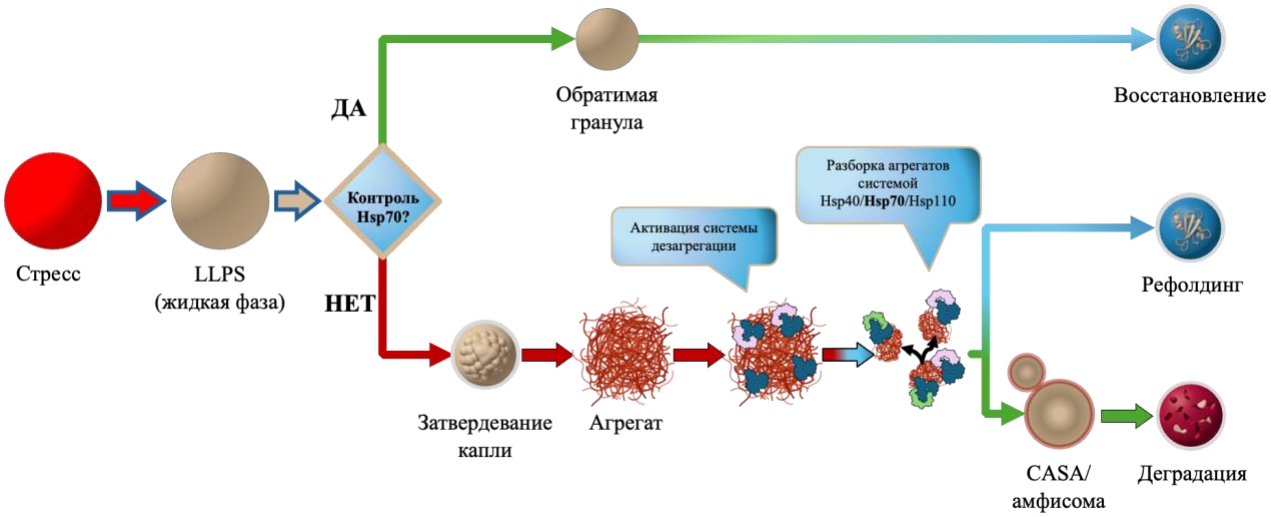


Рисунок 3 – Роль Hsp70 в поддержании протеостаза. Эффективность системы зависит от баланса всех компонентов: от ранней профилактики в жидких каплях до физической разборки аморфных агрегатов/фибрилл и клиренса. LLPS (Liquid-Liquid Phase Separation) – разделение жидких фаз, CASA (Chaperone-Assisted Selective Autophagy) – шаперон-зависимая избирательная аутофагия

Предотвращение первичной агрегации

Наиболее действенным и подтверждённым механизмом нейропротекции со стороны Hsp70 считается его вмешательство в самую начальную точку процесса – предотвращение первичной агрегации белков FUS и TDP-43. По сути, Hsp70 действует как молекулярный «буфер», поддерживая динамическое равновесие между обратимыми функциональными конденсатами и необратимыми цитотоксичными агрегатами. Данный механизм реализуется как через АТР-независимую «холдазную» активность, так и посредством АТР-зависимого процесса, при котором Hsp70 устраняет стабильные агрегаты путём преобразования их в нестабильные, развёрнутые мономерные структуры [185]. Накопленные данные свидетельствуют, что Hsp70 действует как модулятор фазового перехода РНК-связывающих белков [36, 186]. Эти белки в норме участвуют в сборке стресс-гранул – транзиентных жидкостноподобных конденсатов, служащих внутриклеточными хранилищами мРНК и белков в ответ на стресс. Патогенные мутации при БАС, способны запускать неконтролируемый переход подобных жидкостных структур в твёрдое гелеобразное состояние, что в конечном итоге приводит к формированию нерастворимых включений – агрегатов, содержащих патологические белки FUS и TDP-43 [36, 187, 188]. При стрессе шаперон Hsp70 рекрутируется в ядерные тельца, образованные белком

TDP-43 в процессе жидкость-жидкого фазового разделения (LLPS) [189, 190]. Hsp70 связывается с консервативным регионом в домене низкой сложности (LCD-домен) TDP-43 [191]. В норме эти жидкоподобные капли являются динамичными и выполняют защитную функцию, однако при патологии TDP-43 может претерпевать необратимый переход из жидкой фазы в твёрдые амилоидные агрегаты [192]. Hsp70, встраиваясь в капли, выступает в роли «хранителя динамики»: он поддерживает высокую подвижность молекул внутри конденсата и предотвращает преждевременное старение и фибрилляцию LCD-домена [190, 193, 194]. Было показано, что истощение Hsp70 (например, при длительном окислительном стрессе или в результате патогенных мутаций) не нарушает сборку телец, но критически снижает их динамичность, делая клетки более уязвимыми к цитотоксичности TDP-43. При этом, хотя АТФ и ослабляет прямое взаимодействие шаперона с TDP-43, способность Hsp70 подавлять агрегацию сохраняется, что указывает на сложный, но энергетически не строго зависимый механизм контроля качества. Повышение экспрессии белка Hsp70, напротив, снижает уровень патологической гиперфосфорилированной формы TDP-43, демонстрируя дозозависимый защитный эффект [186].

Особым примером шаперон-опосредованной регуляции TDP-43 служат анизосомы, ядерные конденсаты с уникальной архитектурой, в которых оболочка образована молекулами TDP-43, а ядро Hsp70 [190]. Формирование анизосом зависит от АТФ и функциональной активности Hsp70: ингибирование Hsp70 или снижение уровня АТФ вызывает разрушение анизосом и последующее образование патологических агрегатов TDP-43 [189, 190]. Эта функция Hsp70 критически важна, поскольку аномальная цитоплазматическая локализация TDP-43 и его захват в агрегаты лишает ядро этого белка, что в свою очередь ведёт к нарушению сплайсинга РНК, что само по себе является независимым патогенным механизмом [78]. В цитоплазме Hsp70 предотвращает агрегацию как полноразмерного белка TDP-43, так и его патологического фрагмента размером 25 кДа (TDP-25). Согласно данным *in vitro*, Hsp70 колокализуется с TDP-25, препятствуя образованию видимых агрегатов, однако не снижает количество уже сформированных нерастворимых структур, что указывает на его превентивную, а не дезагрегационную функцию в отношении TDP-25. Этим объясняется парадокс, при котором экзогенная экспрессия белка Hsp70 уменьшает долю клеток с видимыми включениями, но не влияет на общую концентрацию нерастворимой фракции TDP-43 [78, 195].

Структурные различия во взаимодействии Hsp70 с TDP-43 и FUS объясняется различиями в их доменной организации и механизмах агрегации. TDP-43 содержит альфа-спиральный регион внутри LCD-домена, который является основной точкой связывания для Hsp70. В отличие от этого, у белка FUS Hsp70 связывается с С-концевым доменом, обогащённым Q/N-мотивами, имеющими структурное сходство с прионовыми доменами [196]. Эта особенность может

свидетельствовать об эволюционной адаптации Hsp70 к распознаванию различных паттернов неправильного сворачивания белков. Важно подчеркнуть, что защитная функция Hsp70 наиболее эффективна на ранних стадиях заболевания, когда клеточные системы ответа на стресс ещё сохраняют свою функциональность. На более поздних стадиях патологического процесса вследствие истощения энергетических ресурсов клетки и повреждения систем шаперонов сам Hsp70 может встраиваться в белковые агрегаты, становясь компонентом патологических включений и утрачивая свою шаперонную активность [33, 197–199].

Дезагрегационный потенциал Hsp70

Помимо предотвращения агрегации, Hsp70 способен к дезагрегировать уже сформировавшиеся белковые агрегаты. Хотя надо отметить, что практическая эффективность этого процесса в нейронах остаётся под большим вопросом. Предполагается, что для этого Hsp70 действует в составе многокомпонентного комплекса. В то же время, большинство экспериментальных данных указывают на существенные ограничения этого механизма, особенно в отношении зрелых агрегатов, характерных для НДЗ [200]. Теоретически механизм дезагрегации основан на принципе энтропийного вытягивания. В ходе этого процесса множественные молекулы шаперона, прикрепляясь к агрегату, создают эффект «расталкивания», вытягивая полипептидную цепь, как это представлено на рисунке 4.

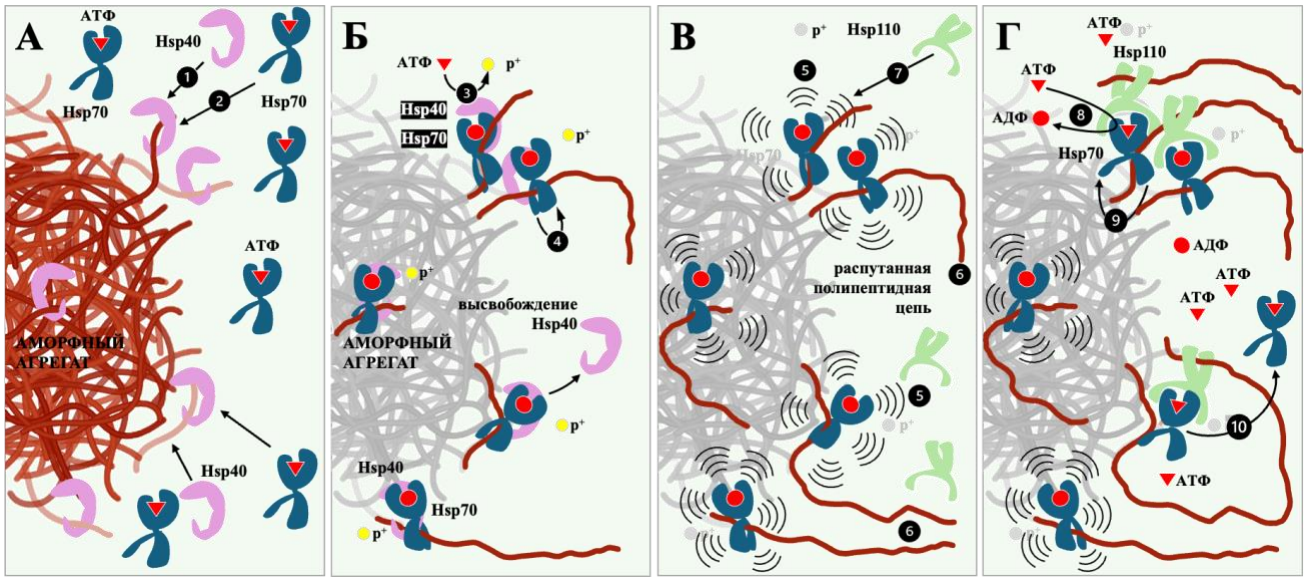


Рисунок 4 – Дезагрегация аморфного белкового агрегата системой Hsp70. **А. Привлечение и загрузка.** 1. Ко-шаперон Hsp40 (J-доменный белок) распознаёт и связывается с поверхностью агрегата. 2. Hsp40 доставляет к месту действия АТФ-связанную форму шаперона Hsp70. **Б. Захват и активация.** 3. Hsp40 стимулирует гидролиз АТФ до АДФ в нуклеотид-связывающем домене (NBD) Hsp70. 4. Вызывает закрытие субстрат-связывающего домена (SBD) Hsp70 и жёсткую фиксацию полипептидной цепи. **В. Энтропийное вытягивание.** 5. Конформационное напряжение в молекуле Hsp70 генерирует энтропийную силу. 6. Стремясь увеличить энтропию, Hsp70 совершает работу, вытягивая захваченную полипептидную цепь из тела агрегата. **Г. Перезарядка и высвобождение.** 7. Шаперон Hsp110 присоединяется к комплексу. 8. Hsp110 катализирует обмен АДФ на АТФ в NBD Hsp70.

9. Связывание АТФ открывает SBD, освобождая распрямлённую полипептидную цепь.
10. Hsp70, перезаряженная АТФ, готова к новому циклу разборки агрегата

Предполагается, что размещение множества молекул Hsp70 на поверхности агрегата создаёт силу, которая постепенно вытягивает полипептидную цепь из плотной структуры, растворяя её в цитозоле. Сила возникает из-за броуновского движения и стремления шаперона увеличить свою энтропию, отдалиться от поверхности агрегата. Для этого требуется кооперация действий трех типов белков: ко-шаперона Hsp40 (например, DNAJB1), который распознает и рекрутирует агрегат; самого Hsp70, который осуществляет механическое вытягивание; и фактора обмена нуклеотидами (NEF, от англ. Nucleotide Exchange Factors), например, Hsp110, который высвобождает Hsp70 от субстрата, освобождая его для следующего цикла работы [199–201]. Гидролиз АТФ не является прямым источником энергии для механизма «энтропийного вытягивания», но обеспечивает циклические конформационные изменения Hsp70, необходимые для многократного связывания и высвобождения субстрата. В совокупности с броуновским движением это вызывает энтропийную силу [202]. Схема универсального ATP-зависимого цикла связывания и высвобождения Hsp70 представлена на рисунке 5.

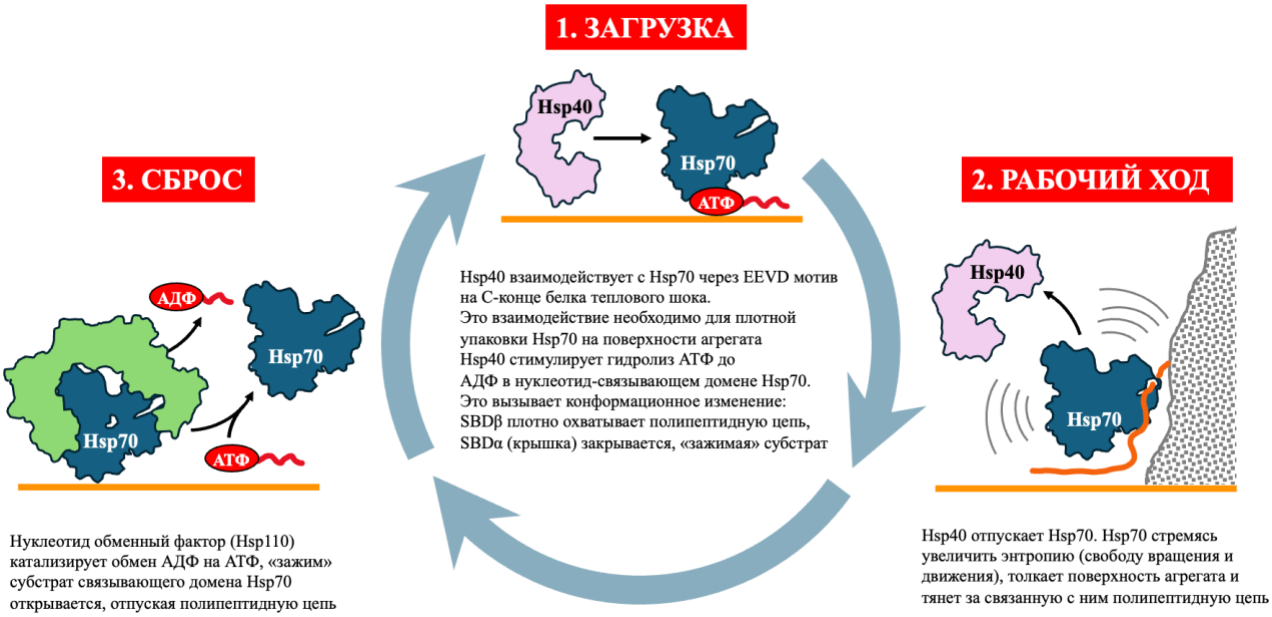


Рисунок 5 – Схема универсального ATP-зависимого цикла связывания и высвобождения Hsp70

Этот механизм получил прямое экспериментальное подтверждение. Было показано, что бактериальный Hsp70 (DnaK) в модельной системе генерирует силу, эквивалентную ~46 пН. В то же время, для эффективного разделения устойчивых фибриллярных структур, таких как амилоиды, данного механизма может быть недостаточно [203]. Согласно современным представлениям, ключевым этапом в разборке амилоидных фибрилл является не прямое вытягивание отдельных мономеров, а разделение связанных протофиламентов, когда шапероны,

прикреплённые к разным протофиламентам, своими броуновскими движениями создают эффективную расталкивающую силу между ними (~3 пН) [202, 204] (рисунок 6).

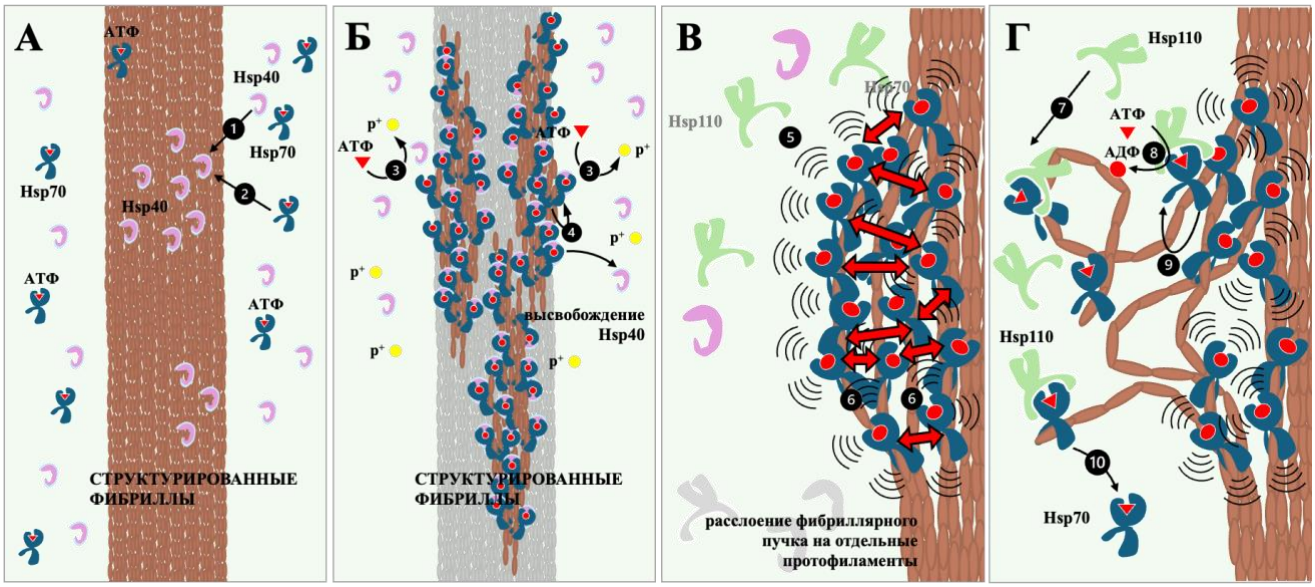


Рисунок 6 – Разборка структурированных фибрилл – Hsp70 расслаивает амилоидные волокна. **А. Нацеливание на фибриллу.** 1. Hsp40 распознаёт и связывается с поверхностью амилоидной фибриллы. 2. Hsp40 рекрутирует АТФ-связанную форму Hsp70 к месту связывания. **Б. Молекулярный захват.** 3. J-домен Hsp40 стимулирует гидролиз АТФ до АДФ в нуклеотид-связывающем домене Hsp70. 4. Это приводит к «закрытию» субстрат-связывающего кармана Hsp70 и жёсткой фиксации одного из протофибриллярных тяжей. **В. Механическое расслоение.** 5. Конформационное напряжение и броуновское движение доменов Hsp70 создают энтропийную силу. 6. Эта сила расслаивает фибриллярный пучок, разделяя его на отдельные протофиламенты. **Г. Завершение цикла.** 7. К комплексу присоединяется шаперон Hsp110. 8. Hsp110 ускоряет обмен АДФ на АТФ, перезаряжая Hsp70. 9. Связывание АТФ ослабляет захват, высвобождая отделённый протофилламент. 10. Система рекрутируется к новому сайту для продолжения деполимеризации фибриллы

При этом, согласно расчётам, именно латеральное разворачивание пучков протофиламентов, а не вытягивание из концов фибрилл, является наиболее эффективным механизмом энтропийного вытягивания, однако оно требует работы высокоэффективной шаперонной системы, способной преодолеть энергию связи между протофиламентами [202]. В моделях БАС этот механизм трудно реализовать на практике. Исследования на различных клеточных линиях показали, что сверхэкспрессия белка Hsp70 действительно снижает долю клеток с цитоплазматическими включениями, содержащими С-концевой фрагмент TDP-43 (TDP-25). Тем не менее, не было продемонстрировано полного растворения агрегатов. Более того, было показано, что уровень TDP-25 в нерастворимой фракции не изменялся, что косвенно может являться доказательством неспособности Hsp70 к дезагрегации уже сформированных и устойчивых агрегатов [195]. Проблема усугубляется тем, что многие патологические агрегаты при БАС являются чрезвычайно стабильными и устойчивыми к «разборке». Механизм «энтропийного вытягивания», вероятно, более эффективен для менее структурированных

агрегатов, которые могут быть чувствительны к действию шаперонов. Ещё одним из ограничивающих факторов может служить скорость АТФазного цикла самого Hsp70. Это ограничение может быть критичным для дезагрегации стабильных агрегатов, требующих множественных циклов работы шаперона [205]. В то же время другие исследования показывают, что Hsp70 необходим для дезагрегации стресс-гранул после прекращения стресса. Ингибирование Hsp70 приводило к задержке рассасывания стресс-гранул, особенно в нейронах с мутацией FUS P525L: аминокислотная замена пролина на лейцин. Эта мутация расположена в области ядерного сигнала локализации белка FUS и приводит к его накоплению в цитоплазме вместо ядра, поэтому такая активность Hsp70 подчёркивает его роль в поддержании динамичности жидкостных структур [82].

Успех деградации уже зрелых агрегатов, гипотетически, должен быть обусловлен не просто высоким уровнем Hsp70, но восстановлением или модуляцией всей шаперонной сети для обеспечения кооперативного действия всех её компонентов (Hsp40, NEF). Кроме того, на активность Hsp70 влияют посттрансляционные модификации. Например, деацетилирование Hsp70, усиливающееся при стрессе, повышает его рефолдинговую активность [206]. Фосфорилирование Hsp70 по Thr-636 усиливает связывание с адаптерным белком HOP (от англ. The Hsp70/Hsp90 Organising Protein), что может направлять субстрат на Hsp70-зависимый рефолдинг [207, 208]. Проведённый анализ данных позволяет заключить, что дезагрегационная активность Hsp70 в контексте БАС носит ограниченный характер. Таким образом, хотя теоретическая возможность дезагрегационной активности существует, практическая реализация этого механизма при БАС является маловероятной без дополнительных терапевтических вмешательств, направленных на усиление всей шаперонной сети и/или модуляцию функции самого Hsp70. Более того, эффективность такого терапевтического вмешательства, возможно будет зависеть от стадии протеинопатии и может быть наиболее эффективна при вмешательстве на ранних стадиях, до формирования устойчивых агрегатов [209]. Если дезагрегация оказывается невозможной, вступает в силу третий механизм: направление необратимо повреждённых белков на деградацию.

Направляющая функция Hsp70, связь с системами деградации

Помимо предотвращения агрегации на ранней стадии и потенциальной дезагрегации, третьим ключевым механизмом нейропротекторной роли Hsp70 является его интеграция в клеточные пути деградации белков, в частности, в убиквитин-протеасомную систему и аутофагию. Эти системы обеспечивают удаление неправильно свёрнутых, повреждённых или избыточных белков, и их корректная, своевременная работа критически важна для поддержания протеостаза в долгоживущих клетках, например таких как двигательные нейроны. Процесс сортировки и утилизации белковых субстратов шапероном Hsp70 представлен на рисунке 7.

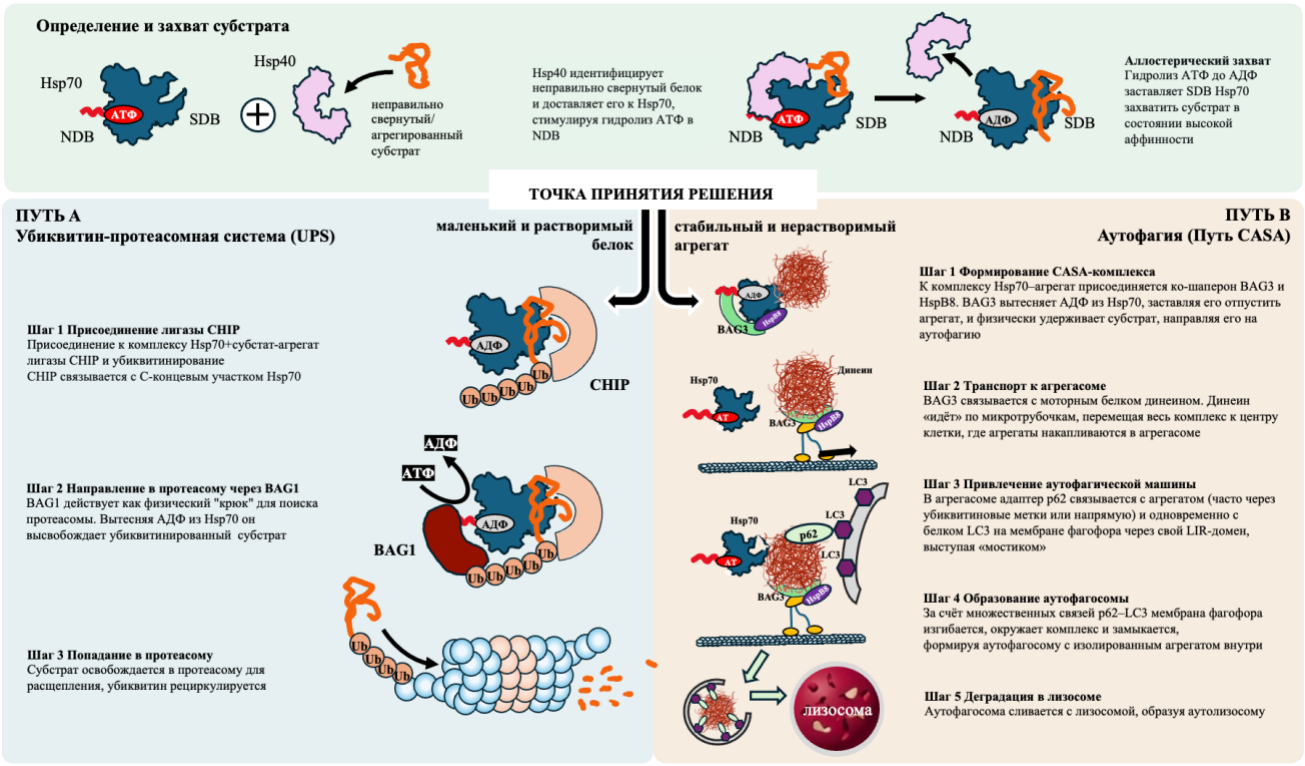


Рисунок 7 – Процесс сортировки и утилизации белковых субстратов шапероном Hsp70

Hsp70 участвует в контроле и выборе различных путей деградации. Центральным элементом этого контроля служат адаптерные белки, которые взаимодействуют с Hsp70 и определяют судьбу субстрата. Ключевые адаптеры, BAG3 (BCL-2-associated athanogene 3) и CHIP (Carboxy terminus of Hsc70-interacting Protein), образуют своего рода «молекулярный переключатель», который направляет Hsp70-зависимые субстраты либо на путь деградации, либо на путь рефолдинга. E3-лигаза CHIP взаимодействует с комплексом Hsp70-субстрат в тех случаях, когда рефолдинг невозможен. CHIP убиквитинирует субстрат, что служит сигналом для его деградации. В зависимости от типа убиквитиновой цепи и размера агрегата белок может направляться в протеасому (K48-убиквитинирование) или, что чаще происходит для крупных агрегатов, в аутофагосомы (K63-убиквитинирование) [210]. BAG3, напротив, преимущественно инициирует шаперон-зависимую селективную аутофагию (CASA, Chaperone-Assisted Selective Autophagy). Связываясь одновременно с Hsp70 и динеином, BAG3 обеспечивает транспорт агрегированных белков (например, мутантного SOD1) к агрессомам – специализированным структурам, где они упаковываются в везикулы для последующей деградации в лизосомах [210]. Этот путь деградации особенно важен в контексте БАС. Исследования показывают, что путь BAG3-опосредованной аутофагии активируется на поздних стадиях болезни, возможно, как компенсаторная реакция на накопление токсичных белков в клетке [196, 211–213].

Hsp70 также взаимодействует и с другими белками протеостаза. Например, белок UBQLN2 (ubiquilin-2), мутации в котором связаны с БАС, способствует связыванию Hsp70 с агрегатами poly-GA (образуются в результате мутации в области *C9orf72*), что в дальнейшем

позволяет клетке обеспечить их протеасомальную деградацию [214]. В результате Hsp70 функционирует в составе сложных молекулярных комплексов, каждый компонент которых играет в процессе свою уникальную специфическую роль. Пути деградации в клетке находятся в динамическом балансе и не всегда работают параллельно друг другу. Клетка выбирает наиболее подходящий путь в зависимости от типа повреждения и текущего состояния. Например, на ранних стадиях клеточный стресс может быть преодолён путём рефолдинга белков с помощью Hsp70 и Hsp40. Если же повреждение слишком велико или белок сильно агрегирован, система переключается на путь деградации через BAG3 и аутофагию. Этот переключатель между BAG1 (рефолдинг) и BAG3 (деградация) становится особенно значимым на поздних стадиях болезни и старения [213]. Нарушение этих систем деградации является одной из причин накопления патологических белков при БАС. Мутации в генах, кодирующих компоненты ALP (Autophagy-Lysosomal Pathway) и UPS, такие как UBQLN2, p62/SQSTM1, TBK1 и OPTN, приводят к нарушению деградации агрегированных TDP-43 и FUS [215].

Эффективность Hsp70 зависит от сети взаимодействий

Механизмы нейропротекторного действия Hsp70 тесно связаны с его взаимодействием с другими компонентами шаперонной системы. Ко-шапероны Hsp40 и нуклеотид-обменные факторы (NEFs) играют ключевую роль в координации работы Hsp70, который функционирует как центральный координирующий узел молекулярной шаперонной сети, тесно взаимодействуя с другими шаперонами, такими как Hsp60, Hsp90 и Hsp100 [216]. Ключевым уровнем регуляции этой сети служат посттрансляционные модификации, в частности фосфорилирование J-доменов ко-шаперонов семейства DNAJA. Например, фосфорилирование консервативного остатка серина (S51) нарушает электростатические взаимодействия, необходимые для стабильного связывания с Hsc70, что может избирательно подавлять дезагрегационную и рефолдинговую активность системы, демонстрируя её высокую способность к тонкой настройке [217]. Ко-шапероны Hsp40 (у млекопитающих представлены семейством J-белков, таких как DNAJB1) являются «детекторами» неправильно свёрнутых белков. Их основная функция – распознавать и рекрутировать субстраты для Hsp70. Hsp40 содержит так называемый J-домен, который активирует АТФазную активность Hsp70. Эта активация запускает цикл связывания и высвобождения субстрата [199, 200]. Различные Hsp40 распознают специфические последовательности аминокислотных последовательностей, что позволяет Hsp70 отличать различные типы стрессовых повреждений. Например, показано, что ко-шаперон DNAJB2a способствует рефолдингу TDP-43, а не деградации [33]. Другой ко-шаперон, DNAJB6, подавляет агрегацию TDP-43 при тепловом шоке. В то же время, ко-шаперон DNAJB1 вместе с Hsp70 участвует в уменьшении токсичности агрегатов TDP-43 [74]. Взаимодействие с Hsp40

необходимо для дезагрегации и диссоциации стресс-гранул, и его ингибирование приводит к задержке их персистенции [82].

Другой важной группой партнеров Hsp70 являются нуклеотид-обменные факторы (NEF), например, такие как Hsp110. Связывание шапероном субстрата в результате гидролиза АТФ обеспечивают прочную связь Hsp70-субстрат. NEF способствует высвобождению АДФ и связыванию АТФ, что приводит к ослаблению связи Hsp70 с субстратом и его высвобождению. Этот цикл необходим для многократного использования Hsp70. В комплексе с Hsp40 и Hsp70, NEF (Hsp110) играет важную роль в дезагрегации агрегатов FUS и TDP-43 [196, 199, 200]. Hsp70 взаимодействует и с более крупными белковыми комплексами, такими как агресомы. Агресомы – это особые клеточные структуры, предназначенные для сбора и деградации аберрантных и агрегированных белков. В процессе сбора основную роль играет адаптерный белок BAG3, который связывает Hsp70 с другими компонентами агресомы, такими как рецептор p62/SQSTM1 и белок динеин, обеспечивая транспорт агрегатов по пути аутофагии. Hsp70 выступает в роли молекулярного «грузчика», который собирает повреждённые белки и передаёт их на хранение и утилизацию [211, 213]. Наконец, следует упомянуть о важной роли Hsp70 в контексте агрегации, связанной с мутацией в области *C9orf72*, которая является самой частой причиной семейного БАС. Мутации в *C9orf72* приводят к образованию токсичных, коротких агрегатов, известных как DPR (дипептидные повторы), в частности poly-Gly-Ala (poly-GA). В контексте патогенеза БАС и ЛВД роль Hsp70 проявляется в нескольких ключевых механизмах. При одной из форм патологии, связанной с образованием агрегатов poly-GA из-за мутации в *C9orf72*, белок UBQLN2 выступает в роли молекулярного адаптера, который обеспечивает эффективное связывание Hsp70 с патологическим белком poly-GA, способствуя его клиренсу [199, 214]. Таким образом, Hsp70 не функционирует как автономный защитный элемент, а является ключевым компонентом гибкой сети поддержания протеостаза, которая в зависимости от контекста и типа патологического белка может задействовать принципиально разные механизмы – от направленной деградации до рефолдинга.

1.5.4 Терапевтические стратегии с использованием системы Hsp70

Несмотря на доказанный нейропротекторный потенциал Hsp70, его терапевтическое применение в настоящее время сопряжено с серьёзными трудностями [199]. Согласно литературным данным, существует два основных подхода использования Hsp70 как терапевтического агента:

1. Фармакологическое индуцирование эндогенного синтеза нативного белка путём сверхэкспрессии трансгена;

2. Прямое экзогенное введение рекомбинантного белка.

Оба подхода демонстрируют нейропротекторный эффект, однако имеют свои особенности, преимущества и в том числе недостатки.

Учитывая эти ограничения, становится очевидной фундаментальная проблема – необходимость целенаправленной доставки терапевтических агентов в клетку. Для полной реализации терапевтического потенциала Hsp70 необходимо обеспечить стабильную, длительную и высокоспецифичную экспрессию его функциональной формы непосредственно в цитоплазме поражённых двигательных нейронов, минуя системные эффекты [218]. Это делает классические фармакологические подходы малопригодными [35, 219]. Поэтому перспективным направлением является разработка генотерапевтических средств на основе вирусных векторов. Использование аденоассоциированных вирусов позволяет решить большинство озвученных вызовов:

1. Преодолеть ГЭБ, например, при интратекальном введении, или использовании тканеспецифичных промоторов;

2. Обеспечить высокоспецифичную трансдукцию целевых нейронов путём подбора серотипа капсида, добиться длительной и контролируемой экспрессии за счёт применения клеточно-специфичных промоторов и, как следствие, минимизировать риски системной иммунной активации [220, 221].

Таким образом, задача разработки и оптимизации эффективных и безопасных средств таргетной доставки гена Hsp70, в частности на основе AAV, является не второстепенной, а краеугольной для всей области болезнь-модифицирующей терапии нейродегенеративных расстройств.

Традиционные подходы демонстрируют фундаментальные ограничения, объясняющие их низкую клиническую эффективность. Первый подход, основанный на индукции собственного Hsp70, использует соединения, называемые индукторами теплового шока, которые стимулируют активность транскрипционного фактора HSF1 (HSF1 activators) и, как следствие, увеличивают экспрессию индуцибельных генов *HSP*, включая *HSPA1A* [220]. В ранних доклинических исследованиях на мышиных моделях БАС (SOD1-G93A) аримокломол продемонстрировал умеренное увеличение продолжительности жизни, однако эти результаты не подтвердились в последующих работах, а его влияние на агрегацию TDP-43 и FUS остаётся недоказанным [222–225]. Более поздние исследования на клеточных моделях TDP-43 и FUS-протеинопатий не продемонстрировали значимого усиления экспрессии *HSPA1A* аримокломолом, что может быть косвенным свидетельством отсутствия его эффективности в клинических исследованиях [168]. В 2020 году аримокломол получил от FDA статус Fast Track Designation, ускоряющий разработку препаратов для тяжёлых заболеваний [226]. Однако в последующем многоцентровом рандомизированном плацебо-контролируемом исследовании он не продемонстрировал

эффективности при БАС [227]. В моделях *Drosophila*, сверхэкспрессия гомолога *Hsc70-4* уменьшала двигательные дефекты, вызванные мутантным TDP-43 [228, 229]. Важно отметить, что в некоторых случаях генетическая сверхэкспрессия белка Hsp70 (например, в 10 раз выше нормы) не давала эффекта, в то время как фармакологическая модуляция была успешной [197].

Второй подход – экзогенное применение рекомбинантного человеческого Hsp70 (rHsp70) также показал многообещающие результаты [230, 231]. Исследования на мышиной модели БАС с мутацией G93A в SOD1 показали, что внутримышечное или внутрибрюшинное введение рекомбинантного Hsp70 значительно увеличивает продолжительность жизни, задерживает начало симптомов и сохраняет моторную функцию, причём rHsp70 практически не проникал в ЦНС (спинной и головной мозг), а локализовался преимущественно в скелетной мускулатуре [232]. Дополнительные данные, полученные на моделях болезни Паркинсона, подтверждают, что экзогенный рекомбинантный Hsp70 способен проникать в нейроны и астроциты, накапливаться в митохондриях и лизосомах и защищать клетки от гибели, ещё раз подчёркивают его терапевтический потенциал как шаперона, способного проникать внутрь клетки [233].

Несмотря на обнадёживающие результаты в доклинических моделях, оба подхода имеют ограничения. Введение рекомбинантного Hsp70 может сопровождаться иммунными реакциями, связанными не столько с чужеродностью белка (при использовании человеческой последовательности), сколько с его внеклеточной сигнальной функцией, способной активировать TLR-рецепторы и провоспалительные пути [234, 235]. В дополнение к этому, например, процесс энтропийного вытягивания требует формирования плотных кластеров шаперонов на поверхности фибриллы. В функционирующих *in vivo* системах наблюдаются именно такие плотные кластеры, и АТФ-гидролиз нужен не для генерации «силы тяги», а для поддержания этого активного кластера. Это может объяснять, почему простого повышения уровня Hsp70 может быть недостаточно для дезагрегации – система должна быть способна сформировать стабильный, высокоэффективный кластер, а низкая плотность связывания Hsp70 или малый размер кластера делают этот процесс неэффективным, что в свою очередь может объяснять его неспособность справляться со зрелыми, стабильными агрегатами. Фармакологическая индукция, в свою очередь, может быть неэффективной, если клеточный ответ на стресс уже нарушен или истощён, что часто наблюдается на поздних стадиях нейродегенерации [199, 236]. Некоторые исследования показывают, что экзогенный Hsp70, секреция которого не контролируется, может оказывать усугубляющее повреждения действие, что подчёркивает важность целевой доставки в поражённые патологией ткани [237–239].

Несмотря на эти ограничения, Hsp70 остаётся перспективной мишенью, что требует разработки новых стратегий доставки и модуляции его активности. Хотя нейропротекторная роль Hsp70 хорошо описана, литературные данные содержат и противоречия, которые

необходимо учитывать для полного понимания его потенциала в качестве терапевтической мишени при БАС. Эти аспекты указывают на то, что механизм действия Hsp70 гораздо сложнее, чем может показаться на первый взгляд, и его эффективность сильно зависит от конкретных условий, включая тип мутации, стадию заболевания и общее состояние клеточного ответа на стресс. С возрастом снижается базовый уровень шаперонов, включая Hsp70, что само по себе является фактором риска нейродегенерации [240]. Однако на поздних стадиях болезни, когда клеточный ответ на стресс уже истощён, Hsp70 может быть встроен в патологические агрегаты, образуя инертные, нефункциональные комплексы, которые нарушают протеостаз вместо того, чтобы его поддерживать [241]. Это объясняет, почему терапевтические вмешательства, направленные на повышение уровня Hsp70, могут быть эффективны на ранних стадиях, но бесполезны или даже вредны на поздних. Описанная контекст-зависимость эффектов Hsp70 позволяет определить «терапевтическое окно» для Hsp70-ориентированных вмешательств при БАС, ограниченное ранними стадиями заболевания до истощения шаперонной системы [33, 241] и формирования необратимых агрегатов [209, 232]. Хотя Hsp70 может взаимодействовать с широким спектром патологических белков, его эффективность может зависеть от конкретной аминокислотной замены в белке «клиенте». Например, мутации, вызывающие сильную цитоплазматическую мислокализацию FUS, активируют ответ на тепловой шок, в то время как мутации с умеренной – нет. Это говорит о том, что не все мутации приводят к «одинаковому уровню стресса» и, соответственно, к одинаковой потребности в шаперонной активности [82].

Все перечисленные ограничения подчёркивают, что анализ современных данных позволяет рассматривать Hsp70 как мощную и многофункциональную молекулу с огромным, но не безграничным терапевтическим потенциалом в лечении БАС. Его эффективность обусловлена способностью воздействовать на ключевые звенья патогенеза: подавлять первичную агрегацию и секвестрацию FUS, модулировать динамику стресс-гранул, интегрироваться в системы протеасомной и аутофагасомной деградации, а также оказывать опосредованное противовоспалительное и нейротрофическое действие. Однако применение стратегий, направленных на усиление функции Hsp70, сопряжено со значительными сложностями и требует крайне тщательного продумывания. Таким образом, эффекты Hsp70 сильно зависят от контекста. Его нейропротекторная функция может нивелироваться на поздних стадиях заболевания при общем истощении протеостаза, а внеклеточная форма белка способна инициировать нежелательный провоспалительный ответ. Это означает, что успех терапии будет критически зависеть от учёта множества факторов: конкретного типа мутации FUS, стадии болезни, возраста пациента и исходного состояния клеточных систем контроля качества белков. Перспективные стратегии, следовательно, будут направлены не на простое глобальное повышение уровня Hsp70, а на его прецизионную модуляцию – обеспечение правильной локализации, времени и уровня

экспрессии в сочетании с ко-терапией, поддерживающей функцию всей шаперонной сети и систем деградации. Наконец, существуют и теоретические противоречия. Как уже упоминалось, данные о способности Hsp70 проводить дезагрегацию противоречивы. Эти расхождения могут быть объяснены использованием разных моделей (разные типы агрегатов, условия стресса), но они подчёркивают, что механизм дезагрегации не является надёжной и универсальной функцией Hsp70 [195].

1.5.5 Вызовы и ограничения AAV-опосредованной генотерапии Hsp70 при БАС

Несмотря на теоретические преимущества AAV-опосредованной доставки гена Hsp70, данный подход сталкивается с рядом существенных вызовов, которые необходимо учитывать при разработке терапевтических стратегий.

Иммунный ответ на AAV-векторы

Несмотря на сравнительно низкую иммуногенность AAV-векторов [242], их применение для терапии заболеваний ЦНС сопряжено с рисками иммунного ответа. Даже при прямой инъекции в ЦНС наблюдаются капсид-специфические Т-клеточные ответы, глиоз, а также инфильтрация иммунных клеток в прилежащие к месту введения структуры. Клинические данные, в частности исследования БАС, подтверждают эту проблему: у пациентов отмечались специфические иммунные реакции на введение вектора AAVrh10 [243].

Дополнительным ограничением служит предсуществующий гуморальный иммунитет, который обнаруживается у многих пациентов вследствие перенесённых в прошлом инфекций [146]. Хотя прямое введение вектора в нервную ткань снижает значимость циркулирующих антител (благодаря барьерной функции ГЭБ) [243], это не устраняет фундаментальное препятствие – невозможность эффективного повторного введения препарата одного и того же вектора. Данное ограничение создаёт серьёзные трудности для разработки долгосрочных терапевтических стратегий, требующих более одной инъекции [146].

Ограничения трансдукции и тканевая специфичность

Ключевым ограничением интрапаренхиматозного метода является ограниченная локализация трансдукции. Векторы на основе аденоассоциированных вирусов (AAV-векторы) инфицируют клетки главным образом в непосредственной близости от места инъекции [146]. Для терапии БАС, при котором поражаются диффузно расположенные двигательные нейроны, это часто означает необходимость в нескольких инъекциях, что увеличивает инвазивность процедуры и потенциальную иммуногенность [244]. Разработка новых серотипов AAV, эффективнее преодолевающих ГЭБ, направлена на решение этой проблемы. Тем не менее, их высокая аффинность к периферическим тканям остаётся побочным эффектом, требующим коррекции [244–246].

Долговременная экспрессия и необходимость её контроля

AAV-векторы обеспечивают длительную (персистентную) экспрессию трансгена в неделящихся клетках, включая нейроны [146]. Однако постоянная сверхэкспрессия *Hsp70* сама по себе может оказывать негативное влияние на клеточный гомеостаз, нарушая тонкий баланс шаперонной сети и потенциально способствуя протеотоксичности [240]. Это обусловливает необходимость разработки систем контролируемой экспрессии (например, индуцибельных промоторов) или тщательного подбора дозы вектора для достижения терапевтического, но не токсического уровня белка. Таким образом, трансляция AAV-Hsp70 терапии в клинику потребует комплексного решения задач, связанных с иммунными реакциями, эффективностью доставки и точным контролем экспрессии. Было показано, что рекомбинантный человеческий Hsp70 не обладает иммуногенностью и токсичностью при введении лабораторным животным [247]. Это принципиально важный аргумент в пользу безопасности Hsp70 как терапевтического агента, однако он не отменяет необходимости решения задач, связанных с его адресной доставкой.

1.5.6 Выбор AAV-серотипа для доставки *HSPA1A*

Для реализации терапевтического потенциала Hsp70 при БАС необходима разработка эффективной и безопасной системы доставки гена *HSPA1A* преимущественно в двигательные нейроны. В настоящей работе для этих целей был выбран рекомбинантный аденоассоциированный вирус на основе инженерного серотипа AAV-PHP.eB.

Происхождение и свойства

AAV-PHP.eB получен на основе AAV9 с помощью направленного эволюционного скрининга. В отличие от большинства природных серотипов, PHP.eB содержит специфические аминокислотные вставки в капсидном белке, что обеспечивает ему уникальные свойства по отношению к клеткам-мишеням и позволяет значительно повысить эффективность доставки генетического материала в клетки мозга после системного введения [248].

Преодоление гематоэнцефалического барьера

Одним из главных преимуществ AAV-PHP.eB является его способность эффективно проходить через ГЭБ у мышей после внутривенного или ретроорбитального введения. Это достигается благодаря взаимодействию с рецептором LY6A на эндотелиальных клетках сосудов мозга у определённых линий мышей (например, C57BL/6J), что обеспечивает высокую степень проникновения вируса в паренхиму мозга [249, 250]. В результате наблюдается значительное увеличение эффективности трансдукции по сравнению с исходным AAV9 [251].

Трансдукция нейронов ЦНС и спинного мозга

AAV-PHP.eB демонстрирует высокую эффективность трансдукции различных типов клеток ЦНС – как нейронов, так и астроцитов – во всех отделах головного и спинного мозга. Это особенно важно для терапии бокового амиотрофического склероза (БАС), где требуется доставка

терапевтических генов к двигательным нейронам спинного мозга. Системное введение AAV-PHP.eB позволяет достичь широкой экспрессии целевого гена без необходимости инвазивных инъекций непосредственно в мозг или спинной мозг [248, 251, 252].

Обоснование выбора серотипа аденоассоциированного вируса

Выбор AAV-PHP.eB для настоящего исследования обусловлен его высокой нейротропностью, возможностью эффективной доставки генетического материала при системном (ретроорбитальном) введении, а также сниженной гепатотропностью по сравнению с другими вариантами. Кроме того, использование специфических промоторов позволяет дополнительно повысить селективность экспрессии в нужных популяциях клеток [248, 253, 254].

Ограничения использования AAV-PHP.eB

Следует учитывать, что эффективность проникновения через ГЭБ и трансдукции зависит от штамма животных из-за различий в плотности рецептора LY6A; у других видов млекопитающих (включая человека) эти свойства могут быть выражены слабее [249, 250]. Тем не менее, для лабораторных мышей, использованных в данной работе, AAV-PHP.eB является оптимальным инструментом доставки гена *HSPA1A* в ЦНС.

1.5.7 Заключение по литературному обзору

Проведённый анализ литературы позволяет сформулировать несколько ключевых положений, определяющих дизайн и обоснование экспериментальной работы. Боковой амиотрофический склероз относится к протеинопатиям, в основе которых лежит агрегация РНК-связывающих белков, в частности FUS и TDP-43. Несмотря на генетическую и клиническую гетерогенность БАС, нарушение протеостаза и накопление токсичных белковых агрегатов служат центральным звеном патогенеза, общим для большинства форм заболевания. Существующие терапевтические стратегии (рилузол, эдаравон, антисмысловые олигонуклеотиды) обладают ограниченной эффективностью и не воздействуют непосредственно на механизмы агрегации. Препараты, одобренные для лечения БАС, либо не являются болезнь-модифицирующими, либо применимы лишь к узким генетическим подгруппам пациентов (например, тоферсен для SOD1-мутаций). Таким образом, сохраняется острая потребность в разработке универсальных подходов, направленных на коррекцию протеостаза. Белок теплового шока Hsp70 представляет собой перспективный терапевтический агент, способный предотвращать первичную агрегацию FUS и TDP-43, поддерживать динамику стресс-гранул, а также направлять необратимо повреждённые белки в системы деградации (убиквитин-протеасомную и аутофагию). Многочисленные исследования *in vitro* и на животных моделях подтверждают нейропротекторный потенциал Hsp70, однако его эффективность при FUS-ассоциированной протеинопатии оставалась неизученной. Аденоассоциированные вирусные векторы, особенно серотип PHP.eB, обеспечивают эффективную и долговременную

доставку генов в центральную нервную систему после однократного системного введения. Это позволяет преодолеть гематоэнцефалический барьер и достичь терапевтической экспрессии шаперона непосредственно в двигательных нейронах, минуя инвазивные интрапаренхиматозные инъекции. Трансгенная линия мышей S-FUS(1-359) является адекватной и удобной моделью для проверки гипотезы о терапевтическом действии AAV-опосредованной экспрессии белка Hsp70. Животные демонстрируют быстро прогрессирующий БАС-подобный фенотип с чёткой симптоматической стадией и формированием агрегатов FUS, что позволяет оценить влияние терапии на выживаемость, двигательные функции и патоморфологические изменения в ограниченные сроки.

Цель настоящей диссертационной работы является оценка эффективности однократного системного введения рекомбинантного аденоассоциированного вируса, несущего ген белка Hsp70 на течение FUS-протеинопатии у модельных мышей S-FUS(1-359). Поскольку рассмотренные ограничения AAV-доставки, требование длительной экспрессии и необходимость проникновения через ГЭБ делают системный путь наиболее целесообразным, в исследовании использован серотип AAV-PHP.eB для доставки гена *HSPA1A* в референсной последовательности (кодирующей человеческий Hsp70).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Получение вирусного препарата

2.1.1 Наработка и очистка плазмидной конструкции

Плазмидная конструкция pAAV-CASI-mcs-WPRE представляет собой экспрессионную кассету с высокоэффективным в различных клетках и тканях человека CASI-промотором, состоящим из трёх частей: CMV-промотора, промотор β-актина курицы (Chicken β-actin) и UBC-промотора. Кассета имеет сайт множественного клонирования. Увеличение уровня экспрессии транскрибированной мРНК достигается за счёт присутствия в кассете посттранскрипционного регуляторного элемента вируса гепатита сурка (WPRE). К 3′-концу синтезированной мРНК добавляется хвост из аденинов за счёт сигнала полиаденилирования (poly(A) signal). Кассета фланкирована левым и правым инвертированными терминальными повторами аденоассоциированного вируса 2 серотипа (LAAV2-ITR, RAAV2-ITR), которые обеспечивают упаковку генетической конструкции в вирусный капсид (рисунок 8).

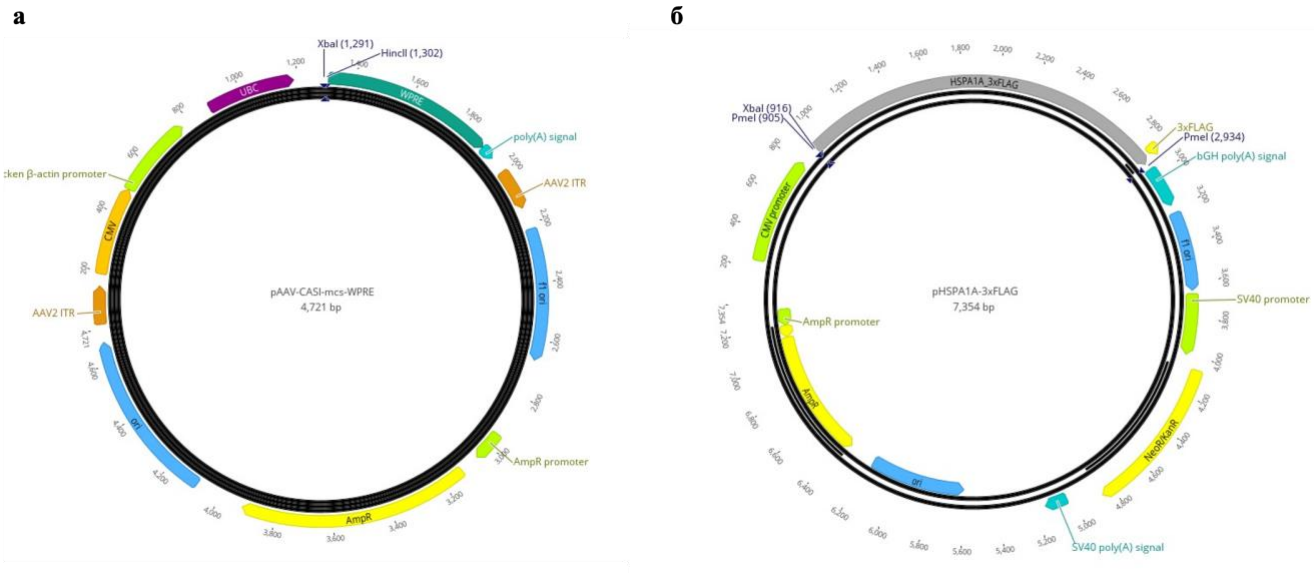


Рисунок 8 – Схематичные изображения плазмид pAAV-CASI-mcs-WPRE (акцептор гена – вектор) и pHSPA1A-3xFLAG (донор гена – трансген, с рестрикционными сайтами. **а. Плазмида pAAV-CASI-mcs-WPRE.** AmpR – ген устойчивости к ампициллину; Amp prom – промотор гена устойчивости к ампициллина; ori, f1 ori – бактериальные репликативно-компетентные участки; LAAV2-ITR, RAAV2-ITR – левый и правый инвертированные концевые повторы аденоассоциированного вируса человека 2-го серотипа; CMV – промотор цитомегаловируса человека; Chicken β-actin promoter – промотер β-актина курицы; UBC – убиквитиновый промотор человека; WPRE – посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка. **б. Плазмида pHSPA1A-3xFLAG.** AmpR – ген устойчивости к ампициллину; Amp prom – промотор гена ампициллина; NeoR – ген устойчивости к канамицину; ori, f1 ori – бактериальные репликативно-компетентные участки; CMV – промотор цитомегаловируса человека; HSPA1A – вставка целевого гена белка теплового шока Hsp70; 3xFLAG – метка FLAG-эпитопа; SV 40 poly(A) signal, Bgh poly(A) signal – сигналы полиаденилирования

К 3′-концу кодирующей последовательности гена *HSPA1A* (GenBank: BC002453.2), кодирующего белок теплового шока Hsp70 (UniProtKB: P0DMV8), была добавлена

последовательность, кодирующая тройную FLAG-метку 3×FLAG (DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK). В виду высокой гомологичности нативного мышиного Hsp70 и человеческого белка, введение FLAG-метки на С-конце белка Hsp70 позволяет детектировать экспрессию трансгена с помощью антител к FLAG-эпитопу. Нуклеотидная последовательность HSPA1A-3xFLAG была синтезирована компанией «Евроген».

Конструкцию pAAV-CASI-HSPA1A-3xFLAG-WPRE получали методом рестрикционного клонирования. Для получения фрагментов плазмиды pAAV-CASI-mcs-WPRE (акцептор гена – вектор представлен на рисунке 8а) и pHSPA1A-3xFLAG (донор гена – вставка представлена на рисунке 8б) обрабатывали рестриктазами, как указано в таблице 2.

Таблица 2 – Использованные в ходе работы рестриктазы и полученные фрагменты

	Вектор	Вставка
Рестриктаза 1	XbaI	XbaI
Рестриктаза 2	HincII	PmeI
Фрагменты	4710, 10	5325, 2018, 11

Фракционирование проводили методом горизонтального электрофореза в 1% агарозном геле при напряжённости электрического поля 8 В/см в течение 30 мин. В качестве флуоресцентного красителя использовали этидия бромид в концентрации 5 мкг/мл (hυ = 300 и 360 нм). Фрагменты размером 4710 п.н. (вектор) и 2018 п.н. (вставка) вырезали из геля скальпелем и очищали с помощью набора для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей Evrogen Cleanup Standard (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Очищенные фрагменты лигировали в молярном соотношении 1:3 с помощью Т4 ДНК-лигазы (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя.

Компетентные клетки *E. coli* DH5α получали, следуя методике получения компетентных клеток с помощью $CaCl_2$, описанной ранее [255]. Трансформацию компетентных клеток проводили методом теплового шока. Эффективность трансформации оценивали при помощи высева на культуральные чашки с агаризованной средой многократно разведенных образцов бактерий, трансформированных плазмидой pBluescript II SK(+). Эффективность рассчитывали по формуле: эффективность трансформации = (число колоний / количество ДНК / разведение).

Трансформированные клетки высевали на чашку с бактериологическим агаром, содержащим селективный антибиотик – ампициллин. Эффективность трансформации составляла 10^7–10^8 трансформированных клонов на 1 мкг плазмиды pBluescript II SK. Чашку с трансформантами инкубировали в течение ночи при 37°С в термостате. Выросшие колонии рассевали на чашку с бактериологическим агаром на индивидуальные сектора и снова инкубировали ночь при 37°С. Состав агара: 2YT бульон (Диаэм, Россия), 2 мг/мл

бактериологический агар (Диаэм, Россия), 50 мг/мл ампициллин (neoFroxx, Германия). Плазмидную ДНК с секторов выделяли с помощью набора для выделения плазмидной ДНК Plasmid Miniprep (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя.

С помощью программы Genious для анализа клонов подобрали специфическую эндонуклеазу рестрикции PstI и рассчитали теоретические массы фрагментов. ДНК обрабатывали эндодезоксирибонуклеазой рестрикции PstI в специфическом буфере согласно рекомендации фирмы-производителя. Реакцию проводили в объёме 20 мкл в течение 1 ч при 37°C. Результаты рестрикции детектировали с помощью горизонтального электрофореза в 0,8% агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл этидия бромида в качестве флуоресцентного красителя (hυ = 300 и 360 нм). Электрофорез проводили при комнатной температуре в трис-ацетатном буфере TAE (40 мМ трис-ацетат, pH 8,1; 2 мМ ЭДТА) при напряжённости электрического поля 12 В/см в течение 20 мин. Гели с разделёнными фрагментами фотографировали с использованием системы детектирования гелей Gel Doc EZ Imaging System (BioRad, США). Молекулярную массу фрагментов определяли с помощью маркера молекулярного веса ДНК 1 kb DNA ladder (Евроген, Россия).

Наработка плазмидной ДНК для продукции AAV

Наработку плазмидной ДНК для pAAV-CASI-HSPA1A-3xFLAG проводили по единому протоколу. Использовали штамм-продуцент *E. coli*, трансформированный соответствующей плазмидой. Культивирование проводили в среде 2xYT с добавлением амоксициклина (50 мг/мл). В 500 мл автоклавированной среды вносили 50 мкл бактериальной суспензии и инкубировали 19 ч при 37 °C и 210 об/мин. Бактериальный осадок отделяли центрифугированием при 10 000 *g* в течение 7 мин (высокоскоростная центрифуга EBA600).

Очистка плазмидной ДНК

Очистку плазмидной ДНК проводили методом щелочного лизиса с последующей хроматографией. Навеску бактериальной массы ресуспендировали в 10 мл/г ресуспендирующего буфера (50 мМ Трис-HCl pH 7,5, 10 мМ ЭДТА), затем добавляли лизирующий буфер (0,2 М NaOH, 1% SDS) в том же объёме и инкубировали при комнатной температуре. Нейтрализацию проводили преципитирующим буфером (3 М CH_3COOK, pH 5,5; 10 мл/г). Лизат центрифугировали 30 мин при 10 000 об/мин и 4°C.

Гель-фильтрация лизата

Осветлённый лизат очищали гель-фильтрацией на колонке HiPrep 26/10 Sepharose 6FF (Cytiva, Швеция) с использованием хроматографической системы Achrom Firin Plus 36T (Biotech (Suzhou Co., Ltd, Китай). Колонку уравновешивали буфером А (2,1 М $(NH_4)_2SO_4$, 100 мМ Трис-HCl pH 7,5, 10 мМ ЭДТА) при линейной скорости потока до 60 см/ч. Наносили не более 14,5 мл лизата. Целевую фракцию собирали при достижении оптической плотности

50 mAU. Сбор вели до тех пор, пока кривая оптической плотности, достигнув максимума и находясь на линии спада, не начинала расти вновь. После выхода целевой фракции колонну промывали буфером А до стабилизации проводимости и pH.

Очистка пДНК методом аффинной хроматографии

Аффинную очистку пДНК проводили на сорбенте Plasmid Select Xtra в колонке HiTrap 5 мл (набор Plasmid Select Starter Kit, Cytiva, Швеция) на той же хроматографической системе. Колонку уравновешивали буфером B (2 M $(NH_4)_2SO_4$, 100 мМ Трис-HCl pH 7,5, 10 мМ ЭДТА) при линейной скорости 120 см/ч. Объединённую целевую фракцию со стадии гель-фильтрации наносили на колонну. По окончании нанесения промывали колонну буфером B (тот же состав) до схода нецелевого пика релаксированной ДНК. Элюцию целевой пДНК проводили буфером C (1,7 M $(NH_4)_2SO_4$, 0,3 M NaCl, 100 мМ Трис-HCl pH 7,5, 10 мМ ЭДТА). Сбор фракции начинали при достижении 50 mAU и продолжали до падения оптической плотности до начальных значений.

Очистка пДНК методом методом анионообменной хроматографии

Финальную стадию очистки сверхскрученной пДНК выполняли на колонке HiTrap SOURCE30Q 5 мл (набор Plasmid Select Starter Kit, Cytiva, Швеция). Раствор нанесения готовили, объединяя целевые фракции с аффинной хроматографии и разбавляя дистиллированной водой в 7 раз с перемешиванием на магнитной мешалке в течение 10 мин. Колонку уравновешивали буфером D (0,4 M NaCl, 100 мМ Трис-HCl pH 7,5, 10 мМ ЭДТА) при линейной скорости 120 см/ч. Наносили разбавленный раствор с той же скоростью, затем промывали колонну буфером D до стабилизации кривых (не менее двух колоночных объёмов). Элюцию проводили буфером E (1,25 M NaCl, 100 мМ Трис-HCl pH 7,5, 10 мМ ЭДТА), собирая фракцию при 50 mAU. Элюат смешивали с 70% изопропанола (70% от объёма элюата), центрифугировали 45 мин при 10 000 *g* при 4°C. Осадок растворяли в MQ воде. Концентрацию плазмидной ДНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, США) по поглощению при 260 нм и отношению 260/280.

2.1.2 Продукция (сборка) рекомбинантных AAV-частиц, наработка вирусного препарата и его очистка

Для получения вирусных частиц использовали тройную трансфекцию суспензионных клеток HEK293 тремя плазмидами: pAAV-CASI-HSPA1A-3xFLAG-WPRE (несущей трансген), pAAV2/9-PHPeB (кодирующей белки Rep и капсидные белки серотипа PHP.eB) и pHelper Vector (обеспечивающей вспомогательные функции аденовируса) [256]. Плазмиды pAAV2/9-PHPeB и pHelper были очищены ранее по методике, аналогичной описанной в разделе 2.1.1, и любезно предоставлены к.б.н. И.Б. Есмагамбетовым. Клетки HEK293 культивировали в суспензионных условиях. За 7 суток до трансфекции клетки адаптировали к среде BalanCD HEK293 в колбах

Эрленмейера объёмом 1000 мл. За 2 ч до трансфекции проводили полную замену среды на свежую. Для трансфекции использовали плазмидные ДНК в соотношении 1:1:1; общая концентрация плазмидной ДНК составляла 1 мкг/мл культуральной жидкости. В качестве среды для приготовления трансфекционной смеси использовали Opti-MEM I Reduced Serum Medium в объёме 10% от конечного объёма среды. Трансфекцию проводили с использованием полиэтиленимина (PEI) в концентрации 1 мг/мл; объём PEI брали из расчёта соотношения ДНК:PEI 1:4. Время инкубации PEI с ДНК составляло 7 мин. Через 48 ч после трансфекции в среду добавляли раствор глюкозы до 4 г/л и регулировали pH добавлением 7,5% раствора бикарбоната натрия. Через 72 ч проводили сбор rAAV путём осаждения клеток при 200 *g* в течение 10 мин и дальнейшего лизиса [257]. Очистку проводили по единому протоколу, включающему лизис клеток, осветление, концентрирование, аффинную хроматографию, гель-фильтрацию и концентрирование.

Лизис трансфецированных клеток

Клеточную суспензию (через 72 ч после трансфекции) смешивали с 10% объёма лизирующего буфера (1 М Трис-HCl pH 8,0, 5% Tween-20, 20 мМ $MgCl_2$). Инкубировали 1 ч при комнатной температуре на магнитной мешалке, затем добавляли бензоназу (40 U/мл суспензии) и инкубировали ещё 1 ч. После этого добавляли 10% концентрированного солевого раствора (5 М NaCl) и инкубировали 1 ч.

Осветление и концентрирование лизата

Лизат осветляли через капсульный фильтр Sartopore 2 Midicap 0,45/0,22 (Sartorius, США), предварительно уравновешенный буфер (20 мМ Трис-HCl pH 7,5, 150 мМ NaCl, 2 мМ $MgCl_2$, 0,005% Poloxamer188). Давление на входе в фильтр не превышало 0,5 бар. Фильтр промывали 200 мл буфера, смыв объединяли с лизатом. Осветлённый лизат концентрировали в три раза на кассете Hollow Fiber Cartridge 300 кДа (GE Life Sciences, США) с помощью насоса SatroJet при стабильном трансмембранном давлении равном 0,3 атм, затем проводили три последовательные диафильтрации буфером.

Очистка вирусного препарата методом аффинной хроматографии

Использовали сорбент AAVX POROS Capture Select (Thermo Fisher Scientific, США) в колонне XK16/20 (объём 10 мл) на хроматографической системе Achrom Firin Plus 36T. Колонку уравновешивали Binding buffer (линейная скорость 100 см/ч). Ретентат наносили с той же скоростью, промывали Binding buffer, затем Wash buffer (50 мМ Трис-HCl pH 8,5, 1,25 М NaCl, 2 мМ $MgCl_2$, 0,005% Poloxamer188) до стабилизации кривых. После повторного уравновешивания Binding buffer (два колоночных объёма) проводили элюцию элюирующим буфером (100 мМ глицин-HCl pH 2,5, 500 мМ L-аргинин, 2 мМ $MgCl_2$, 0,005% Poloxamer188) в

противоположном направлении при линейной скорости 50 см/ч. Сбор целевой фракции начинали при достижении 20 mAU; элюат немедленно нейтрализовали 1 М Трис-HCl pH 9,0

Очистка препарата методом гель-фильтрации

Проводили на сорбенте Superdex-200 (Cytiva, Китай) в колонне XK26/70 (объём 300 мл) на той же хроматографической системе. Колонку уравновешивали Binding buffer (линейная скорость 60 см/ч). Элюат после аффинной хроматографии наносили в объёме не более 2,5% от объёма колонны. Сбор целевой фракции AAV начинали при достижении оптической плотности 10 mAU.

Концентрирование и спектрофотометрический анализ вирусного препарата

Полученные фракции стерильно фильтровали через шприцевые фильтры PES 0,22 мкм (BioFil, Китай) и концентрировали в 5-10 раз с помощью концентраторов Amicon Ultra 50K (Millipore, США) центрифугированием при 5000 об/мин. Концентрацию препаратов rAAV измеряли на спектрофотометре NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, США) по поглощению при 260 нм и отношению 260/280.

2.1.3 Оценка чистоты и качества вирусного препарата

Оценка чистоты препарата методом электрофореза

Чистоту и подлинность препаратов rAAV оценивали с помощью электрофореза. Использовали гель Mini-Protean TGX Stain Free, 10 лунок, 30 мкл, 4-20% (BioRad, США). Внутреннюю камеру и мини-резервуар заполняли трис-глициновым электродным буфером, полученным разбавлением 10× TGB (30,3 г трис, 144 г глицин, 10 г SDS, pH 8,3). Для анализа отбирали 15 мкл образца, добавляли 15 мкл двухкратного буфера Лэмли, дополнительно содержащего 5% β-меркаптоэтанола, и прогревали 5 мин при 95°C. В качестве маркера молекулярной массы использовали 5 мкл Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Scientific, США). Электрофорез проводили при постоянном напряжении 200 В в течение примерно 20 мин. Визуализацию осуществляли на приборе GelDoc EZ Imager (BioRad, США).

Оценка морфологии вирионов методом трансмиссионной электронной микроскопии

Образец очищенного rAAV-Hsp70 анализировали методом трансмиссионной электронной микроскопии с негативным контрастированием в лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов ФГБУ НИЦ ЭМ им. Гамалеи (рук. к.м.н. В.Г. Жуховицкий). Препарат наносили на сетки с формваровой подложкой и контрастировали 1,5% раствором уранилацетата (время инкубации 5 минут). Просмотр и съёмку проводили на трансмиссионном электронном микроскопе с ускоряющим напряжением 160 кВ (HV=160kV) с использованием камеры NANOSPRT5. Съёмка велась с экспозицией 300 мс (2 стандартных кадра), без повышения резкости и без изменения контраста. Изображения получали при двух увеличениях: ×100 000 (Direct Mag: ×100 000, масштабный отрезок 100 нм) и ×250 000 (Direct Mag: ×250000,

масштабный отрезок 50 нм). Для каждого образца получено 40 изображений (пригодных для анализа). Подсчёт частиц проводили вручную по всем полям зрения. Полноценные капсиды AAV идентифицировали как однородные светлые икосаэдрические частицы размером около 22 нм без внутреннего просвета; дефектные (пустые или частично заполненные) – как неоднородные частицы того же размера с тёмным пятном или ареолом внутри. Рассчитывали долю полноценных и дефектных частиц от общего числа подсчитанных вирионов.

Определение титра рекомбинантного AAV

Для оценки эффективности продукции вирусных векторов проводился анализ количества геномных копий (гк) методом количественной ПЦР с использованием набора Takara qPCR AAV Pro® Titration Kit (Takara, США) согласно инструкции производителя. Титр очищенного препарата rAAV-casi-HSPA1A3-3xFLAG-WPRE (rAAV-Hsp70) рассчитывали в геномных копиях на мл (гк/мл). Полученные значения использовали для расчёта доз при введении животным (раздел 2.2.4).

2.1.4 Оценка продукта экспрессии трансгена *in vitro*

Оценку продукта экспрессии rAAV-CASI-HSPA1A-3xFLAG (rAAV-Hsp70) подтверждали иммуноцитохимическим методом с использованием клеток нейробластомы SH-SY5Y (ATCC, CRL-2266). Клетки высевали в 96-луночный планшет в плотности $0{,}5\times10^5$ клеток на лунку в 100 мкл среды DMEM дополненную 10% FBS, затем трансдуцировали rAAV-Hsp70 в дозе 10^5 геномных копий на клетку. Через 3 суток клетки фиксировали 80% ацетоном в PBS, блокировали 5% обезжиренным молоком в PBST, инкубировали с первичными антителами против FLAG-метки (рекомбинантные моноклональные антитела мыши anti-FLAG tag, GB1539, Servicebio, Китай; разведение 1:500) и вторичными антителами (козьи поликлональные антитела к IgG мыши, конъюгированные с FITC, разведение 1:500). Микроскопию проводили при увеличении ×10.

2.2 Экспериментальные животные

2.2.1 Линии животных и условия содержания

В работе использовали трансгенных мышей линии S-FUS(1-359), экспрессирующих укороченную патогенную изоформу *FUS* человека (фрагмент кодирующий 1-359 аминокислот) под контролем пан-нейронального промотора Thy1. Данная трансгенная линия была создана и охарактеризована нами ранее [258, 259]. В качестве контроля использовали мышей дикого типа линии CD1-WT и нетрансгенных однопомётных потомков из линии S-FUS(1-359). Все животные были получены из племенного ядра Центра доклинических исследований ИФАВ РАН. Животных содержали в условиях SPF-вивария при контролируемых параметрах окружающей среды: температура воздуха 20-25°C, относительная влажность 30-70%, световой режим 12:12 часов (день/ночь). Животные имели свободный доступ к стандартному гранулированному корму

и питьевой воде. Содержание осуществлялось в соответствии с требованиями ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» и ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур». Все экспериментальные процедуры были одобрены локальным этическим комитетом ИФАВ РАН (протоколы № 19 от 16.06.2017; № 30 от 29.04.2019; № 40 от 08.11.2019; № 48 от 13.04.2020; № 52 от 18.10.2021; № 61 от 06.10.2022; № 62 от 07.10.2022; № 76 от 05.07.2023; № 87 от 01.04.2024; № 101 от 17.12.2024) и проводились в соответствии с Директивой 2010/63/EU о защите животных, используемых в научных целях, а также с рекомендациями «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» (National Academy Press, Washington, D.C., 1996).

Маркировка животных

Индивидуальную идентификацию животных осуществляли методом ушной маркировки с использованием стандартной системы нумерации. Каждому животному присваивали уникальный идентификационный номер, который фиксировали в индивидуальном журнале наблюдений. Маркировку проводили одновременно с отбором биоптатов для генотипирования в возрасте 3-4 недель.

Отбор биологического материала и генотипирование животных

Генотипирование проводили для подтверждения наличия или отсутствия трансгенной кассеты FUS(1-359) у экспериментальных животных. В качестве источника геномной ДНК использовали биоптаты тканей животных (фрагмент ушной раковины или кончик хвоста). Генотипирование проводилось согласно протоколу, описанному ранее [259]. Последовательность праймеров для генотипирования представлена в таблице 3.

Таблица 3 – Последовательности праймеров для генотипирования

Обозначение	**Последовательность (5'→3')**	**Назначение**
hy1_vec_dn	AGAAGCAAGACCTCTGCAGAG	ПЦР, контроль
hFus_for	TCTTTGTGCAAGGCCTGGGT	ПЦР, амплификация FUS
qFus_rev	TAATCATGGGCTGTCCCGTT	ПЦР-РВ, FUS
qFus_for	TCTTTGTGCAAGGCCTGGGT	ПЦР-РВ, FUS
qGapdh_1	CACTGAGCATCTCCCTCACA	ПЦР-РВ, контроль (GAPDH)
qGapdh_2	GTGGGTGCAGCGAACTTTAT	ПЦР-РВ, контроль (GAPDH)

2.2.2 Обоснование выбора доз вирусного препарата для однократного системного введения

Дозы rAAV-Hsp70 (5×10^{10} и 5×10^{11} геномных копий на мышь) были выбраны на основании ранее опубликованных литературных данных по системному введению вектора AAV-PHP.eB взрослым мышам [253, 260]. Согласно работе Маликовой с соавторами, однократное внутривенное введение репортерного вектора на основе AAV-PHP.eB с идентичной

генетической платформой (rAAV9PHPeB-CASI-Luc), но содержащей ген люцифиразы в дозе 5×10^{10} геномных копий мышам линии CD-1 обеспечивает эффективную доставку в ЦНС с длительной персистенцией векторной ДНК в ткани мозга не менее 3 месяцев [256]. На основании этих данных доза 5×10^{10} геномных копий была выбрана в качестве низкой, а доза 5×10^{11} геномных копий – как десятикратно более высокая, обеспечивающая терапевтически значимый уровень экспрессии белка Hsp70 в условиях тяжёлой протеинопатии. Выбор двух доз также позволяет оценить наличие порогового или дозозависимого характера нейропротекторного действия Hsp70.

2.2.3 Формирование экспериментальных групп животных и схема эксперимента с введением вирусного препарата

Экспериментальные группы животных

В исследование эффективности доставки и экспрессии белка Hsp70 были включены гемизиготные самцы мышей линии S-FUS(1-359), возраст которых на начало эксперимента составлял 58-60 дней. Животных рандомизировали по группам с учётом массы тела, происхождения из помёта и генотипа. Сформировали следующие основные группы трансгенных особей: контрольная группа (носитель n = 18), группа низкой дозы препарата (n = 13) и группа высокой дозы препарата (n = 14). Общее количество трансгенных животных линии S-FUS(1-359), использованных в исследовании (тут я думаю, что лучше прописать каком именно, потому что выше пишем про н=505), составило 45. Схематичное изображение групп представлено на рисунке 9.

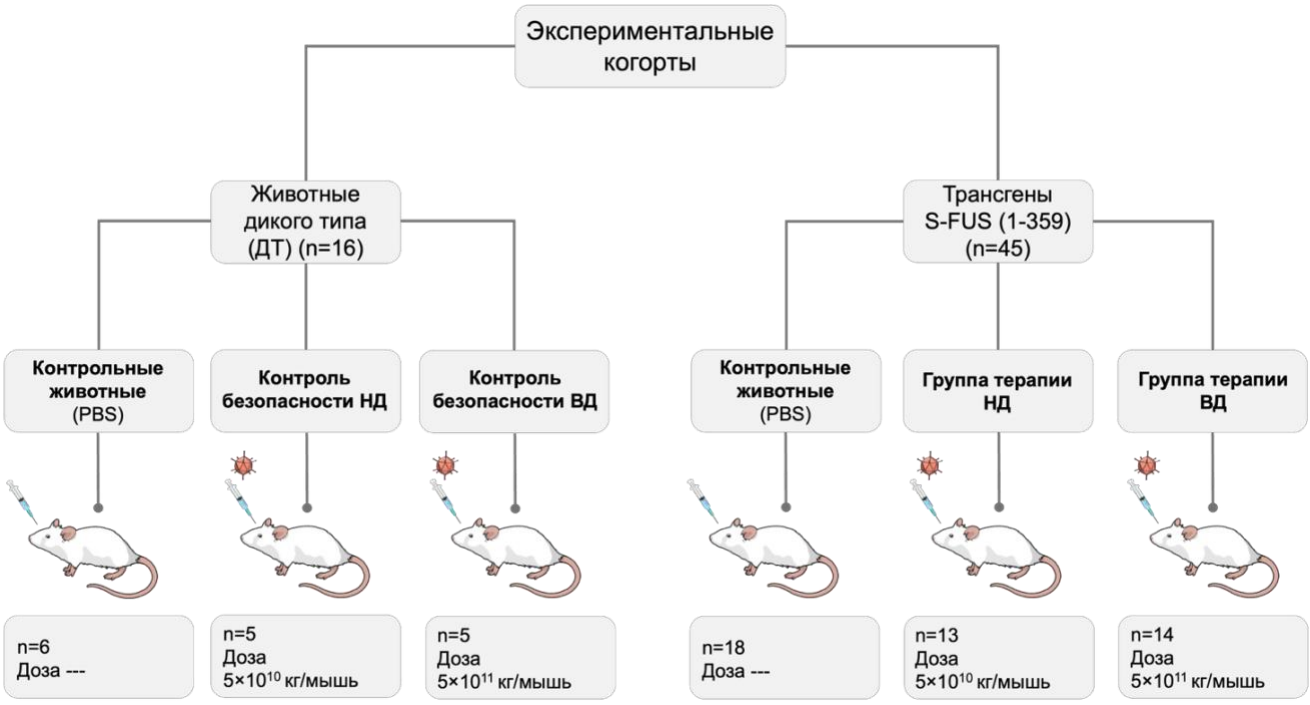


Рисунок 9 – Экспериментальные группы. Мыши дикого типа (ДТ, n = 16) были разделены на три группы: контроль (растворитель PBS, n = 6), контроль безопасности препарата в низкой

дозе (НД) (5×10^{10} копий генома/мышь препарата, n = 5) и контроль безопасности препарата в высокой дозе (ВД) (5×10^{11} копий генома/мышь препарата, n = 5)

Трансгенные мыши S-FUS(1-359) (Tg, n = 45) были разделены на три группы: контроль (растворитель PBS, n = 18), группа препарата в низкой дозе (НД) (5×10^{10} копий генома/мышь препарата, n = 13) и группа препарата в высокой дозе (ВД) (5×10^{11} копий генома/мышь препарата, n = 14). Образцы rAAV вводили однократно ретроорбитально в возрасте 58-60 дней. Иллюстрации взяты из BioArt Source Национального института аллергии и инфекционных заболеваний NIH.

Схема эксперимента

На первом этапе в возрасте 21 дня проводили генотипирование животных и отбор гемизиготных самцов. В возрасте 58-60 дней животных рандомизировали по группам и выполняли однократную ретроорбитальную инъекцию вирусного препарата в объёме 100 мкл. Через неделю после введения, начиная с возраста 65-67 дней, проводили еженедельное поведенческое тестирование (сила хвата передних конечностей, тест «перевёрнутая сетка»). Взвешивание и оценку неврологического статуса животных выполняли ежедневно во всех группах на протяжении всего эксперимента. В возрасте 200 дней проводили некропсию, изъятие образцов тканей, биохимический анализ крови, иммуноблоттинг и иммуногистохимический анализ для оценки экспрессии экзогенного белка Hsp70. Наблюдение за выживаемостью, взвешивание и оценка неврологического статуса продолжались до конца эксперимента. Общая схема эксперимента представлена на рисунке 10.



Рисунок 10 – Общая схема экскремента однократного ретроорбитального введения вирусного препарата rAAV-Hsp70

Процедура ретроорбитального ведение вирусного препарата

Препарат rAAV вводили методом ретроорбитальной инъекции в венозный синус под общей ингаляционной анестезией изофлураном. Мышь помещали в камеру с потоком воздуха 1,5 л/мин и концентрацией изофлурана 2% (об./об.) (наркозный аппарат R500IE, RWD Life Science, Китай). После того как животное успокаивалось и переставало реагировать на внешние раздражители, его перемещали на хирургический стол, где анестезию поддерживали через маску при концентрации изофлурана 1,5%. Во время манипуляции мышь находилась на термостатируемом коврике с обратной связью (ThermoStar Homeothermic Monitoring System, RWD Life Science, Китай), установленном на 37°C; температуру тела контролировали ректальным датчиком.

2.3 Анализ эффективности трансдукции rAAV-Hsp70

Наличие синтезированного белка Hsp70, меченного FLAG-эпитопом, оценивали методом иммуноблоттинга в образцах спинного мозга.

Первичные и вторичные антитела для иммуноблоттинга и иммуногистохимического анализа

Для иммуноблоттинга использовали следующие первичные антитела: моноклональные антитела мыши против FLAG-метки (anti-FLAG tag mouse mAb) в разведении 1:1000 (GB15938, Servicebio, Китай); моноклональные антитела мыши против референсного белка GAPDH в разведении 1:5000 (MAB374, Sigma-Aldrich, США). Вторичные антитела – конъюгированные с пероксидазой хрена антитела против иммуноглобулинов G мыши – применяли в разведении 1:5000 (5178-2504, Bio-Rad AbD Serotec Limited, Геркулес, Калифорния, США).

Для иммуногистохимического анализа использовали следующие первичные антитела: мышиные моноклональные anti-FLAG, разведение 1:500 (GB15938, Servicebio, Китай); кроличьи поликлональные anti-GFAP, разведение 1:1000 (ab7260, Abcam, США); кроличьи поликлональные anti-NeuN, разведение 1:500 (GB11138, Servicebio, Китай) и кроличьи поликлональные anti-Iba1, разведение 1:500 (DF7217, Affinity Biosciences, США). Вторичные антитела в разведении 1:1000 Alexa Fluor 488, Goat anti-Mouse IgG Cross-Adsorbed Secondary Antibody (A-11001, Thermo Fisher Scientific, США), Alexa Fluor 555, Goat anti-Rabbit IgG Cross-Adsorbed Secondary Antibody (A21428, Thermo Fisher Scientific, США)

Иммуноблоттинг

Уровни рекомбинантного белка Hsp70 с FLAG-меткой анализировали в образцах спинного мозга методом вестерн-блоттинга, как описано ранее [261]. Образцы разделяли в 16% полиакриламидном геле. Для детекции комплекса антиген–антитело использовали коммерческий набор Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, США). Визуализацию и денситометрический анализ для последующей полуколичественной оценки

уровней белка выполняли с помощью системы Fusion-FX6. Использовали систему хемилюминесцентной визуализации EDGE (Vilber, Франция). Список антител представлен выше в разделе Первичные и вторичные антитела для иммуноблоттинга и иммуногистохимического анализа.

Иммуногистохимический анализ и конфокальная микроскопия

После эвтаназии животных грудной отдел спинного мозга диссектировали на льду и фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине при 4°C, после чего материал подвергали стандартной парафиновой проводке. Ткань дегидратировали, последовательно проводя через три смены 96% этилового спирта: первую – 10 мин, затем две – по 5 мин каждая. Далее проводку продолжали в двух сменах 100% спирта – по 5 мин в каждой. Затем образцы инкубировали в смеси 100% этиловый спирт : хлороформ (1:1) в течение 30 мин, после чего в хлороформе (I) – 1 ч, и оставляли на ночь в хлороформе (II). Ткани пропитывали парафином (три смены по 1 ч) при 60°C. Парафиновые блоки подготавливали на станции для заливки Leica EG1160 (Leica Biosystems, Германия), после чего изготавливали срезы толщиной 10 мкм и монтировали на предметные стекла с полилизиновым покрытием (Thermo Scientific, США).

Перед иммуногистохимическим окрашиванием срезы депарафинизировали в трёх сменах ксилола: 15 мин, 5 мин и 5 мин. Далее регидратировали в понижающихся концентрациях этанола в следующем порядке: 100% – 20 мин, 95% – 5 мин, 50% –5 мин, после чего трижды промывали в дистиллированной воде по 5 мин. Для демаскировки антигенов срезы инкубировали в 10 мМ цитратном буфере (pH 6,0) с нагреванием в микроволновой печи в течение 10 мин при 700 Вт, затем охлаждали до комнатной температуры и промывали в дистиллированной воде 5 мин. Неспецифическое связывание блокировали в 10% растворе нормальной козьей сыворотки в 0,05% Tween 20-PBS (Helicon, Servicebio, Китай) в течение 1,5 ч при комнатной температуре.

Затем срезы инкубировали с первичными антителами во влажной камере в течение ночи (16-18 ч) при 4°C. По окончании инкубации срезы трижды промывали в PBS по 10 мин при комнатной температуре. Затем срезы инкубировали с соответствующими вторичными антителами, разведение 1:1000 (в течение 1,5 ч при комнатной температуре в темноте. После этого срезы вновь трижды промывали в PBS по 10 мин. Для визуализации ядер препараты докрашивали DAPI (Thermo Scientific, США, разведение 1:10 000) в течение 5 мин, затем промывали в PBS и заключали в водорастворимую монтажную среду ProLong Glass Antifade Mountant (Thermo Scientific, США) под покровное стекло. Список антител представлен выше в подразделе Первичные и вторичные антитела для иммуноблоттинга и иммуногистохимического анализа.

Конфокальную микроскопию выполняли на микроскопе Zeiss LSM 880 (Zeiss, Германия) с использованием объективов с увеличением 20× и 40×. Флуоресценцию возбуждали лазерными

линиями 405 нм (для DAPI), 488 нм (для Alexa Fluor 488), 558 нм (для Alexa Fluor 555); сигналы регистрировали в соответствующих диапазонах эмиссии. В качестве отрицательного контроля использовали срезы от животных, получавших растворитель (PBS), у которых сигнал по каналу FLAG отсутствовал.

2.4 Биохимический анализ сыворотки крови

Для оценки возможных системных эффектов однократного ретроорбитального введения rAAV-Hsp70 проводили биохимический анализ сыворотки крови мышей дикого типа через 150 суток после введения. Животные были разделены на три группы: контроль (без введения вектора, n = 5), низкая доза (5×10^{10} гк/мышь, n = 5) и высокая доза (5×10^{11} гк/мышь, n = 3). Определяли активность аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ) и щелочной фосфатазы (ЩФ) как маркеров функции печени, коэффициент де Ритиса (АСТ/АЛТ), концентрацию мочевины и креатинина как показателей функции почек, их соотношение, а также активность креатинкиназы (КФК) как маркера мышечного повреждения. Анализ выполняли в ветеринарной лаборатории «Шанс Био» (Москва, Россия).

2.5 Анализ экспрессии генов маркеров нейровоспаления, нейропластичности и апоптоза

Экспрессию генов маркеров нейровоспаления и нейропластичности (*Gfap, Tnf, Il1b, Il6, Bdnf, Gsk3*), а также генов, регулирующих апоптоз, иммунный ответ и внутриклеточную сигнализацию (*Casp3, Puma, Trem2, Stat3*), оценивали в образцах гиппокампа, префронтальной коры, спинного мозга и среднего мозга методом количественной ПЦР в реальном времени с детекцией SYBR Green, как описано ранее [262]. Анализ проводили на самцах дикого типа (n = 6) и гемизиготных трансгенных самцах S-FUS(1-359) (n = 9); размеры выборок для каждого гена и отдела указаны в подписях к соответствующим рисункам. Каждый образец анализировали в трёх технических повторах. Относительный уровень экспрессии оценивали методом 2^−ΔΔCt с использованием генов *Gapdh и Ppia* в качестве референсных (таблица 4).

Таблица 4 – Последовательности праймеров для количественной ПЦР в реальном времени

Ген		Последовательность (5’→3’)	
p53-регулируемый модулятор апоптоза	*Puma*	For	ACAGCACCTCCAGGAATCAAG
		Rev	ACTTGCTCAGGAGAACGCAG
Интерлекин 6	*Il6*	For	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC
		Rev	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
Интерлекин 1 b	*Il-1b*	For	ACCAACAAGTGATATTCTCCAT
		Rev	GATCCACACTCTCCAGCTG
Киназа гликогенсинтазы-3 бета	*Gsk3*	For	GCACTCTTCAACTTTACCACTCAAG
		Rev	CGAGCATGTGGAGGGATAAG
Фактор некроза опухоли	*Tnf alpha*	For	TTGTCTTAATAACGCTGATTTGGT
		Rev	GGGAGCAGAGGTTCAGTGAT
Рецептор, экспрессируемый на миелоидных клетках 2	*Trem2*	For	ACAGCACCTCCAGGAATCAAG
		Rev	ACTTGCTCAGGAGAACGCAG
Передатчик сигнала и активатор транскрипции	*Stat3*	For	GACATTCCCAAGGAGGAGGC
		Rev	CTTGGTCTTCAGGTACGGGG

Продолжение таблицы 4

Ген		Последовательность (5'→3')	
Нейротрофический фактор мозга	*Bdnf*	For	CGGCGCCCATGAAAGAAGTA
		Rev	AGACCTCTCGAACCTGCCCT
Глиальный фибриллярный кислый белок	*Gfap*	For	ACAGAGGAGTGGTATCGGTCT
		Rev	GCGGCGATAGTCGTTAGCTT
Каспаза 3	*Casp3*	For	CGGGGAGCTTGGAACGGTA
		Rev	CCACTGACTTGCTCCCATGT
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	*Gapdh*	For	CACTGAGCATCTCCCTCACA
		Rev	GTGGGTGCAGCGAACTTTAT
Пептидилпролилизомераза А	*Ppia*	For	TGCTGGACCAAACACAAACG
		Rev	GCCTTCTTTCACCTTCCCAAA

Примечание – For – прямой праймер, Rev – обратный.

2.6 Анализ дофаминовой дисрегуляции у трансгенных животных S-FUS(1-359)

Анализ дофамина и его метаболитов методом ВЭЖХ с электрохимической детекцией

Уровни дофамина (ДА), его метаболитов – 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК), гомованилиновой кислоты (ГВК), 3-метокситирамина (3-МТ), а также серотонина (5-НТ) определяли в образцах дорсального стриатума методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с электрохимической детекцией, как описано ранее [262]. Анализ проводили на самцах дикого типа (n = 9) и гемизиготных трансгенных самцах (n = 9) линии S-FUS(1-359). Результаты выражали в пмоль/мг белка.

Оценка экспрессии генов метаболизма дофамина

Экспрессию генов метаболизма дофамина – моноаминоксидазы А (*Maoa*), моноаминоксидазы В (*Maob*), катехол-О-метилтрансферазы (*Comt*), тирозингидроксилазы (*Th*) и альдегиддегидрогеназы (*Aldh1a1*) – оценивали в образцах среднего мозга методом количественной ПЦР в реальном времени с детекцией SYBR Green, как описано ранее [262]. Анализ проводили на n = 6 самцах дикого типа и n = 8 гемизиготных трансгенных самцах S-FUS(1-359). Относительный уровень экспрессии оценивали методом 2^−ΔΔCt с использованием гена *Gapdh* в качестве референсного (таблица 5).

Таблица 5 – Последовательность праймеров для количественной ПЦР в реальном времени

Ген		Последовательность (5'→3')	
Моноаминоксидаза А	*Maoa*	For	TCACAGGCCACATGTTCGAC
		Rev	AACTCTATCCCGGGCTTCCA
Моноаминоксидаза В	*Maob*	For	CCACATTGACCAGACAGGGG
		Rev	TCTTCATGCCCAAAGCAGGT
Катехол-О-метилтрансфераза	*Com*t	For	ATCCCAGGACCTTATCCCCC
		Rev	GTGTCTGGAGGTAGCGGTC
Альдегиддегидрогеназа 1А1	*Th*	For	GCCTCCTCACCTATGCACTC
		Rev	CCCAGAGATGCAAGTCCAAT

Примечание – For – прямой праймер, Rev – обратный

2.7 Поведенческое тестирование

Сила хвата передних конечностей

Оценку силы хвата передних конечностей проводили с помощью цифрового динамометра Grip Strength Test Meter (IITC Life Science, США). Прибор оснащён тонкой металлической решёткой, соединённой с тензометрическим датчиком, и отображает максимальное приложенное усилие в граммах. Животное аккуратно удерживали за основание хвоста и подносили к решётке, позволяя ему ухватиться за неё передними лапами. Сразу после захвата животное с постоянной скоростью оттягивали в горизонтальном направлении до момента отрыва лап от решётки. Прибор автоматически фиксировал пиковое значение силы, развиваемое животным. Для каждого животного выполняли пять последовательных измерений с интервалом не менее 30 секунд между попытками. В статистический анализ включали сумму значений всех попыток. Тестирование проводили еженедельно на протяжении всего эксперимента.

Тест перевернутая сетка

Для оценки мышечной выносливости и координации использовали тест «перевёрнутая сетка». Сетка размером 40 × 40 см с диаметром ячеек 1 см была жёстко закреплена в металлической рамке. Животное помещали в центр сетки, после чего конструкцию плавно переворачивали и устанавливали горизонтально на высоте не менее 50 см над стандартной домашней клеткой с толстым (не менее 30 см) слоем подстилочного материала для амортизации падения. В момент полного переворота сетки включали секундомер. Регистрировали время удержания животного на перевёрнутой сетке (латентность до падения). Эксперимент прекращали либо в момент падения животного, либо по достижении максимального времени наблюдения 60 секунд. Тест повторяли трижды для каждого животного в течение одного экспериментального дня с интервалом не менее 30 минут между попытками. Для статистического анализа использовали максимальное значение времени удержания по трём попыткам. Тестирование проводили еженедельно на протяжении всего эксперимента.

2.8 Анализ экспрессии генов *Hsp* у трансгенных животных S-FUS(1-359) на основе данных РНК-секвенирования

Для оценки дифференциальной экспрессии генов белков теплового шока (HSP) в спинном мозге мышей FUS(1-359) на разных стадиях патологии был проведён биоинформатический анализ данных РНК-секвенирования (RNA-seq), полученных ранее [263]. Данные загружены из базы NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) под номером GSE112629. Предварительную обработку проводили с помощью скрипта PPLine, включавшего Trimmomatic для обрезки адаптеров, а также фильтрации по длине и качеству, STAR для картирования прочтений на геном мыши (версия GRCm38) и HTSeq-count для подсчёта числа прочтений, приходящихся на гены [264–267]. Дифференциальную экспрессию генов оценивали с использованием пакета edgeR

[268] методом нормализации числа прочтений TMM (Trimmed Mean of M-values) [269] и квазиправдоподобной обобщённой лог-линейной модели с отрицательным биномиальным распределением. Гены со значением частоты ложных обнаружений FDR < 0,05 (FDR, False Discovery Rate) считали дифференциально экспрессированными. Анализ выполнен совместно с Фуниковым С.Ю. (ИМБ РАН); данные предоставлены для интерпретации в рамках настоящей работы.

2.9 Методы статистического анализа

Первичная обработка, систематизация и архивирование данных выполнены с использованием пакета MS Excel. Статистический анализ проведён в программе GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, США). Выживаемость анализировали методом Каплана-Мейера с использованием лог-рангового критерия (Мантела-Кокса) и критерия Гехана-Бреслоу-Вилкоксона; тренды выживаемости оценивали с помощью лог-рангового критерия для тренда. Перед сравнением групп систематически оценивали нормальность распределения данных с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для непрерывных переменных, прошедших тест на нормальность, межгрупповые сравнения выполняли с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим пост-тестом Даннетта для сравнения с контрольной группой. Для данных (в том числе для сравнения нескольких независимых групп), значительно отклоняющихся от нормального распределения, применяли непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с пост-тестом Данна. Длительность индивидуальных симптомов конечностей после однократного ретроорбитального введения вирусного препарата анализировали с помощью двухфакторного ANOVA с пост-тестом Даннетта. Данные повторных измерений (динамика массы тела и результаты функциональных тестов) оценивали с помощью моделей смешанных эффектов (REML), с группой и временем как фиксированными факторами и отдельными животными как случайными факторами. Попарные сравнения проводили с использованием критерия Фишера (LSD), так как структура REML учитывает повторные измерения и множественные сравнения. Корреляционный анализ проводили с вычислением коэффициента корреляции Пирсона (при нормальном распределении) или Спирмена (при ненормальном); силу связи оценивали по коэффициенту корреляции (r) и коэффициенту детерминации (R^2). Порог значимости $p < 0,05$. Данные представлены как среднее ± SD для нормально распределённых переменных и как среднее ± SEM для ненормально распределённых или данных повторных измерений, как указано на рисунках и в тексте.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведённое исследование носило комплексный характер и включало три основных этапа. На первом этапе была выполнена детальная фенотипическая характеристика трансгенной мышиной линии с БАС-подобным фенотипом на репрезентативной выборке, что позволило установить референсные параметры выживаемости, возраст начала и длительности симптоматической стадии, а также динамику массы тела и двигательных нарушений. На втором этапе получен и охарактеризован вирусный препарат на основе аденоассоциированного вируса, кодирующего человеческий Hsp70, с подтверждением его функциональности *in vitro*. На заключительном этапе проведена оценка терапевтического потенциала rAAV на трансгенной модели.

3.1 Общие сведения об используемой тест-системе

На базе ИФАВ РАН была создана оригинальная трансгенная мышиная линия S-FUS(1-359), экспрессирующая укороченный FUS человека под контролем пан-нейронального промотора Thy1. В результате экспрессии образуется аберрантная изоформа белка FUS. Эта изоформа содержит аминокислотные остатки с 1 по 359, лишена С-концевого домена, сигнала ядерной локализации, склонна к агрегации и формированию в нейронах цитоплазматических включений, аналогичных обнаруживаемым у пациентов с БАС. У трансгенных животных развивается прогрессирующий фенотип, включающий гибель двигательных нейронов и двигательные нарушения, что позволяет рассматривать данную линию как модель FUS-протеинопатии с БАС-подобным фенотипом [258].

Для быстрой и надёжной оценки терапевтического потенциала вирусного препарата необходима модель с коротким жизненным циклом и ярким, стремительно прогрессирующим фенотипом, чтобы эффект вмешательства становился очевидным в пределах нескольких недель. Именно такой моделью является линия S-FUS(1-359). Но, несмотря на её активное использование в доклинических исследованиях, в том числе для изучения нейропротекторных свойств различных соединений [270–273], её фенотипические параметры ранее не были систематически охарактеризованы на репрезентативной выборке. Имеющиеся публикации, как правило, ограничивались отдельными показателями и малыми группами животных, что затрудняло учёт высокой индивидуальной вариабельности модели. Поэтому первым этапом настоящей работы стал ретроспективный анализ основных параметров БАС-подобного фенотипа на выборке n = 505. В анализ были включены контрольные животные (и самцы и самки) разных поколений и помётов (2015 – 2024, n = 505); при этом число поколений, включённых в отдельные виды анализа, различалось в зависимости от полноты доступных данных по конкретному параметру. Поэтому для каждого показателя далее отдельно указаны размер выборки и число поколений,

вошедших в анализ. Это позволило впервые провести комплексную оценку и выявить устойчивые, воспроизводимые фенотипические черты данной модели.

3.1.1 Ретроспективный анализ основных фенотипических параметров модели

Ретроспективный анализ данных, собранных за период с 2015 по 2024 год на 30 поколениях животных, демонстрирует стабильность трансгена в ядре линии. Это подтверждается однородными показателями продолжительности жизни и времени наступления симптоматической стадии у животных, гемизиготных по трансгенной кассете. Сравнительный анализ проводился исключительно среди гемизиготных особей по двум основным причинам. Во-первых, в большинстве исследований используются именно гемизиготные животные, поскольку наличия одного поражённого аллеля достаточно для развития БАС-подобного фенотипа. Во-вторых, данные по гомозиготным особям были доступны только за 2016 и 2017 годы, что существенно ограничивает возможности для сравнения. Была определена средняя продолжительность жизни каждого поколения в 2016-2017 гг. (рисунок 11).

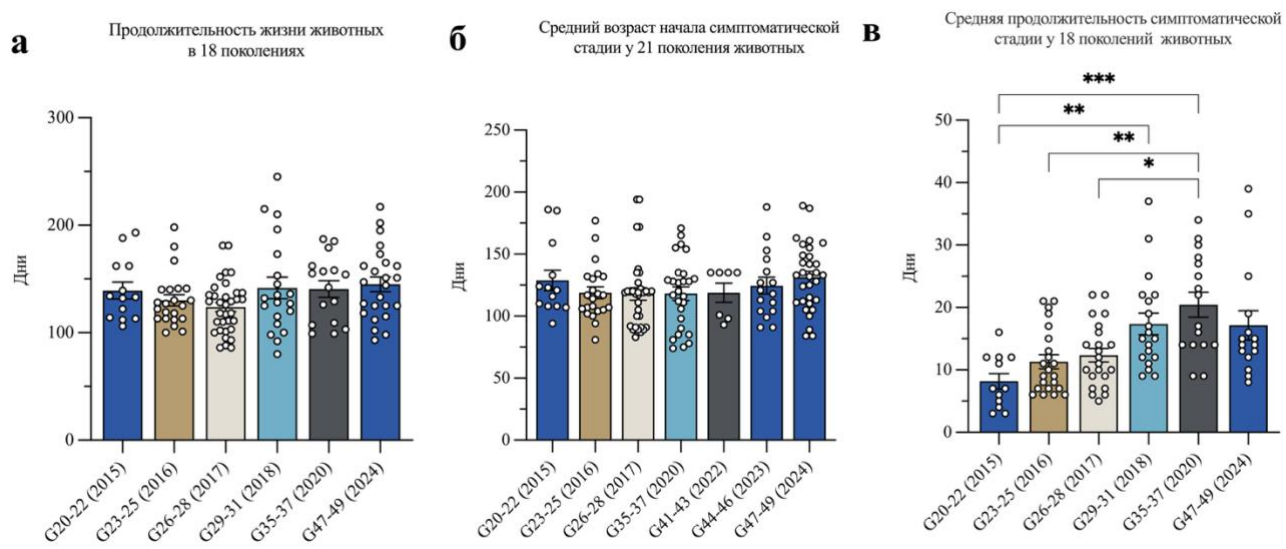


Рисунок 11 – Ретроспективные данные о продолжительности жизни, динамике выживаемости, времени начала и длительности симптоматической стадии. **а.** Продолжительность жизни (дни) 18 поколений гемизиготных животных за 2015–2020 гг. (2015 г. n = 13, 2016 г. n = 22, 2017 г. n = 34, 2018 г. n = 20; 2020 г. n = 16, 2024 г. n = 24; p = 0,22). **б**. Возраст начала симптоматической стадии (БАС-подобный фенотип) (в днях) у 21 поколения гемизиготных животных за 2015–2024 гг. (2015 г. n = 13, 2016 г. n = 22, 2017 г. n = 34, 2020 г. n = 27; 2022 г. n = 7, 2023 г. n = 16, 2024 г. n = 31; p = 0,35). **в**. Продолжительность симптоматической стадии (дни) у 18 поколений гемизиготных особей с трансгенной кассетой за 2015-2024 гг. (2015 г. n = 12, 2016 г. n = 22, 2017 г. n = 22, 2018 г. n = 19; 2020 г. n = 16, 2024 г. n = 15; $p < 0,0001$, критерий Краскела-Уоллиса). Данные представлены как среднее значение ± SEM

Показатели в каждом из представленных годов включали данные, полученные не менее чем от 3 поколений мышей. Средняя продолжительность жизни составила: 139,2 ± 7,96 дней для поколений 20–22 (2015 г.) (n = 13, CO 28,71); 130,2 ± 5,27 дней для поколений 23–25 (2016 г.) (n = 22, CO 24,70); 123,9 ± 4,20 дней для поколений 26–28 (2017 г.) (n = 34, CO 24,5);

141,7 ± 9,98 дней для поколений 29–31 (2018 г.) (n = 20, СО 44,65); 140,7 ± 7,74 дней для поколений 35–37 (2020 г.) (n = 16, СО 30,95) и 145,0 ± 6,78 дней для поколений 47–49 (2024 г.) (n = 24, СО 33,21) (p = 0,22).

Такой же анализ был выполнен для определения возраста начала БАС-подобного фенотипа (симптоматической стадии) (см. рисунок 11б). Средний возраст начала симптоматической стадии составил: 128,8 ± 8,2 дней для поколений 20–22 (2015 г.) (n = 13, СО 29,65); 118,9 ± 4,8 дней для поколений 23–25 (2016 г.) (n = 22, СО 22,33); 117,8 ± 5,0 дней для поколений 26–28 (2017 г.) (n = 34, СО 29,07); 118,1 ± 5,5 дней для поколений 35–37 (2020 г.) (n = 27, СО 28,3); 118,9 ± 7,7 дней для поколений 41–43 (2022 г.) (n = 7, СО 20,27); 124,6 ± 6,8 дней для поколений 44–46 (2023 г.) (n = 16, СО 27,22) и 131,3 ± 4,9 дней для поколений 47–49 (2024 г.) (n = 31, СО 27,03) (p = 0,35).

Из-за ограниченности данных результаты по продолжительности симптоматической стадии были получены только для 18 поколений мышей (см. рисунок 11в). Средняя продолжительность симптоматической стадии составила: 8,2 ± 1,2 дней для поколений 20–22 (2015 г.) (n = 12, СО 4,28); 11,3 ± 1,1 дней для поколений 23–25 (2016 г.) (n = 22, СО 5,23); 12,4 ± 1,1 дней для поколений 26–28 (2017 г.) (n = 22, СО 5,12); 17,4 ± 1,7 дней для поколений 29-31 (2018 г.) (n = 19, СО 7,54); 20,4 ± 2,0 дней для поколений 35–37 (2020 г.) (n = 16, СО 8,07) и 17,1 ± 2,3 дней для поколений 47–49 (2024 г.) (n = 15, СО 9,08) (p < 0,001).

Анализ выживаемости проводили методом Каплана-Мейера на 18 поколениях гемизиготных животных с 2015 по 2020 гг. (рисунок 12).

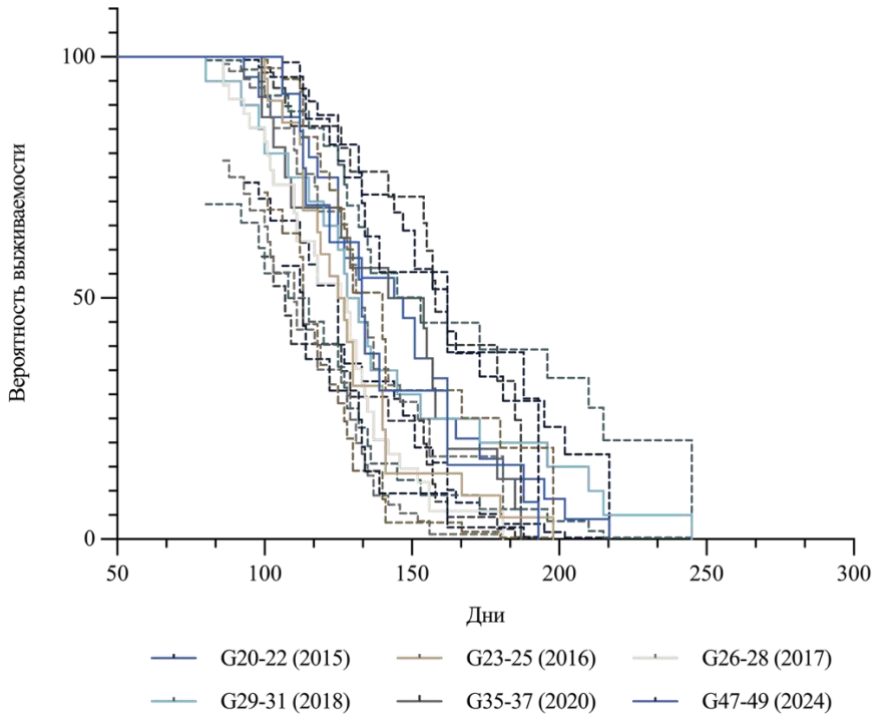


Рисунок 12 – Ретроспективные данные о динамике выживаемости гемизиготных самцов S-FUS(1-359). Анализ выживаемости 18 поколений гемизиготных животных с 2015 по 2024 г.

по методу Каплана–Мейера (2015 г. n = 13, 2016 г. n = 22, 2017 г. n = 34, 2018 г. n = 20; 2020 г. n = 16, 2024 г. n = 24; p = 0,06, критерий Мантеля-Кокса; p = 0,20, критерий Гехана-Бреслоу-Вилкоксона)

Медианы выживаемости составили: 133 дня для поколений 20–22 (2015 г.) (n = 13), 126 дней для поколений 23–25 (2016 г.) (n = 22), 127 дней для поколений 26–28 (2017 г.) (n = 34), 130 дней для поколений 29–31 (2018 г.) (n = 20), 148 дней для поколений 35–37 (2020 г.) (n = 16), 145,5 дней для поколений 47–49 (2024 г.) (n = 24) (p = 0,06, критерий Мантеля-Кокса; p = 0,20).

При анализе взаимосвязи между длительностью симптоматической стадии и продолжительностью жизни выявлены две различные закономерности (рисунок 13).

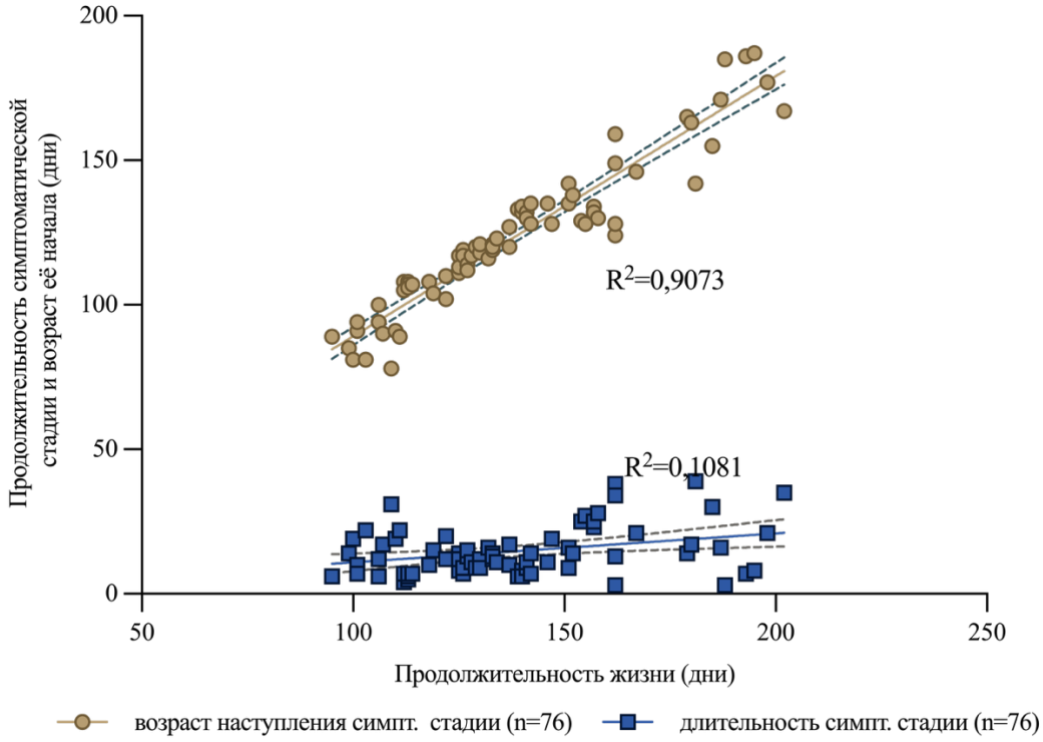


Рисунок 13 – Корреляционный анализ параметров симптоматической стадии с продолжительностью жизни у гемизиготных самцов S-FUS(1-359). На графике показаны линии регрессии для: возраста начала симптоматической стадии (R^2 = 0,91, p < 0,0001, r = 0,95) и длительности симптоматической стадии (R^2 = 0,11, p = 0,0037, r = 0,33) в зависимости от общей продолжительности жизни

Между продолжительностью жизни и возрастом начала симптоматической стадии была обнаружена очень сильная положительная корреляция (p < 0,0001; r = 0,95, R2 = 0,91). Между продолжительностью жизни и длительностью симптоматической стадии также была установлена положительная корреляция, однако значительно более слабая, но также статистически значимая (p = 0,0037; r = 0,33, R2 = 0,11).

3.1.2 Влияние пола и дозы трансгена на фенотипические параметры модели

Продолжительность жизни анализировали у особей обоих полов (самцов и самок), несущих трансгенную кассету в гомозиготном или гемизиготном состоянии (рисунок 14).

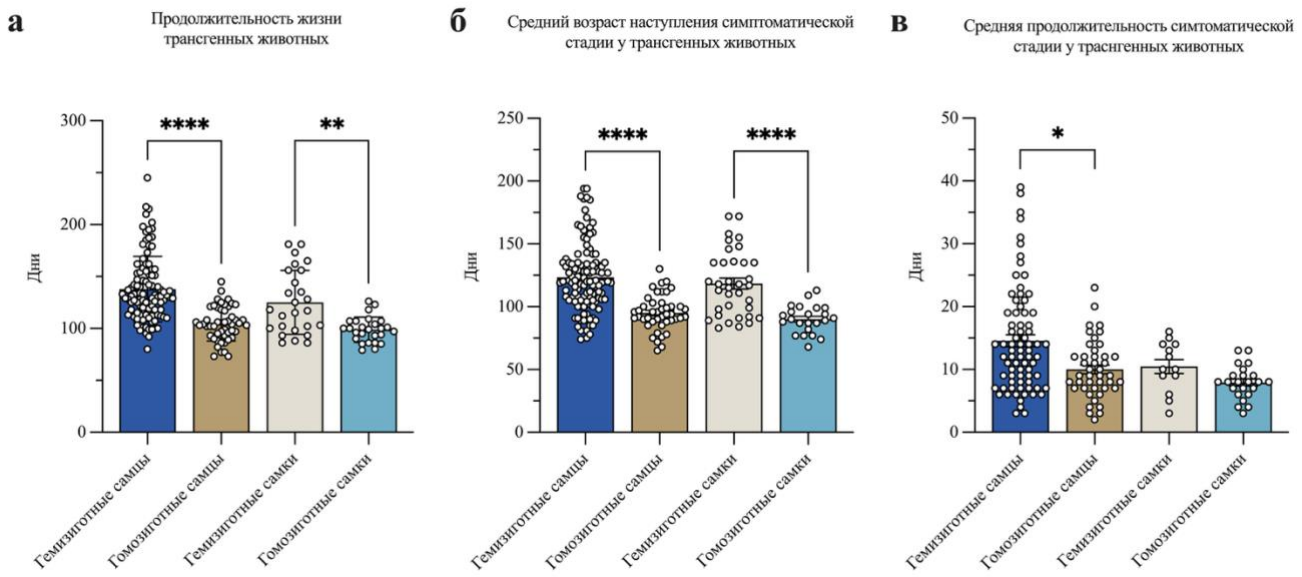


Рисунок 14 – Продолжительность жизни, возраст развития симптоматической стадии и её длительность у трансгенной мышиной модели S-FUS(1-359) в объединённых контрольных группах животных в различных периодах с 2015 по 2024 гг. **а.** Продолжительность жизни (дни) 18 поколений гемизиготных животных за 2015–2020 гг. (2015 г. n = 13, 2016 г. n = 22, 2017 г. n = 34, 2018 г. n = 20; 2020 г. n = 16, 2024 г. n = 24; p = 0,22). **б.** Возраст начала симптоматической стадии (БАС-подобный фенотип) (в днях) у 21 поколения гемизиготных животных за 2015–2024 гг. (2015 г. n = 13, 2016 г. n = 22, 2017 г. n = 34, 2020 г. n = 27; 2022 г. n = 7, 2023 г. n = 16, 2024 г. n = 31; p = 0,35). **в.** Продолжительность симптоматической стадии (дни) у 18 поколений гемизиготных особей с трансгенной кассетой за 2015–2024 гг. (2015 г. n = 12, 2016 г. n = 22, 2017 г. n = 22, 2018 г. n = 19; 2020 г. n = 16, 2024 г. n = 15; p < 0,0001, критерий Краскела-Уоллиса. Данные представлены как среднее значение ± SEM

Средняя продолжительность жизни (в днях) гемизиготных самцов составила 137,8 ± 3,11 (n = 103, СО 31,58), гомозиготных самцов – 104,4 ± 2,4 (n = 49, СО 16,44), гемизиготных самок – 125,1 ± 6,1 (n = 26, СО 30,83), гомозиготных самок – 98,8 ± 2,4 (n = 26, СО 12,09) (p<0,0001). Средний возраст начала симптоматической стадии (в днях) у гемизиготных самцов составил 123,4 ± 2,5 (n = 115, СО 26,98), у гомозиготных самцов – 95,1 ± 2,1 (n = 44, СО 14,04), у гемизиготных самок – 118,4 ± 4,4 (n = 35, СО 25,71), у гомозиготных самок – 90,1 ± 2,3 (n = 23, СО 11,07) (p<0,0001) (см. рисунок 14б). Средняя продолжительность симптоматической стадии (в днях) у гемизиготных самцов составила 14,58 ± 0,96 дней (n = 76, СО 8,33), у гомозиготных самцов – 10,0 ± 0,70 дней (n = 43, СО 4,61), у гемизиготных самок – 10,46 ± 1,12 дней (n = 13, СО 4,03), у гомозиготных самок – 7,91 ± 0,55 (n = 23, СО 2,63) (p = 0,0002) (см. рисунок 14в).

Кривые выживаемости, представленные на рисунке 15, продемонстрировали достоверные различия между группами (p < 0,0001, критерий Мантела-Кокса и критерий Гехана-Бреслоу-Уилкоксона). Медиана выживаемости составила: 131 день для гемизиготных самцов (n = 103), 104 дня для гомозиготных самцов (n = 49), 117,5 дней для гемизиготных самок (n = 26) и 99,5 дней для гомозиготных самок (n = 26).

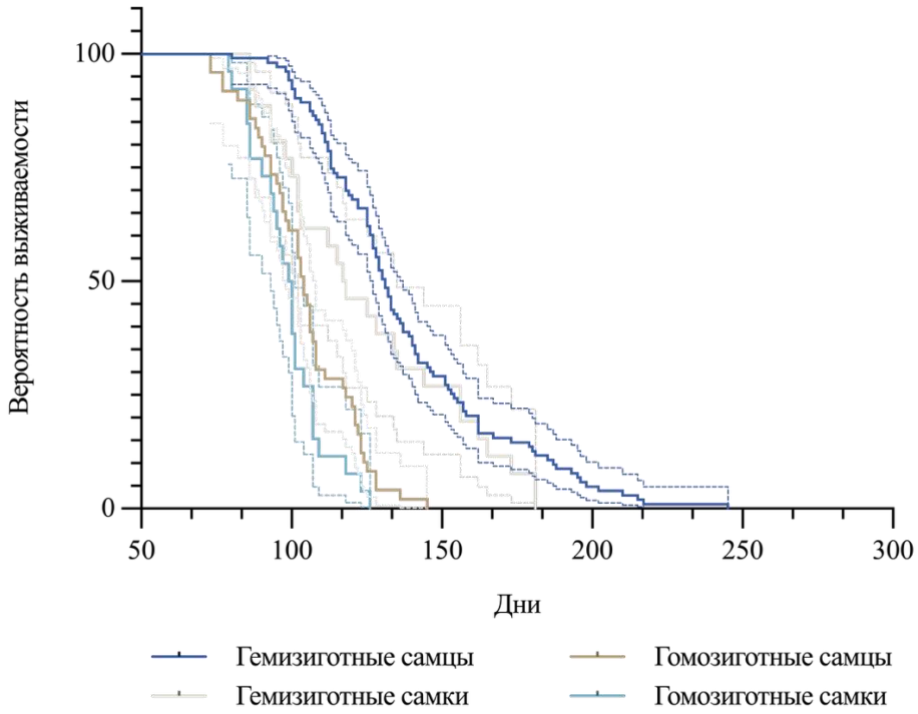


Рисунок 15 – Динамика выживаемости у животных гомо- и гемизиготных по трансгенной кассете самок и самцов. Медианное время выживания для гемизиготных самцов составило 131 день (n = 103), для гомозиготных самцов – 104 дня (n = 49), для гемизиготных самок – 117,5 дней (n = 26), а для гомозиготных самок – 99,5 дней (n = 26) ($p < 0,0001$, критерий Мантела-Кокса; $p < 0,0001$ критерий Гехана-Бреслоу-Уилкоксона)

Корреляционный анализ, представленный на рисунке 16, выявил сильную положительную связь между возрастом начала симптомов и общей продолжительностью жизни для всех генотипов и полов: гомозиготные самцы ($R^2 = 0,88$, $p < 0,0001$, $r = 0,94$), гемизиготные самцы ($R^2 = 0,91$, $p < 0,0001$, $r = 0,95$), гомозиготные самки ($R^2 = 0,95$, $p < 0,0001$, $r = 0,97$) и гемизиготные самки ($R^2 = 0,99$, $p < 0,0001$, $r = 0,99$). В то же время длительность симптоматической стадии демонстрировала слабую и зачастую статистически незначимую корреляцию с продолжительностью жизни: гомозиготные самцы ($R^2 = 0,22$, $p = 0,0013$, $r = 0,47$), гемизиготные самцы ($R^2 = 0,11$, $p = 0,0037$, $r = 0,33$), гомозиготные самки ($R^2 = 0,10$, $p = 0,14$, $r = 0,32$) и гемизиготные самки ($R^2 = 0,02$, $p = 0,61$, $r = 0,16$).

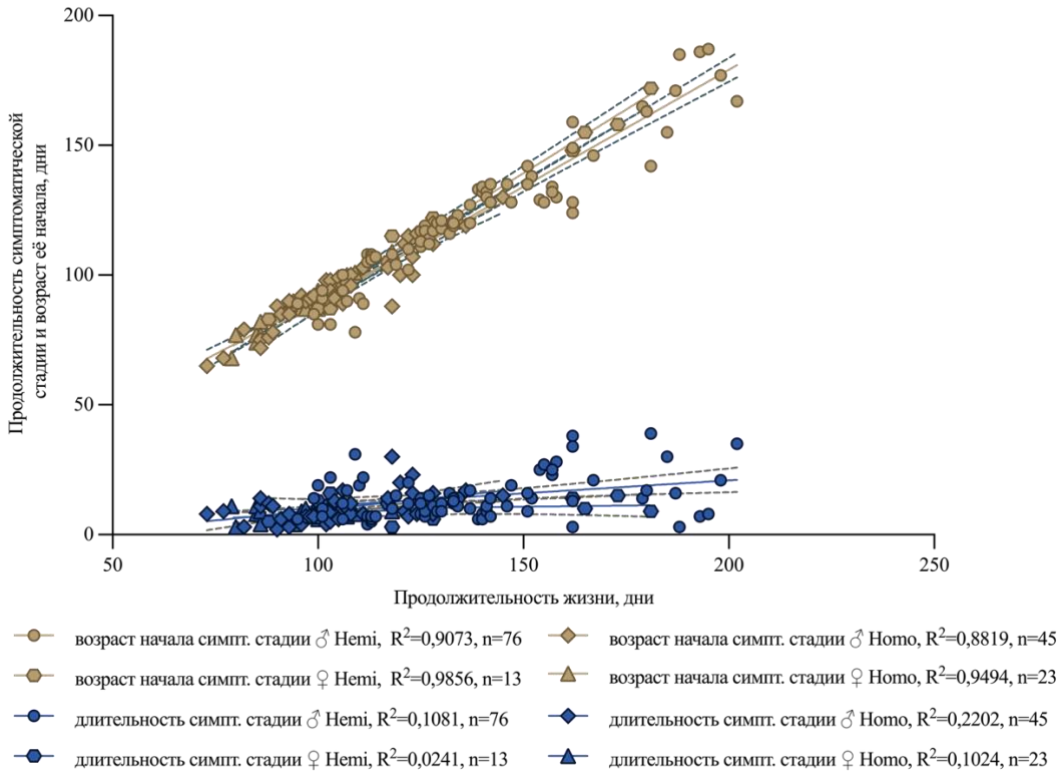


Рисунок 16 – Корреляционный анализ параметров симптоматической стадии с продолжительностью жизни у мышей S-FUS(1-359). Анализ для: гемизиготные самцы (n = 76) – возраст начала симптоматической стадии (R^2 = 0,91, p < 0,0001, r = 0,95) и длительность симптоматической стадии (R^2 = 0,11, p = 0,0037, r = 0,33); гомозиготные самцы (n = 44) – возраст начала (R^2 = 0,88, p < 0,0001, r = 0,94) и длительность (R^2 = 0,22, p = 0,0013, r = 0,47); гемизиготные самки (n = 13) – возраст начала (R^2 = 0,99, p < 0,0001, r = 0,99) и длительность (R^2 = 0,02, p = 0,61, r = 0,16); гомозиготные самки (n = 23) – возраст начала (R^2 = 0,95, p < 0,0001, r = 0,97) и длительность (R^2 = 0,10, p = 0,14, r = 0,32). Все корреляции приведены относительно общей продолжительности жизни

3.1.3 Динамика набора и потери массы тела у трансгенных животных

Для анализа динамики набора и потери массы тела у трансгенных животных использовался оригинальный подход: данные группировались не по возрасту, а по продолжительности наблюдения в исследованиях, начиная с момента включения животных в эксперимент. Такой метод позволил создать сравнительные группы животных разного возраста, но с одинаковой продолжительностью жизни в эксперименте. Для оценки изменений массы тела после начала симптоматической стадии данные были сгруппированы в соответствии с длительностью симптоматического периода для каждого животного (рисунок 17).

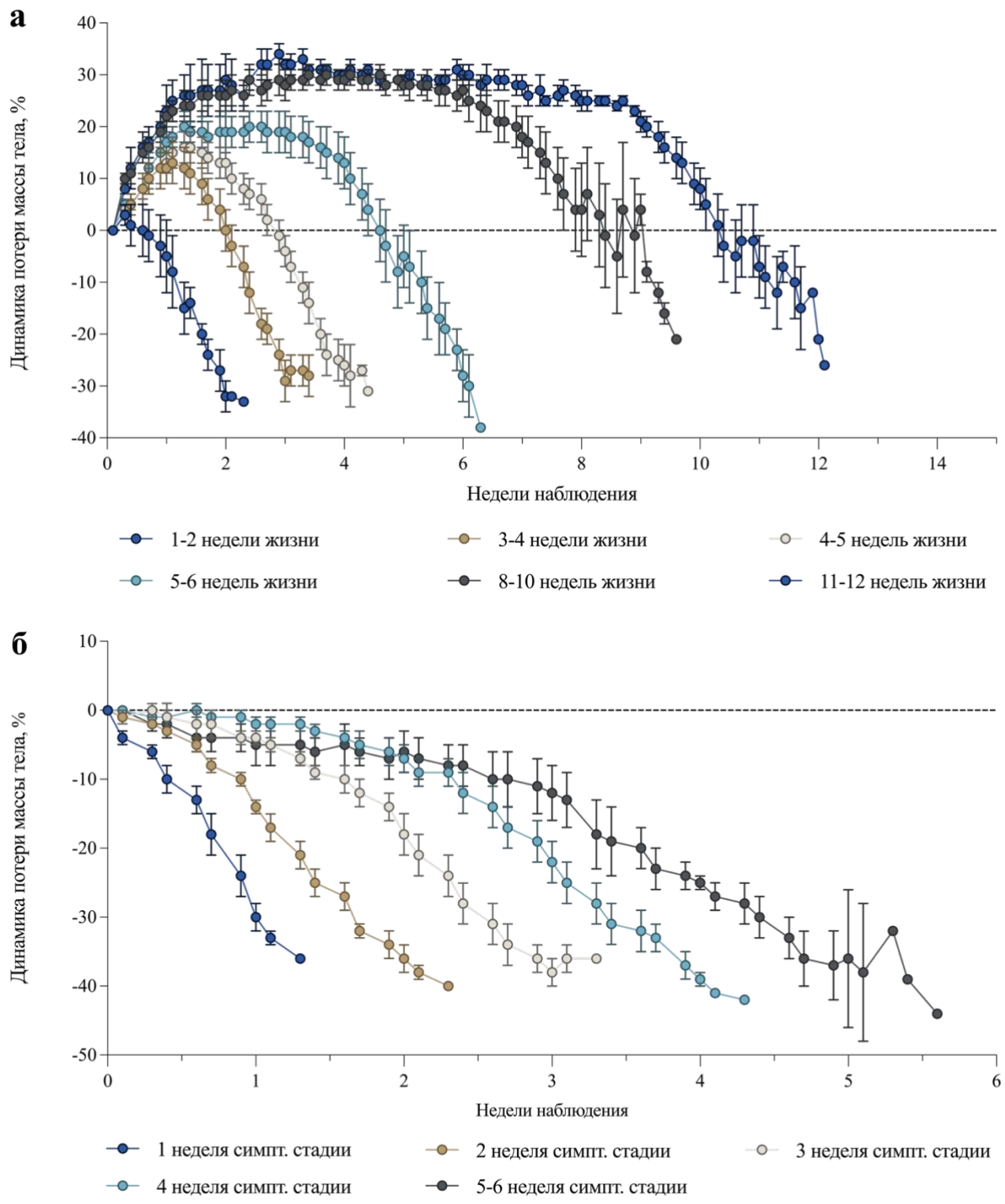


Рисунок 17 – Динамика изменения массы тела у животных S-FUS(1-359). Среднее значение ± SEM. **а.** Динамика набора и потери массы тела у модельных животных. **б.** Динамика потери массы тела у животных после появления симптомов

Состав исследовательских групп по продолжительности наблюдения включал (см. рисунок 17а):

- Группа 1–2 недели (n = 5): возраст 6 недель (n = 1), 9 недель (n = 3), 10 недель (n = 1)

- Группа 3–4 недели (n = 15): возраст 6 недель (n = 8), 7 недель (n = 1), 9 недель (n = 2), 10 недель (n = 3)
- Группа 4–5 недель (n = 14): возраст 6 недель (n = 5), 7 недель (n = 3), 9 недель (n = 2), 10 недель (n = 2), 11 недель (n = 1)
- Группа 5–6 недель (n = 8): возраст 6 недель (n = 4), 7 недель (n = 3), 11 недель (n = 1)
- Группа 8–10 недель (n = 7): возраст 6 недель (n = 2), 7 недель (n = 5)
- Группа 11–12 недель (n = 4): возраст 6 недель (n = 1), 9 недель (n = 2), 10 недель (n = 1)

Анализ потери массы после наступления симптоматической стадии до момента гибели животного (см. рисунок 17б):

- Группа длительность >1,4 недель (n = 11): возраст 6 недель (n = 3), 7 недель (n = 2), 9 недель (n = 3), 10 недель (n = 1), 11 недель (n = 1)
- Группа длительность >2,3 недель (n = 22): возраст 6 недель (n = 11), 7 недель (n = 4), 9 недель (n = 1), 10 недель (n = 6)
- Группа длительность >3,4 недель (n = 11): возраст 6 недель (n = 5), 7 недель (n = 3), 9 недель (n = 2), 11 недель (n = 1)
- Группа длительность >4,4 недель (n = 7): возраст 6 недель (n = 3), 7 недель (n = 4)
- Группа длительность >5,7 недель (n = 3): возраст 6 недель (n = 3)

Были проанализированы профили изменения массы тела в ключевые моменты: при включении в эксперимент, при начале симптоматической фазы и при гибели. Для животных, выключенных в 6 недель (n = 25): начальная масса 29,02 ± 0,63 (CO 3,15) г, при появлении симптомов 35,47 ± 0,74 (CO 3,68) г, перед гибелью 21,12 ± 0,40 (CO 2,02) г. Для животных 7 недель (n = 14): 26,41 ± 0,50 (CO 1,88) г, 32,11 ± 1,0 (CO 3,75) г и 19,91 ± 0,55 (CO 2,05) г, соответственно. Для животных 9 недель (n = 6): 29,97 ± 1,32 (CO 3,23) г, 28,02 ± 2,04 (CO 4,98) г и 19,47 ± 1,47 (CO 3,45) г. Для животных 10 недель (n = 8): 34,74 ± 0,69 (CO 1,97) г, 34,11 ± 0,62 (CO 1,97) г и 21,55 ± 0,51 (CO 1,44) г, соответственно (рисунок 18).

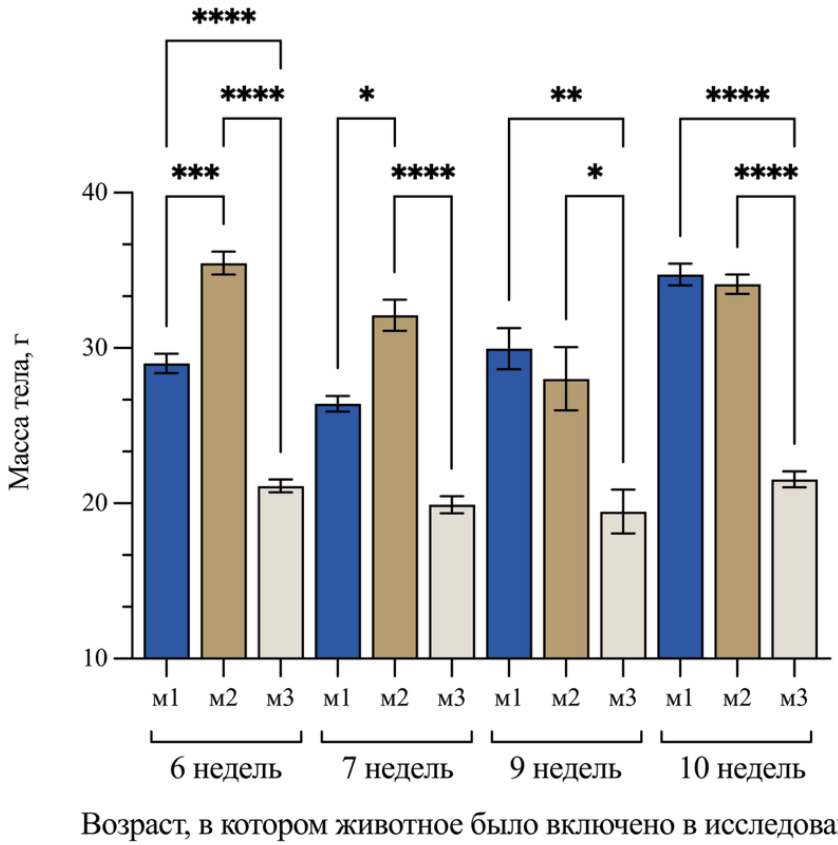


Рисунок 18 – Профиль набора и потери массы тела у гетерозиготных самцов. Ось x: м1 – масса тела при включении в исследование, м2 – масса при проявления двигательных нарушений, м3 – масса при гибели. Для животных, выключенных в исследование в возрасте 6 недель (n = 25), масса на момент включения – 29,02 ± 0,63 г (СО 3,15), начало симптоматической стадии – 35,47 ± 0,74 г (СО 3,68), на момент гибели – 21,12 ± 0,40 г (СО 2,02). 7 недель (n = 14): включение – 26,41 ± 0,50 г (СО 1,88), начало симптоматической стадии – 32,11 ± 1,0 г (СО 3,75), гибель – 19,91 ± 0,55 г (СО 2,05). 9 недель (n = 6): включение – 29,97 ± 1,32 г (СО 3,23), начало симптоматической стадии – 28,02 ± 2,04 г (СО 4,98), гибель – 19,47 ± 1,47 г (СО 3,45). 10 недель (n = 8): включение – 34,74 ± 0,69 г (СО 1,97), начало симптоматической стадии – 34,11 ± 0,62 г (СО 1,97), гибель – 21,55 ± 0,51 г (СО 1,44) (p = 0,0037, критерий Краскела-Уоллиса). Данные представлены как среднее значение ± SEM

3.1.4 Длительность и частота двигательных нарушений

БАС-подобный фенотип служит общим маркером дегенерации двигательных нейронов у трансгенных мышей и характеризуется четырьмя основными фенотипическими проявлениями – двигательными нарушениями (симптоматическая стадия). Были идентифицированы следующие фенотипические проявления, отражающие нарушения двигательных функций животного: ограниченная подвижность (ОП), парез (ПР), паралич (ПЧ) и скрюченные пальцы (СП). Распространённость этих нарушений составила: ОП у 72% животных, ПР у 68%, ПЧ у 46% и СП у 2% животных (рисунок 19).

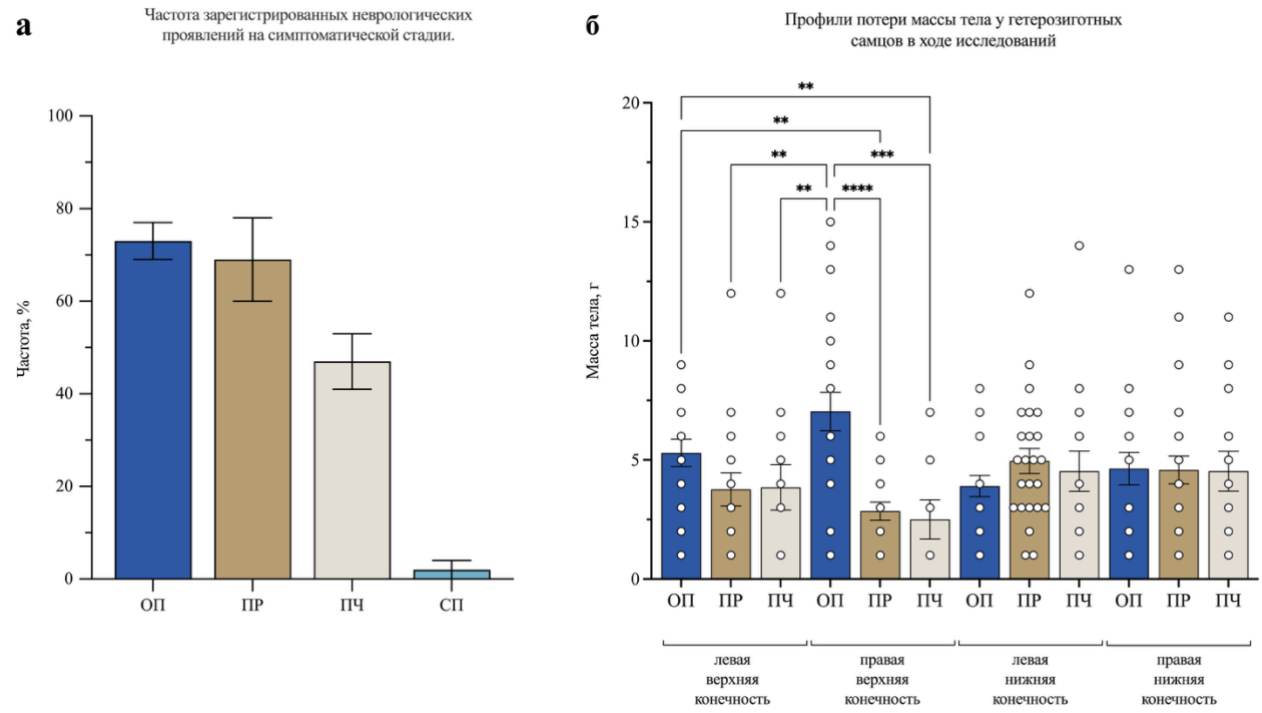


Рисунок 19 – Длительность и частота основных симптоматических проявлений БАС-подобного фенотипа. **а.** Частота регистрации неврологических проявлений на симптоматической стадии (%): ОП – ограниченная подвижность; ПР – парез; ПЧ – паралич; СП – скрюченные пальцы (n = 31). **б.** Продолжительность неврологических проявлений на симптоматической стадии для разных конечностей трансгенного животного (верхняя левая конечность: ОП n = 20, ПР n = 17, ПЧ n = 13; верхняя правая конечность: ОП n = 25, ПР n = 20, ПЧ n = 8; нижняя левая конечность: ОП n = 21, ПР n = 24, ПЧ n = 17; нижняя правая конечность: ОП n = 22, ПР n = 26, ПЧ n = 17; $p < 0{,}0037$, критерий Краскела-Уоллиса). Данные представлены как среднее значение ± SEM

ОП являлась первым патологическим признаком у большинства животных (85,4%, n = 48), тогда как ПЧ (89,3%) был последним регистрируемым двигательным нарушением (n = 28). Локализация двигательных нарушений демонстрировала следующее распределение: ограниченная подвижность левой передней конечности наблюдалась у 69% животных, правой передней конечности – у 75%, левой задней конечности – у 67% и правой задней конечности – у 77% (n = 48) (таблица 6).

Таблица 6 – Частота регистрации двигательных нарушений для отдельных конечностей (n = 48)

Двигательные нарушения	Левая передняя конечность	Правая передняя конечность	Левая задняя конечность	Правая задняя конечность
Ограниченная подвижность	69%	75%	67%	77%
Парез	52%	67%	77%	75%
Паралич	42%	31%	54%	56%

Продолжительность неврологических проявлений на симптоматической стадии была больше в передних конечностях. Для левой передней конечности средняя продолжительность

симптома ОП составила 5,3 ± 0,6 дня (n = 20, СО 2,58), средняя продолжительность симптома ПР – 3,8 ± 0,7 дня (n = 17, СО 2,86), а средняя продолжительность симптома ПЧ – 3,85 ± 0,95 дня (n = 13, СО 3,44). Для правой передней конечности средняя продолжительность симптома ОП составила 7,0 ± 0,8 дня (n = 25, СО 4,04), средняя продолжительность симптома ПР – 2,9 ± 0,4 дня (n = 20, СО 1,69), а средняя продолжительность симптома ПЧ – 2,5 ± 0,8 дня (n = 8, СО 2,33). Для левой задней конечности средняя продолжительность симптома ОП составила 3,9 ± 0,5 дня (n = 22, СО 2,05), средняя продолжительность симптома ПР – 5,0 ± 0,5 дня (n = 24, СО 2,58), а средняя продолжительность симптома ПЧ – 4,5 ± 0,9 дня (n = 17, СО 3,48). Для правой задней конечности средняя продолжительность симптома ОП составила 4,6 ± 0,7 дня (n = 22, СО 3,20), средняя продолжительность симптома ПР – 4,6 ± 0,6 дня (n = 26, СО 3,0), а средняя продолжительность симптома ПЧ – 4,5 ± 0,8 дня (n = 17, СО 3,45). Статистическая значимость различий в продолжительности двигательных нарушений между разными их типами и конечностями подтверждена (p = 0,0037, H (df 11)=27,61) (см. рисунок 19).

На терминальной стадии заболевания у 51,6% животных (n = 31) последним регистрируемым двигательным нарушением был парез или паралич двух конечностей. Паралич задних конечностей наблюдался у 23% животных перед гибелью. Парез или паралич одной конечности отмечался у 29% животных, тогда как поражение трёх или четырёх конечностей – у 19,4% мышей (таблица 7).

Таблица 7 – Неврологические проявления БАС-подобного фенотипа на терминальной стадии (n = 31)

Двигательные нарушения	**Доля животных**
Паралич задних конечностей	23%
Паралич правой передней конечности	13%
Паралич левой передней и левой задней конечностей	13%
Паралич всех конечностей	10%
Парез левой задней конечности	6%
Паралич левой передней и правой задней конечностей	6%
Паралич левой передней конечности и задних конечностей	3%
Паралич правой передней и правой задней конечностей	3%
Паралич левой задней конечности	3%
Ограниченная подвижность передних конечностей	3%
Парез правой задней конечности	3%
Паралич левой передней конечности	3%
Парез передних конечностей и левой задней конечности	3%
Паралич передних конечностей и правой задней конечности	3%
Паралич передних конечностей	3%

3.1.5 Модель S-FUS(1-359) в контексте существующих моделей БАС

Широкий арсенал доступных генетических моделей БАС ставит перед исследователями задачу выбора наиболее адекватной экспериментальной системы для решения конкретных

научных вопросов. Модель S-FUS(1-359) занимает в этом ряду определённую нишу, обладая специфическими преимуществами и ограничениями [274]. Наиболее часто используемой и исторически первой генетической моделью БАС является SOD1-G93A, основанная на сверхэкспрессии мутантной Cu/Zn супероксиддисмутазы [275]. Эта модель характеризуется развитием выраженного оксидативного стресса и быстро прогрессирующей нейродегенерацией, с медианой выживаемости 120–150 дней, демонстрируя высокую воспроизводимость фенотипа [276, 277]. Однако мутации в гене *SOD1* являются причиной ~20% случаев семейной формы БАС, а их патогенетический механизм (оксидативный стресс, ведущий к ЭПР стрессу) отличается от такового при большинстве других случаев заболевания [278]. S-FUS(1-359) моделирует иной ключевой механизм – протеинопатию РНК-связывающего белка, ассоциированную с ~5% случаев семейной формы БАС [67]. По сравнению с таргетными (knock-in) моделями FUS, которые экспрессируют мутантные гены на физиологическом уровне и часто демонстрируют мягкий, медленно прогрессирующий фенотип [279], модель со сверхэкспрессией укороченного *FUS* приводит к быстрому развитию выраженного БАС-подобного фенотипа. Медиана выживаемости гемизиготных животных в данном исследовании составила ~130-140 дней. Проведённый анализ позволяет определить ключевые нишевые преимущества модели S-FUS(1-359) в ряду других моделей БАС. Основное преимущество модели S-FUS(1-359) заключается в её высокой пригодности для доклинического скрининга. Воспроизводимый фенотип с чётко определённой симптоматической стадией (10-15 дней) позволяет эффективно оценивать терапевтические кандидаты. В этом отношении модель превосходит как knock-in модели FUS, так и модели на основе *TARDBP* (TDP-43) или *C9orf72*, которые часто характеризуются вариабельным и менее выраженным двигательным дефицитом [280, 281]. Кроме того, использование модели FUS-протеинопатии придаёт исследованию более универсальный характер по сравнению с моделями на основе мутаций, например, в *SOD1*. Поскольку патологическая агрегация РНК-связывающих белков (FUS, TDP-43, TAF15 и др.) лежит в основе не только семейных форм БАС, но и многих других нейродегенеративных заболеваний (ЛВД, БА, БП и др.), результаты, полученные на данной модели, могут быть экстраполированы на более широкий круг протеинопатий. Напротив, SOD1-опосредованная патология является высокоспецифичной для БАС и не отражает универсальных механизмов агрегации РНК-связывающих белков, что ограничивает трансляционный потенциал исследований, выполненных на SOD1-моделях.

Вместе с тем необходимо учитывать и ограничения модели: структурные отличия усечённой формы белка FUS от клинических миссенс-мутаций, потенциальные артефакты сверхэкспрессии, а также ограниченную релевантность для спорадического БАС, поскольку модель не воспроизводит его полигенный характер и не формирует TDP-43 патологию [68, 69].

3.1.6 Высокая индивидуальная вариабельность как свойство модели

Одной из наиболее значимых характеристик линии S-FUS(1-359), выявленной в данном исследовании, является выраженная индивидуальная вариабельность по всем ключевым параметрам: продолжительности жизни (от 80 до 245 дней у гемизиготных самцов), возрасту манифестации симптомов (от 70 до 217 дней) и длительности симптоматической стадии (от 7 до 42 дней). Важно подчеркнуть, что эта вариабельность наблюдалась на фоне стабильности медианных показателей сроков жизни и возраста наступления симптоматической фазы на протяжении 18 поколений животных, что свидетельствует о генетической стабильности линии в целом. Подобная гетерогенность, вероятно, отражает сложное взаимодействие различных генетических и эпигенетических факторов, модификаторов, влияющих на степень выраженности БАС-подобного фенотипа, невзирая на то, что данная модель находится в условиях контроля изменчивости условий среды и контроля генетического дрейфа. Все животные, данные которых вошли в исследование, независимо от года и когорты, содержались в строго стандартизированных условиях, свободных от специфических патогенов (SPF). Это обеспечивало постоянство ключевых параметров среды (таких как температура, влажность, цикл день/ночь, диета) и, как следствие, сводило к минимуму «средовой дрейф» на протяжении всего периода исследований. Для нивелирования эффекта «генетического дрейфа» использовалась специфическая стратегия разведения. Трансгенная линия S-FUS(1-359) поддерживалась на аутбредном генетическом фоне CD-1. Ключевым элементом было постоянное в каждом поколении проведение беккросса гемизиготных трансгенных самцов с самками CD-1 без модификаций генома. Эта стратегия обеспечивала постоянное обновление генетического фона, предотвращая фиксацию модифицирующих аллелей и эффективно нейтрализуя эффекты генетического дрейфа за счёт постоянного притока генетического разнообразия из аутбредной линии. Гетерогенность модели по основным физиологическим параметрам диктует специфические требования к планированию экспериментов: для получения статистически достоверных результатов необходимо использование больших размеров выборок, стратификация животных по пометам, полу и применение объективных инструментальных методов оценки неврологического статуса.

3.1.7 Прогностическая ценность возраста начала симптоматической стадии

Корреляционный анализ выявил очень сильную положительную связь между возрастом начала симптоматической стадии и общей продолжительностью жизни у всех генотипов и полов. Длительность симптоматической стадии демонстрировала лишь слабую и зачастую статистически незначимую корреляцию с продолжительностью жизни. Эти результаты указывают на то, что возраст начала симптомов имеет значительно большую прогностическую ценность в отношении продолжительности жизни, чем длительность самой симптоматической

стадии. Данная закономерность была последовательной независимо от пола животного или аллельного состояния трансгена. Полученные данные о ключевой роли возраста манифестации симптомов для прогноза выживаемости могут быть полезны для прогнозирования продолжительности жизни у данных трансгенных животных и изучения влияния терапевтических кандидатов на время наступления симптоматической фазы.

3.1.8 Влияние дозы трансгена и ограниченная роль пола

Полученные данные демонстрируют, что ключевым фактором, влияющим на тяжесть фенотипа, является доза трансгена, а не пол животного. Гомозиготные животные обоих полов имели достоверно более короткую продолжительность жизни и более раннее начало симптомов по сравнению с гемизиготами. В то же время, внутри групп с одинаковым аллельным статусом (гомо- или гемизиготы) достоверных различий между самцами и самками выявлено не было. Это указывает на то, что уровень синтеза патогенного белка FUS(1-359) является первичным драйвером скорости нейродегенерации, в то время как половые различия играют второстепенную роль в патогенезе в данной модели.

3.1.9 Динамика массы тела как отражение прогрессирования заболевания

Прогрессирующая потеря массы тела, достигающая в среднем 28,9% от исходного веса к моменту гибели, является универсальным и воспроизводимым признаком модели S-FUS(1-359). Характерная динамика, включающая первоначальный набор массы с последующим резким снижением после манифестации двигательных нарушений, коррелирует с аналогичными процессами у пациентов с БАС, где потеря веса является независимым негативным прогностическим фактором [282, 283]. Основными причинами данного явления у модельных животных могут служить дисфагия, усиливающаяся по мере прогрессирования двигательных нарушений (на терминальной стадии животное теряет способность подниматься для потребления корма и воды), а также ускоренная потеря мышечной и жировой ткани, связанная с нарушениями липидного метаболизма [284, 285]. Данный параметр может служить удобным и объективным маркером для оценки эффективности терапевтических интервенций в рамках доклинических исследованиях.

3.1.10 Экспрессия трансгена FUS и генов маркеров нейровоспаления и нейропластичности

Экспрессия трансгена FUS(1-359) была обнаружена в спинном мозге, гиппокампе, префронтальной коре и среднем мозге ($p < 0,0001$). Максимальная экспрессия трансгена в среднем мозге (в 14 раз выше, чем в спинном мозге, и в 75 раз выше, чем в гиппокампе и префронтальной коре) была связана с дозозависимым градиентом нейротоксичности (рисунок 20).

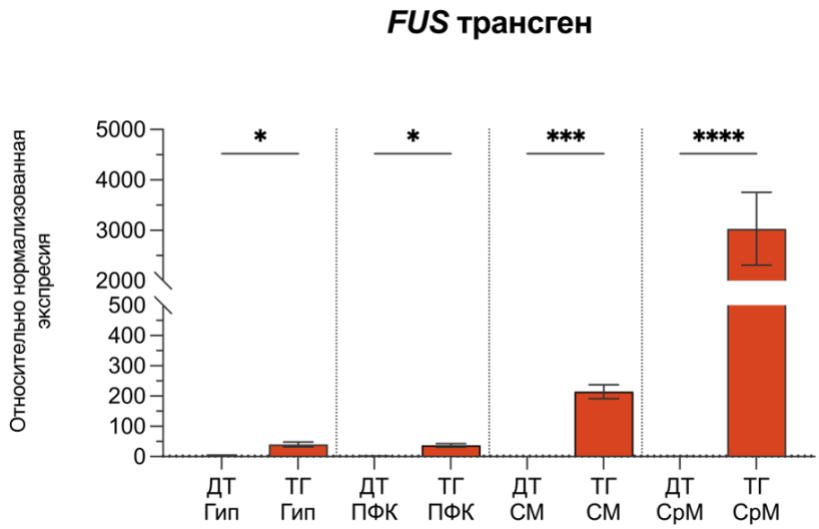


Рисунок 20 – Относительная нормализованная экспрессия трансгена FUS(1-359) в различных отделах ЦНС у гемизиготных самцов S-FUS(1-359). Экспрессия трансгена FUS(1-359) выявлена во всех отделах ЦНС ($p < 0{,}0001$). Гиппокамп ДТ n = 6, ТГ n = 9; префронтальная кора ДТ n = 6, ТГ n = 9; спинной мозг ДТ n = 6, ТГ n = 9; средний мозг ДТ n = 6, ТГ n = 9. Данные представлены как среднее значение ± SEM. ДТ – дикий тип, ТГ – трансгенные животные S-FUS(1-359), Гип – гиппокамп, ПФК – префронтальная кора, СМ – спинной мозг, СрМ – средний мозг. Значимые различия между ДТ и ТГ, * $p < 0{,}05$, *** $p < 0{,}001$, **** $p < 0{,}0001$, критерий Краскела-Уоллиса

Наблюдаемая региональная специфичность экспрессии экзогенного *FUS* с наиболее высокими уровнями в среднем мозге по сравнению со спинным мозгом может отражать клеточный состав этих отделов ЦНС. Средний мозг содержит большое количество тел нейронов, где происходит активная транскрипция, тогда как анализируемая ткань шейного отдела спинного мозга состоит преимущественно из нейрональных отростков. Это нейроанатомическое различие, вероятно, вносит вклад в наблюдаемый градиент экспрессии.

Повышение *Gfap* (маркера астроглиоза) наблюдалось только в спинном мозге ($p = 0{,}01$). Несмотря на относительно более низкую экспрессию *FUS* в спинном мозге по сравнению со средним мозгом, повышение *Gfap* в спинном мозге позволяет предположить астроглиоз без значимого повышения *IL-6* или *TNFα* и может указывать на защитную функцию астроцитов [286]. В среднем мозге агрегация FUS(1-359) может активировать астроциты через NF-κB, что приводит к секреции провоспалительных цитокинов IL6 и TNFα [287, 288]. Действительно, повышение *Tnf alpha* и *Il6* наблюдалось только в гиппокампе и среднем мозге ($p = 0{,}0023$ и $p = 0{,}0004$ соответственно), тогда как значимого повышения *Bdnf* или гена *Gsk3* не наблюдалось (рисунок 21).

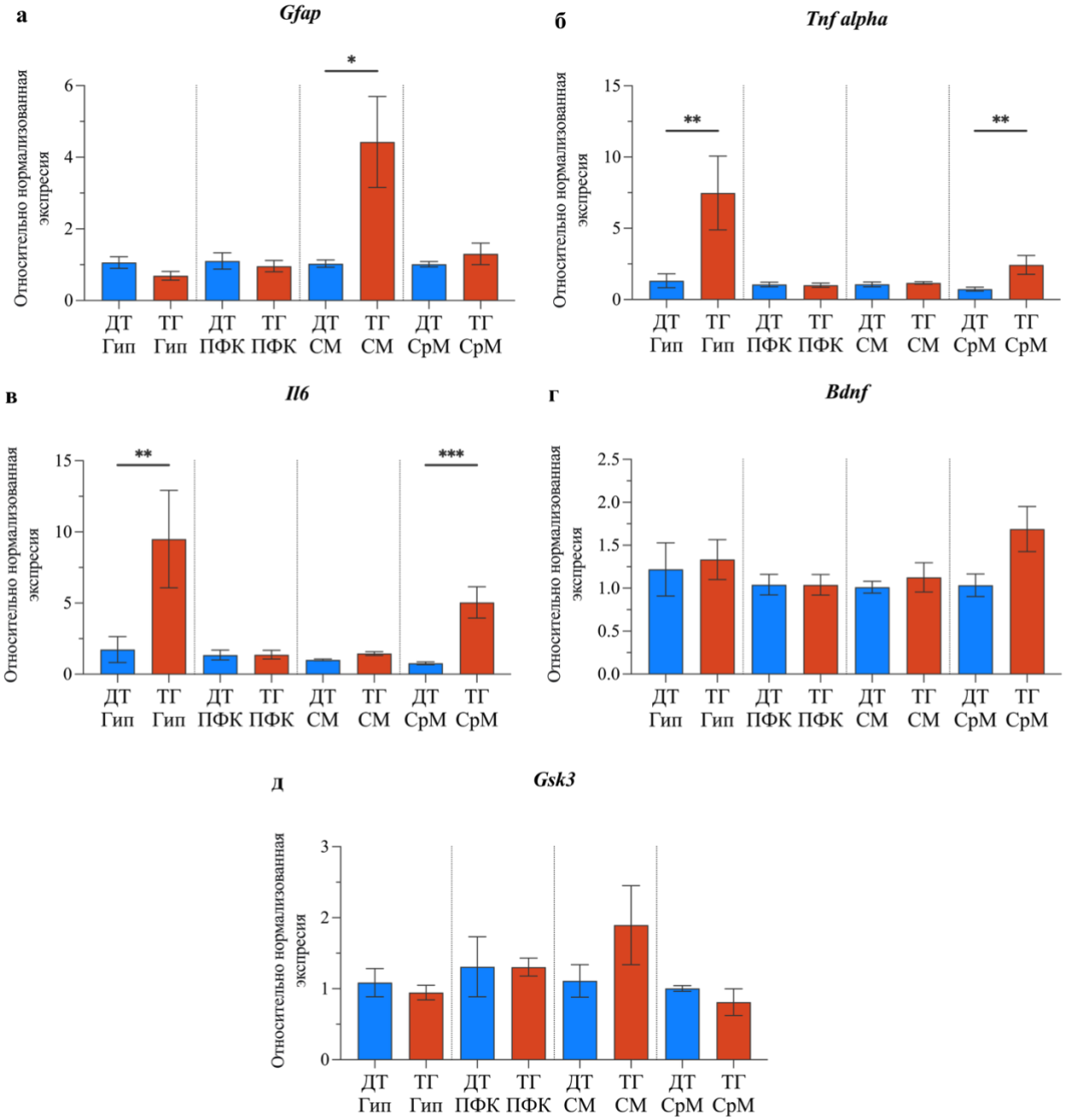


Рисунок 21 – Относительная нормализованная экспрессия маркеров нейровоспаления, нейропластичности и регуляции сигнальных путей в различных отделах ЦНС у гемизиготных самцов S-FUS(1-359). **а.** *Gfap* (ДТ Гип n = 6, ТГ Гип n = 9; ДТ ПФК n = 5, ТГ ПФК n = 9; ДТ СМ n = 6, ТГ СМ n = 9; ДТ СрМ n = 6, ТГ СрМ n = 8; p = 0,01). **б.** *Tnf alpha* (ДТ n = 6, ТГ n = 9; ДТ СрМ n = 5, ТГ СрМ n = 9; p = 0,0023). **в.** *Il6* (ДТ n = 6, ТГ n = 9; ДТ СрМ n = 5, ТГ СрМ n = 9; p = 0,0004). **г.** *Bdnf* (ДТ n = 6, ТГ n = 9; p = 0,52). **д.** *Gsk3* (ДТ n = 6, ТГ n = 9; ДТ СМ n = 6, ТГ СМ n = 8; p = 0,18). Для (а)-(г) применяли критерий Краскела-Уоллиса, (д) обычный дисперсионный анализ (ANOVA). Данные представлены как среднее значение ± SEM. ДТ – дикий тип, ТГ – трансгенные животные S-FUS(1-359), Гип – гиппокамп, ПФК – префронтальная кора, СМ – спинной мозг, СрМ – средний мозг. Значимые различия между ДТ и ТГ, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

3.1.11 Экспрессия генов, регулирующих апоптоз, иммунный ответ и внутриклеточную сигнализацию

Помимо маркеров нейровоспаления и нейропластичности, был проанализирован ряд генов, регулирующих апоптоз, иммунный ответ и внутриклеточную сигнализацию. Снижение *Casp3* наблюдалось в гиппокампе и среднем мозге, при этом в спинном мозге отмечалась тенденция к повышению экспрессии (p = 0,0015). Снижение *Casp3* в гиппокампе и среднем мозге (рисунок 22а) могло бы указывать на возможный сдвиг от апоптоза к другим путям клеточной смерти, таким как некроз, что согласовалось бы с наблюдаемой митохондриальной дисфункцией [289]. Однако эта интерпретация остаётся гипотетической и требует дальнейшей проверки путём прямой оценки маркеров, специфичных для некроптоза. Значимых изменений уровня *Puma* не наблюдалось (рисунок 22б), также не было обнаружено статистически значимых изменений *Trem2* и *Stat3* в спинном мозге (рисунок 22в).

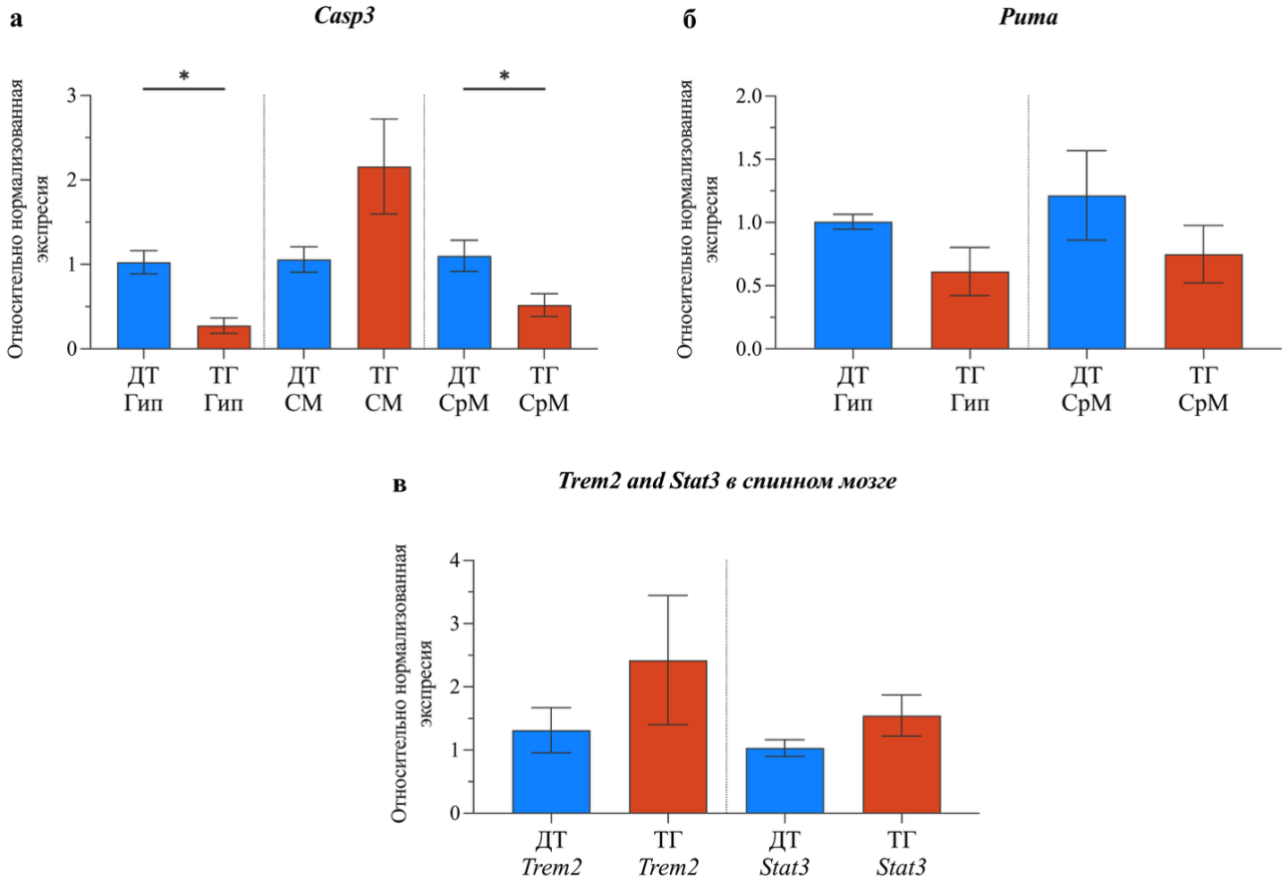


Рисунок 22 – Относительная нормализованная экспрессия генов, регулирующих апоптоз, иммунный ответ и внутриклеточную сигнализацию, в различных отделах ЦНС у гемизиготных самцов S-FUS(1-359). **а.** *Casp3* (ДТ Гип n = 4, ТГ Гип n = 8; ДТ СрМ n = 6, ТГ СрМ n = 8; ДТ СМ n = 6, ТГ СМ n = 9; p = 0,0015). **б.** *Puma* (ДТ Гип n = 4, ТГ Гип n = 9; ДТ СрМ n = 6, ТГ СрМ n = 6; p = 0,26). **в.** *Trem2* и *Stat3* в спинном мозге (ДТ Trem2/Stat3 n = 6; ТГ Trem2/Stat3 n = 9; p = 0,93). Данные представлены как среднее значение ± SEM. ДТ – дикий тип, ТГ – трансгенные животные S-FUS(1-359), Гип – гиппокамп, СМ – спинной мозг, СрМ – средний мозг. Значимые различия между группами ДТ и ТГ, * $p < 0,05$, критерий Краскела-Уоллиса

Таким образом, в спинном мозге трансгенных животных не выявлено значимых изменений экспрессии генов, связанных с апоптозом (*Puma*), микроглиальной активацией (*Trem2*) и JAK/STAT-сигналингом (*Stat3*), тогда как в гиппокампе и среднем мозге наблюдается снижение экспрессии ключевого эффектора апоптоза (*Casp3*). Это указывает на региональные различия в молекулярных механизмах FUS-протеинопатии. Полученные данные согласуются с известной ролью *Trem2* в микроглиальном ответе и *Stat3* в регуляции нейровоспаления [290, 291] и контрастируют с результатами, полученными на модели SOD1-G93A, где JAK/STAT-сигналинг рассматривается как терапевтическая мишень [292].

3.1.12 Анализ состояния дофаминовой системы

Агрегация мутантного FUS запускает каскад дозозависимых событий – чем выше концентрация белка, тем больше степень клеточного стресса [140, 293]. Агрегация FUS нарушает ядерный транспорт и усиливает окислительный стресс, что особенно критично для нейронов с высокой метаболической активностью [287, 294]. Поскольку средний мозг богат телами дофаминовых нейронов, было проанализировано состояние дофаминовой системы в дорсальном стриатуме – основной проекционной области этих нейронов. Ранее в модели FUS-протеинопатии были описаны нарушения электроэнцефалограммы, связываемые с дисфункцией дофаминовой системы [289], что делает анализ дофаминового обмена логичным дополнением к фенотипической характеристике линии.

У трансгенных животных по сравнению с животными дикого типа было выявлено значимое повышение уровня дофамина (ДА) (p = 0,04), 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) (p = 0,01), гомованилиновой кислоты (ГВК) (p = 0,03) и 3-метокситирамина (3-МТ) (p = 0,04) в стриатуме. При этом отношение (ДОФУК+ГВК)/ДА не изменялось (p = 0,14), что может указывать на сохранный метаболический баланс дофамина в обеих группах. Концентрация серотонина (5-НТ) в стриатуме оставалась неизменной (p = 0,39) (рисунок 23).

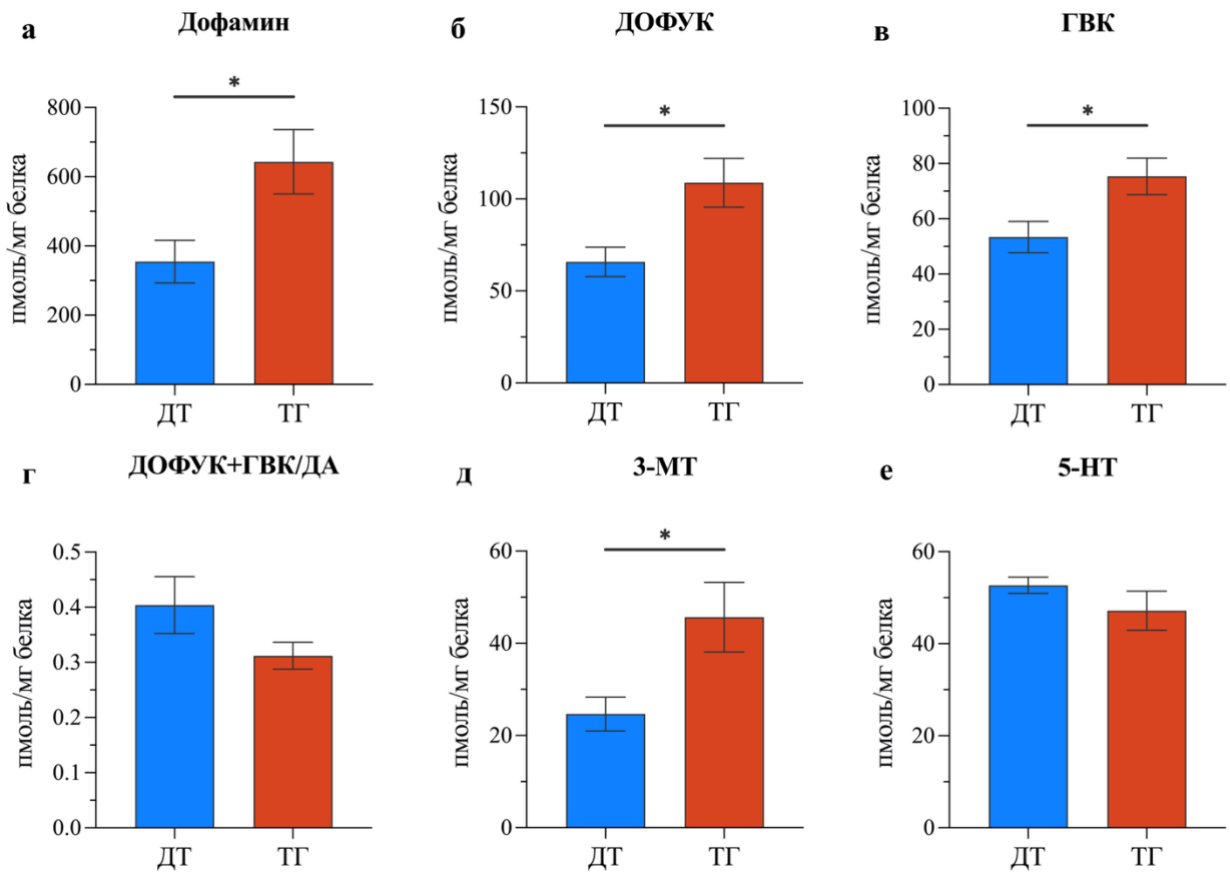


Рисунок 23 – Изменение концентрации дофамина, его метаболитов и серотонина в стриатуме, отношения (ДОФУК+ГВК)/ДА, отражающего активность метаболизма дофамина, у гемизиготных самцов S-FUS(1-359). **а.** Концентрация дофамина (ДА) в стриатуме животных дикого типа (ДТ) и трансгенных (ТГ) (ДТ n = 9, ТГ n = 9; p = 0,04). **б.** 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота (ДОФУК) (ДТ n = 9, ТГ n = 9; p = 0,01). **в.** гомованилиновая кислота (ГВК) (ДТ n = 9, ТГ n = 9; p = 0,03). **г.** Отношение (ДОФУК+ГВК)/ДА (ДТ n = 9, ТГ n = 9; p = 0,14). **д.** 3-метокситирамин (3-МТ) (ДТ n = 9, ТГ n = 9; p = 0,04). **е.** Серотонин (5-НТ) (ДТ n = 9, ТГ n = 9; p = 0,39). Данные представлены как среднее значение ± SEM. ДТ – дикий тип; ТГ – трансгенные животные S-FUS(1-359). Значимые различия между группами ДТ и ТГ, * $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни

Среди генов ферментов метаболизма дофамина значимое снижение экспрессии было отмечено только для *Maob* (p = 0,01), тогда как *Maoa*, *Comt*, *Th* и *Aldh1a1* не различалась между группами (рисунок 24).

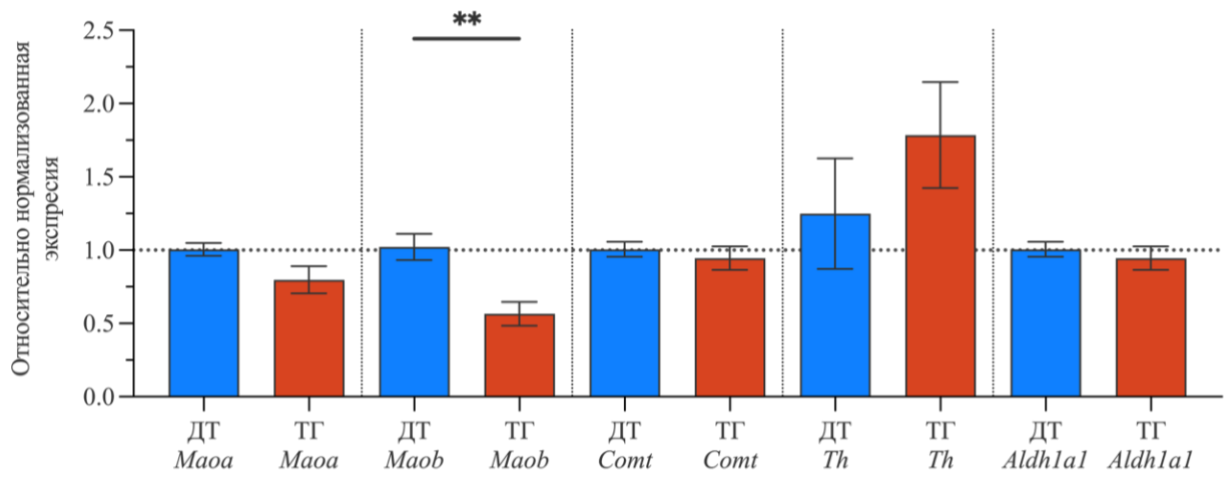


Рисунок 24 – Экспрессия генов метаболизма дофамина в среднем мозге у гемизиготных самцов S-FUS(1-359). Относительная нормализованная экспрессия генов моноаминоксидазы А (*Maoa*) (ДТ n = 6, ТГ n = 8; p = 0,15), моноаминоксидазы В (*Maob*) (ДТ n = 6, ТГ n = 8; p = 0,01), катехол-О-метилтрансферазы (*Comt*) (ДТ n = 6, ТГ n = 8; p = 0,70), тирозингидроксилазы (*Th*) (ДТ n = 6, ТГ n = 8; p = 0,20) и альдегиддегидрогеназы 1А1 (*Aldh1a1*) (ДТ n = 6, ТГ n = 8; p = 0,71). Данные представлены как среднее ± SEM. ДТ – дикий тип; ТГ – трансгенные животные S-FUS(1-359). ** $p < 0,01$, критерий Краскела-Уоллиса

Полученные данные позволяют предположить, что в модели S-FUS(1-359) развивается регион-специфичная дисрегуляция дофаминовой системы. Повышение уровня ДА и его метаболитов при стабильном соотношении «метаболиты/ДА» может отражать увеличение оборота дофамина, а не первичный дефект ферментов деградации. Снижение *Maob* в среднем мозге, где экспрессия трансгена максимальна, согласуется с гипотезой о снижении тонического ГАМК-торможения дофаминовых нейронов. МАО-В в астроцитах участвует в превращении путресцина в ГАМК, и его дефицит может способствовать снижению тонического торможения через ГАМК-А рецепторы и гиперактивации нейронов [295, 296]. Накопление ДА в синаптической щели может приводить к его самоокислению с образованием токсичных о-хинонов и аминохромов, генерирующих окислительный стресс и нарушающих функцию митохондрий [297, 298]. Стабильная экспрессия *Maoa* и *Comt* не позволяет связывать накопление ДА с изменениями этих ферментов (см. рисунок 21). Увеличение уровня 3-МТ, вторичного метаболита дофамина, почти вдвое у трансгенных животных при неизменном *Comt* может объясняться избытком субстрата – ДА, доступного для метилирования [295, 296, 298]. Неизменный уровень серотонина (5-НТ) подтверждает специфичность изменений для дофаминовой системы [295]. Повышение метаболитов ДА (ДОФУК, ГВК, 3-МТ) при стабильном уровне *Comt* и *Aldh1a1*, а также отсутствие сдвигов метаболического баланса ДА могут указывать на возможную ключевую роль окислительного стресса в нейрональной дисфункции, а не на первичное нарушение ферментов метаболизма [298]. Однако эти интерпретации остаются гипотетическими и требуют дальнейшей проверки, включая измерение активности ферментов, уровня белка и прямую оценку окислительного стресса.

3.1.13 Истощение шаперонной системы на симптоматической стадии FUS-протеинопатии

Для оценки состояния эндогенной шаперонной системы в динамике FUS-протеинопатии был проанализирован профиль дифференциальной экспрессии генов белков теплового шока (HSP) в головном мозге мышей S-FUS(1-359). Попарные сравнения проводили для трёх групп: животные дикого типа (WT, 120 дней против 60 дней, интактные мыши), трансгенные животные S-FUS(1-359) (FUS (Presympt.), 90 дней против 60 дней, трансгенные мыши до манифестации) и трансгенные животные S-FUS(1-359) (FUS (Sympt.), 120 дней против 90 дней, трансгенные мыши после появления симптомов). Результаты представлены на рисунке 25.

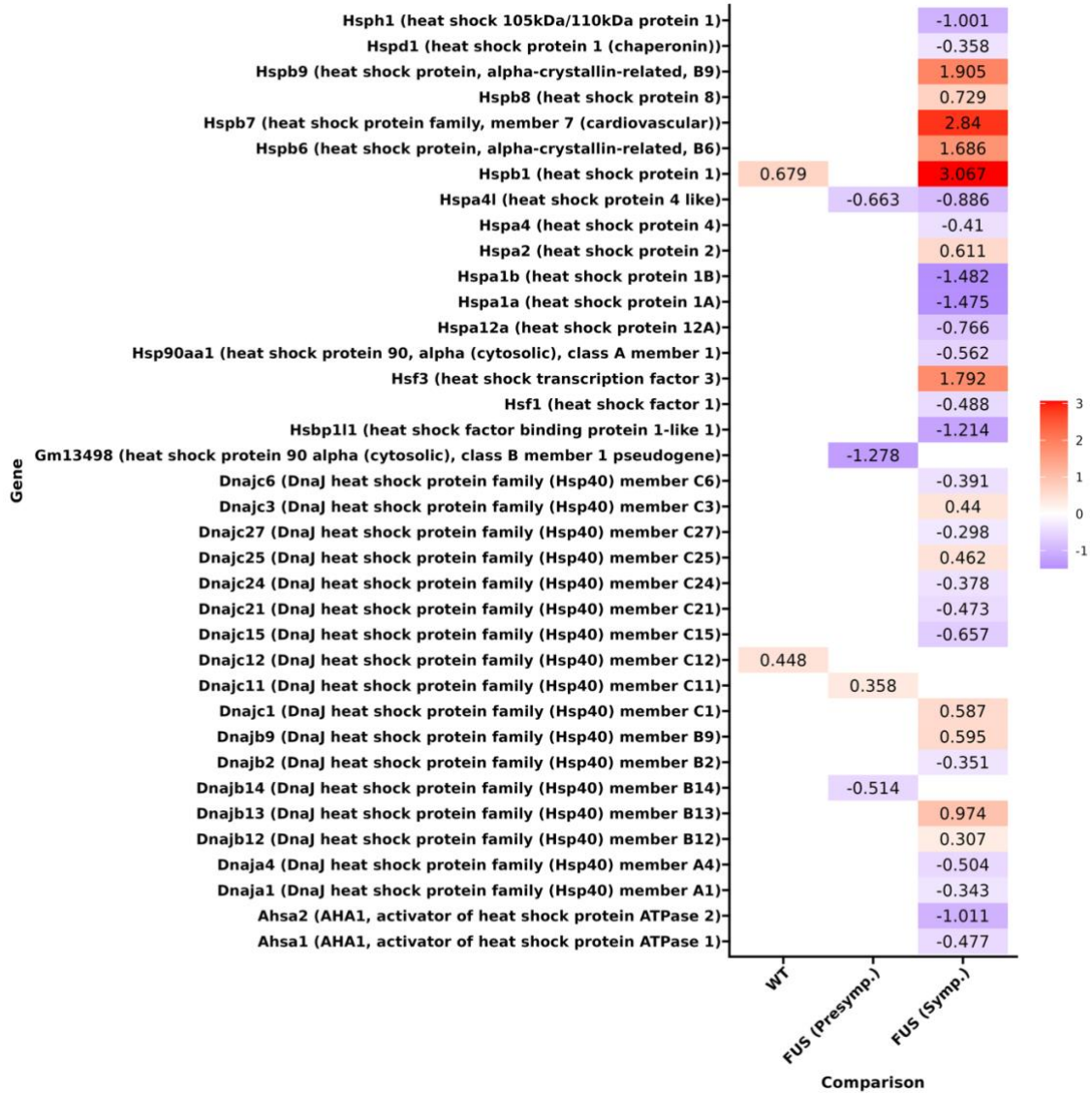


Рисунок 25 – Анализ дифференциальной экспрессии генов *Hsp* в спинном мозге мышей S-FUS(1-359). Значения цветов на тепловой карте отражают изменение экспрессии, представленное как логарифм по основанию 2 от кратного изменения (Log2FC). Попарные сравнения: Дикий тип (WT), 120 дней относительно 60 дней; Пресимптоматические трансгенные животные (FUS (presymp)), 90 дней относительно 60 дней; Трансгенные животные с выраженной симптоматикой (FUS (symp)), 120 дней относительно 60 дней

Наиболее значимые изменения затрагивают семейство Hsp70 (70 кДа). Гены *Hspa4, Hspa1a, Hspa1b и Hspa4l* демонстрируют преимущественное снижение экспрессии на симптоматической стадии (120 дней) у FUS-мышей; *Hspa4l* снижен уже на пресимптоматической стадии (90 дней). Для *Hspa2* отмечены разнонаправленные изменения. Сходная динамика наблюдается и для других семейств: экспрессия *Hspd1* (Hsp60)*, Hsp90aa1* (Hsp90) *и Hsph1* (Hsp110) также снижена на симптоматической стадии. Представители семейства *Dnaj* (Hsp40) меняются преимущественно на 120 днях, при этом одни гены активируются, другие подавляются. Гены малых HSP (*Hspb1, Hspb6, Hspb7, Hspb9*) в основном повышены, что может отражать компенсаторную активацию. Таким образом, по мере прогрессирования FUS-протеинопатии наблюдается выраженное истощение эндогенной шаперонной системы, в первую очередь снижение экспрессии генов семейства Hsp70 на симптоматической стадии. Это указывает на утрату шаперонной защиты по мере прогрессирования модельного заболевания и создаёт теоретическое обоснование для терапевтического вмешательства, направленного на экзогенное повышение уровня Hsp70. Эти данные согласуются с гипотезой о том, что rAAV-опосредованная доставка гена *HSPA1A* способна компенсировать дефицит шаперонной защиты и замедлить модельный нейродегенеративный процесс.

Краткие выводы по главе 3.1

1. **Проведён комплексный ретроспективный фенотипический анализ трансгенной линии S-FUS(1-359) на репрезентативной выборке (n = 505, поколения 2015–2024 гг.).** Показана стабильность медианных показателей продолжительности жизни (126–148 дней) и возраста начала симптоматической стадии (115–135 дней) при значительной индивидуальной вариабельности, что подтверждает генетическую стабильность модели и необходимость использования больших выборок в доклинических исследованиях.

2. **Установлена ключевая прогностическая ценность возраста начала симптоматической стадии.** Выявлена сильная положительная корреляция между возрастом дебюта симптомов и общей продолжительностью жизни (R2=0,91–0,99, $p < 0,0001$), тогда как длительность симптоматической стадии коррелирует с выживаемостью слабо (R2=0,02–0,22). Это определяет возраст начала симптомов как основной предиктор выживаемости

3. **Показано, что доза трансгена (гомозиготность и гемизиготность) является ведущим фактором тяжести БАС-подобного фенотипа, тогда как влияние пола ограничено.** Гомозиготные животные обоих полов имеют достоверно более короткую продолжительность жизни и более раннее начало симптомов по сравнению с гемизиготами, тогда как внутри групп с одинаковым аллельным статусом половых различий не выявлено.

4. **Охарактеризована динамика массы тела как объективный маркер прогрессирования заболевания.** Прогрессирующая потеря массы тела достигает в среднем

28,9% от максимального веса к моменту гибели. Показано, что потеря веса начинается после манифестации двигательных нарушений, что отражает сочетание дисфагии и системных метаболических нарушений.

5. **Детально описана частота, локализация и длительность основных двигательных нарушений (ограниченная подвижность – 72%, парез – 68%, паралич – 46%).** Наиболее длительные нарушения регистрируются на передних конечностях (медиана 6 дней для ограниченной подвижности). Терминальная стадия в 51,6% случаев характеризуется парезом или параличом двух конечностей, что подтверждает быстрое прогрессирование заболевания.

6. **Подтверждена высокая индивидуальная вариабельность модели по всем ключевым параметрам.** Продолжительность жизни от 80 до 245 дней, возраст начала симптомов от 70 до 217 дней, длительность симптоматической стадии от 7 до 42 дней при стабильности медианных показателей на протяжении 18 поколений. Это диктует необходимость стратификации животных по помётам и использования объективных инструментальных методов оценки при проведении терапевтических исследований.

7. **Для трансгенной линии S-FUS(1-359) характерна выраженная региональная гетерогенность молекулярных изменений**. Нейровоспаление и окислительный стресс доминируют в среднем мозге, где экспрессия трансгена максимальна, тогда как в спинном мозге преобладает астроглиоз без выраженного цитокинового ответа, а признаки апоптоза не выявляются. Это указывает на регион-специфичные механизмы нейродегенерации и сопровождается дисрегуляцией дофаминовой системы, проявляющейся накоплением дофамина и его метаболитов в стриатуме на фоне снижения *Maob*.

8. Анализ экспрессии генов семейства Hsp на основе данных РНК-секвенирования выявил на симптоматической стадии FUS-протеинопатии снижение экспрессии генов семейства Hsp70 (в том числе *Hspa1a*), а также Hsp60, Hsp90 и Hsp110, что свидетельствует об истощении эндогенной шаперонной системы и обосновывает терапевтическую стратегию экзогенного повышения Hsp70.

3.2 Получение вирусного препарата и его верификация

Для получения рекомбинантных AAV-векторов сначала были сконструированы и верифицированы плазмидные конструкции, несущие последовательность гена с меткой FLAG HSPA1A-3xFLAG, далее была проведена ко-трансфекция компетентных клеток для наработки вирусных частиц и на финальном этапе их очистка, как схематично изображено на рисунке 26.

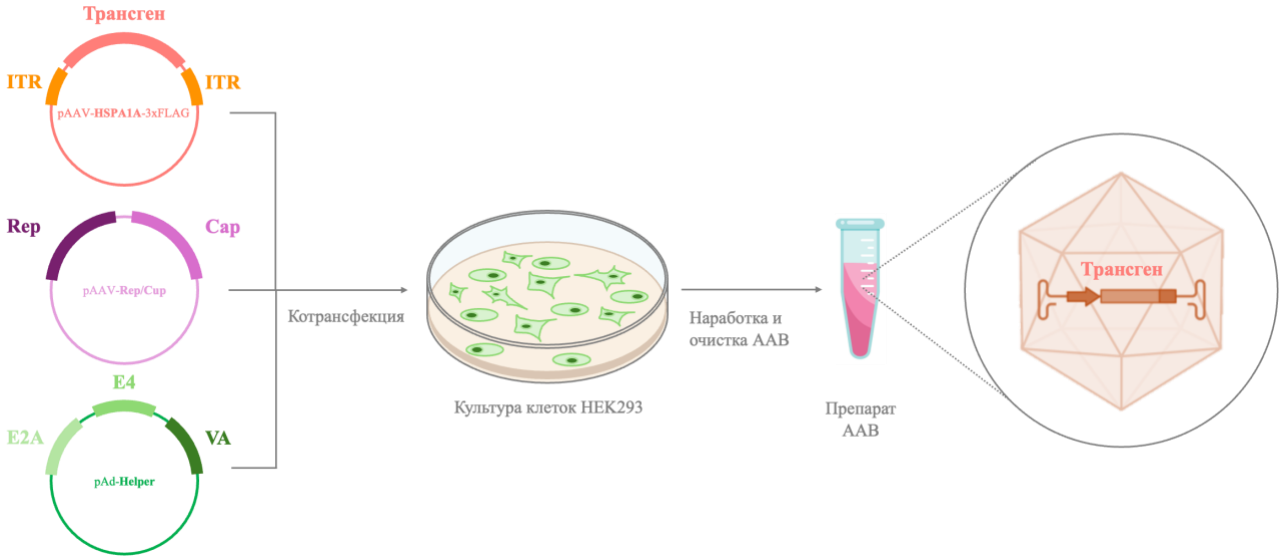


Рисунок 26 – Схематичное изображение этапов получения препарата rAAV-Hsp70

3.2.1 Получение конструкции pAAV-CASI-HSPA1A-3xFLAG-WPRE

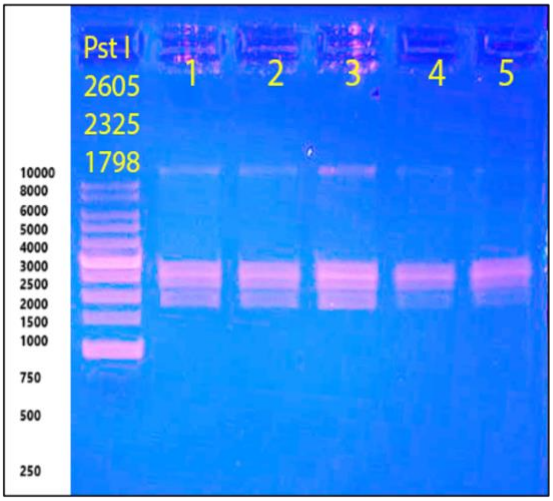
Плазмида pAAV-CASI-HSPA1A-3xFLAG-WPRE получена методом рестрикционного клонирования. Из акцептора pAAV-CASI-mcs-WPRE (обработка XbaI и HincII) выделен фрагмент 4710 п.н., из донора pHSPA1A-3xFLAG (XbaI и PmeI) – фрагмент вставки 2018 п.н. После лигирования и трансформации *E. coli* DH5α получены ампициллин-резистентные клоны. Эффективность трансформации – 10^7–10^8 КОЕ/мкг pBluescript II SK.

Плазмидная ДНК из пяти отобранных клонов проанализирована рестрикцией PstI. Теоретические фрагменты рассчитаны в программе Genious. Плазмида pAAV-CASI-HSPA1A-3xFLAG-WPRE успешно собрана; рестрикционный анализ пяти независимых клонов подтвердил наличие целевой вставки. На электрофореграмме все пять клонов дают фрагменты ожидаемого размера, что подтверждает наличие вставки (рисунок 27).

а

Document Name	Fragment length ▼	Start enzyme	End enzyme
pAAV-CASI-HSPA1A-3xFLAG-WPRE	2605	PstI	PstI
pAAV-CASI-HSPA1A-3xFLAG-WPRE	2325	PstI	PstI
pAAV-CASI-HSPA1A-3xFLAG-WPRE	1798	PstI	PstI

б



в

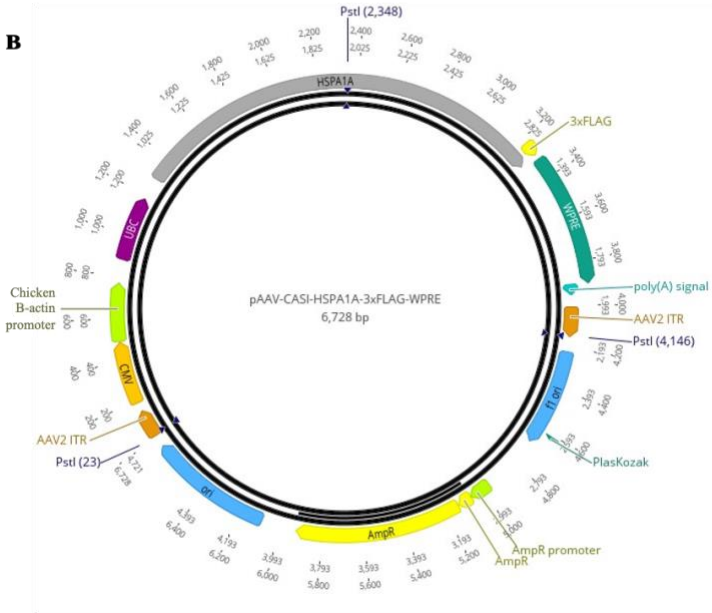


Рисунок 27 – Получение плазмидной конструкции pAAV-CASI-HSPA1A-3xFLAG-WPRE. **а.** Фрагменты, рассчитанные с помощью программы Genious. **б.** Электрофореграмма плазмидной ДНК клонов pAAV-CASI-HSPA1A-3xFLAG-WPRE после обработки эндонуклеазой рестрикции PstI. **в.** Схема pAAV-CASI-HSPA1A-3xFLAG-WPRE с отмеченными рестрикционными сайтами. AmpR – ген устойчивости к ампициллину; Amp prom – промотер гена ампициллина; ori, f1 ori – бактериальные репликативно-компетентные участки; LAAV2-ITR, RAAV2-ITR – левый и правый инвертированные концевые повторы аденоассоциированного вируса человека 2-го серотипа; CMV – промотер цитомегаловируса человека; Chicken β-actin promoter – промотер β-актина курицы; UBC – убиквитиновый промотер человека; *HSPA1A* – вставка целевого гена белка теплового шока Hsp70; 3xFLAG – метка FLAG-эпитопа; WPRE – посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка; poly(A) signal – сигнал полиаденилирования

3.2.2 Очистка плазмидной ДНК

Штамм-продуцент *E. coli* культивировали в 500 мл среды 2xYT с амоксициклином (19 ч, 37°C, 210 об/мин). Бактериальный осадок отделён центрифугированием (10 000 g, 7 мин). После щелочного лизиса и центрифугирования получен осветлённый лизат. При гель-фильтрации на Sepharose 6FF целевая фракция собрана при 50 mAU (рисунок 28).

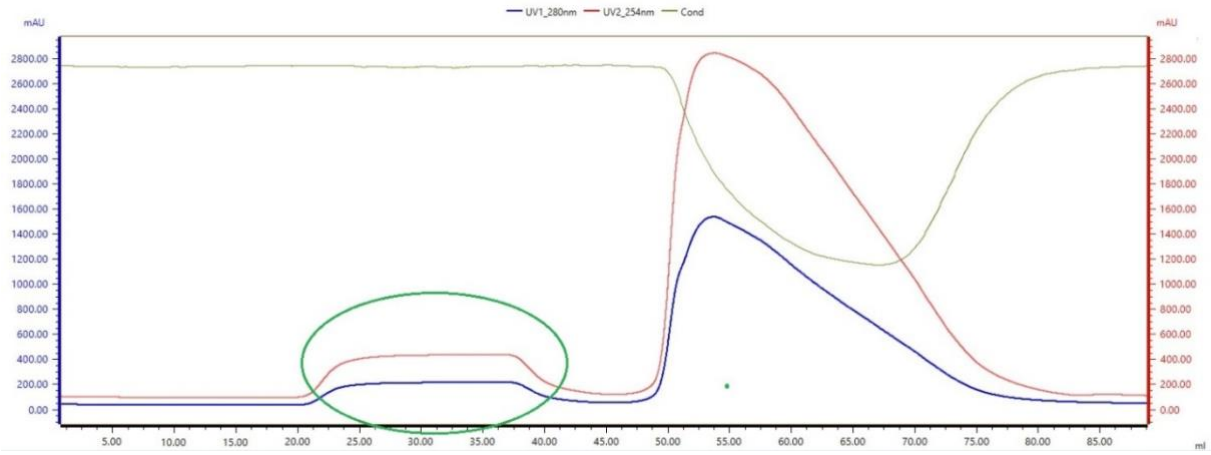


Рисунок 28 – Хроматограмма гель-фильтрации. Зелёным отмечен пик плазмидной ДНК

При аффинной хроматографии на Plasmid Select Xtra элюция целевой пДНК проведена буфером C, сбор при 50 mAU (рисунок 29).

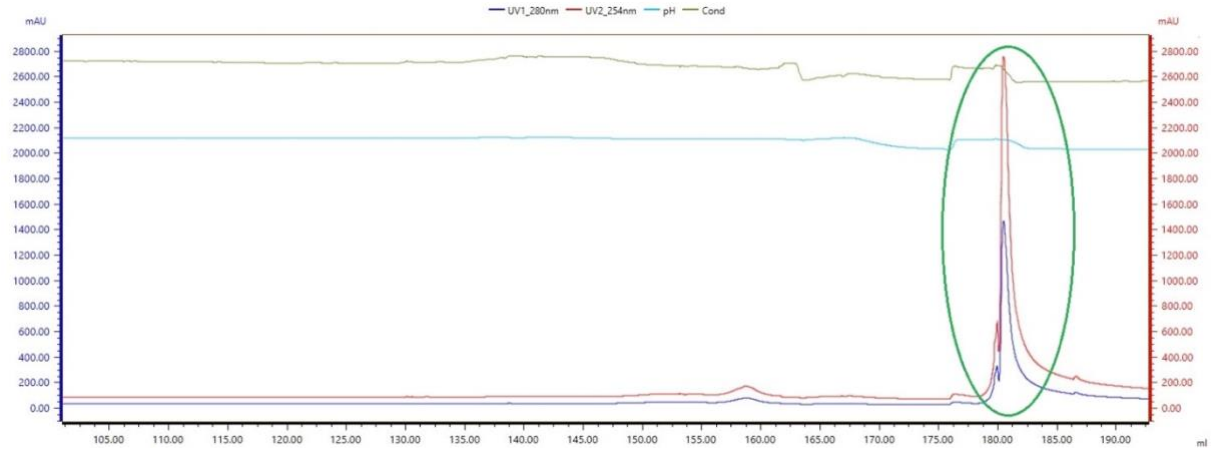


Рисунок 29 – Хроматограмма плазмиды pAAV-CASI-HSPA1A-3xFLAG-WPRE на аффинном сорбенте Plasmid Select Xtra. Зелёным отмечен пик суперскрученной формы плазмидной ДНК

При анионообменной хроматографии на Source30Q произведена элюция буфером E, сбор при 50 mAU (рисунок 30).

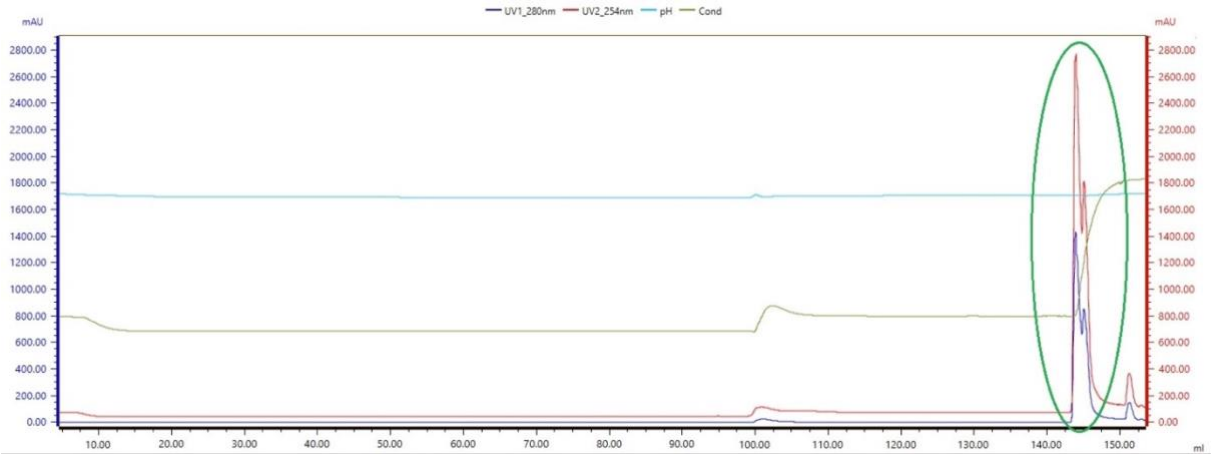


Рисунок 30 – Хроматограмма анионообменной хроматографии плазмиды pAAV-CASI-HSPA1A-3xFLAG-WPRE на сорбенте Sourse30Q. Зелёным отмечен пик плазмидной ДНК

После переосаждения изопропанолом (70% от объёма элюата) и центрифугирования (10 000 *g*, 45 мин, 4°C) осадок растворён в MQ-воде. Концентрация пДНК измерена на NanoDrop 2000c. Плазмидная ДНК наработана и очищена с использованием трёх хроматографических стадий и переосаждения изопропанолом. Отношение A260/A280 составляет 0,95.

3.2.3 Продукция рекомбинантных AAV-частиц

Была проведена трансфекция клеток HEK293 в объёме 1 литра для получения препарата вирусного вектора rAAV-Hsp70. Динамика роста и жизнеспособности клеток HEK293 после трансфекции представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Динамика роста и жизнеспособности клеток HEK293 после трансфекции

День	Концентрация клеток ($\times 10^6$ кл/мл)	Жизнеспособность (%)
0	1,0	99,0
1	1,8	92,0
2	2,0	90,0
3	1,9	88,5

Визуально морфология культуры оставалась стабильной, выраженной агрегации не наблюдалось. Проводился ежедневный контроль плотности клеточной суспензии и жизнеспособности клеток. На начальный момент культивирования (день 0) концентрация клеток составляла 1×10^6 кл/мл при жизнеспособности 98-99%. На 3-й день наблюдался рост клеточной массы: концентрации достигли $1{,}9\times10^6$ кл/мл. Во всех случаях жизнеспособность клеток оставалась высокой (≥85%), что подтверждает стабильные условия культивирования и успешную адаптацию клеток к трансфекционной нагрузке. Для оценки количества геномных копий через 72 часа культура была осветлена, и 1 мл суспензии использовался для анализа количества геномных копий. Количество гк/мл культуральной жидкости составило $3{,}86 \times 10^{10}$. В результате была отработана методика получения препарата rAAV-Hsp70 в суспензионной культуре клеток HEK293. Клеточная линия HEK293 успешно адаптирована к суспензионным условиям и питательной среде BalanCD HEK293, что позволило обеспечить стабильный рост клеточной массы и высокую жизнеспособность в течение 72 часов после трансфекции. Полученные данные свидетельствуют о высокой эффективности трансфекционных условий.

3.2.4 Очистка рекомбинантных AAV-частиц и оценка чистоты вирусного препарата

Очистка рекомбинантных AAV-частиц методом аффинной хроматографии (AAVX POROS Capture Select)

На хроматограмме аффинной очистки наблюдали выраженный пик элюции, соответствующий целевому rAAV. Сбор фракции начинали при 20 mAU (рисунок 31).

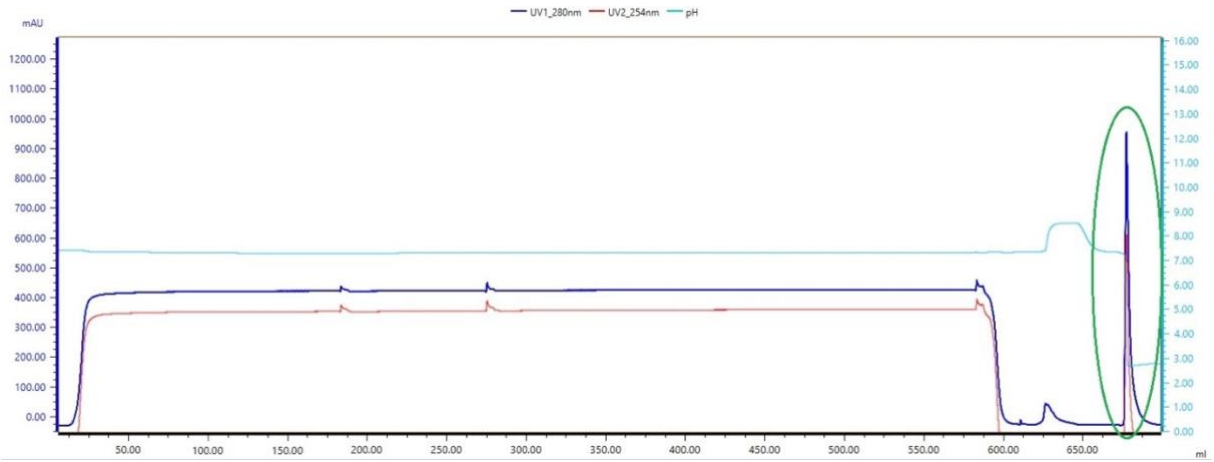


Рисунок 31 – Хроматограмма очистки rAAV-Hsp70. Зелёным отмечен пик эллюции rAAV

Очистка рекомбинантных AAV-частиц методом гель-фильтрация (Superdex-200)

На хроматограмме гель-фильтрации детектировали основной пик, характерный для вирусных частиц. Сбор начинали при 10 mAU (рисунок 32).

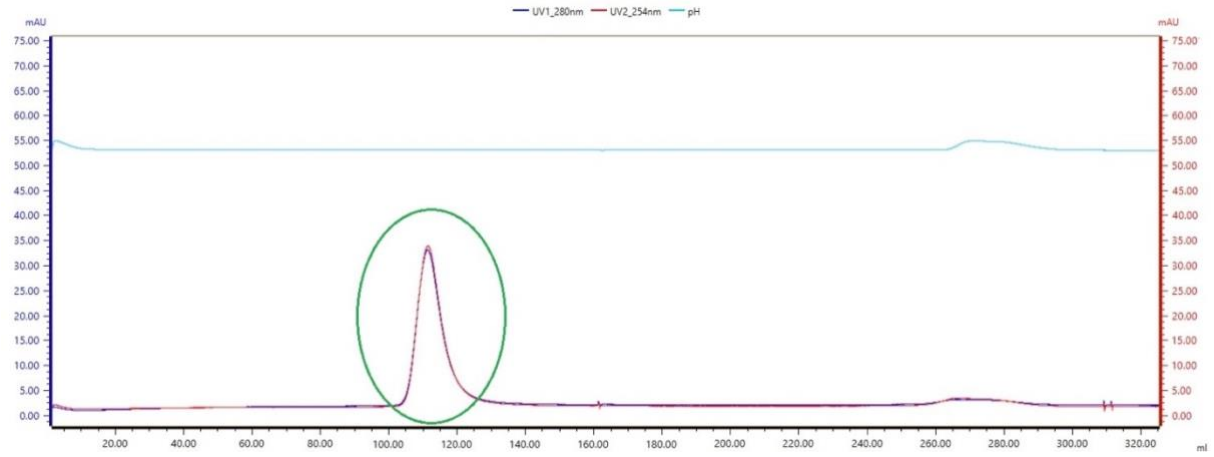


Рисунок 32 – Хроматограмма гель фильтрации rAAV-Hsp70. Зелёным отмечен пик rAAV

Концентрирование и спектрофотометрия вирусного препарата

После концентрирования (Amicon Ultra 50K, 5000 об/мин) получены следующие параметры, указанные в таблице 9.

Таблица 9 – Спектрофотометрические характеристики очищенного препарата AAV

Препарат	**A260, Oe**	**A260/A280**	**V, мл**
rAAV-Hsp70	1,453	0,98	3,1

Оценка чистоты препарата методом электрофореза в ПААГ

На электрофореграмме препарат rAAV-Hsp70 (дорожки 1, 2 и 3) даёт три основные полосы, соответствующие капсидным белкам AAV (VP1, VP2, VP3). Дополнительные полосы отсутствуют (рисунок 33).

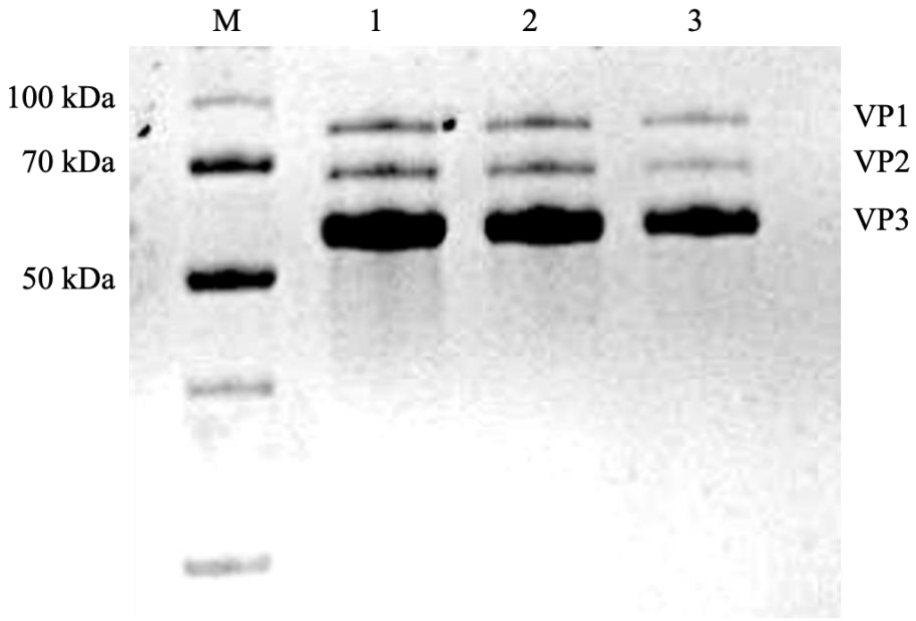


Рисунок 33 – Фотография гель-электрофореза полученного образца препарата rAAV-casi-HSPA1A-3xFLAG-WPRE (rAAV-Hsp70) в ПААГ

Вирусные частицы очищены аффинной хроматографией и гель-фильтрацией; конечный препарат имеет A260 = 1,453, A260/A280 = 0,98, объём 3,1 мл; электрофорез подтвердил наличие трёх капсидных белков и отсутствие примесей.

Оценка морфологии вирионов методом трансмиссионной электронной микроскопии

Получено 12 изображений препарата rAAV-Hsp70 после негативного контрастирования уранилацетатом. На микрофотографиях визуализированы икосаэдрические частицы диаметром около 22 нм. Полноценные капсиды выглядят как однородные светлые частицы без внутреннего просвета, дефектные, пустые или частично заполненные, как частицы с тёмным пятном или ореолом внутри (рисунок 34).

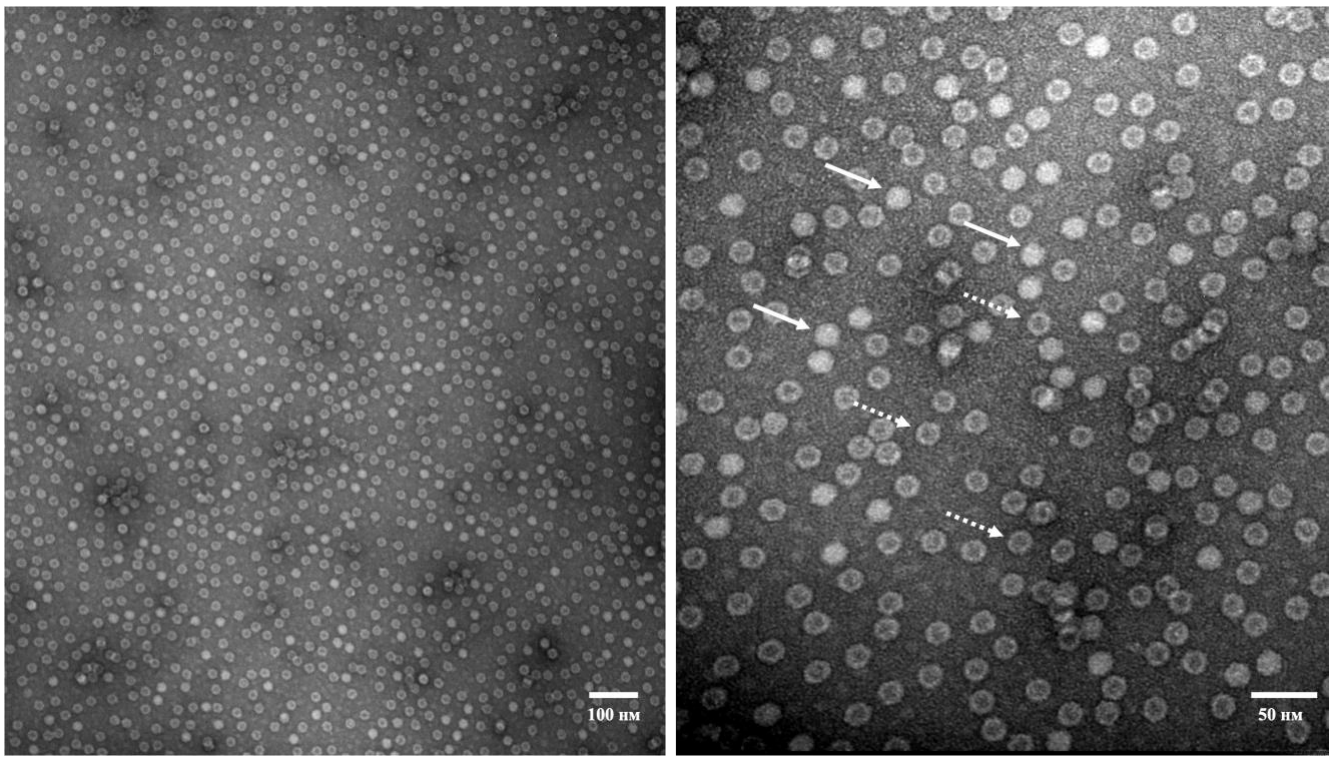


Рисунок 34 – Трансмиссионная электронная микроскопия препарата rAAV-Hsp70 (негативное контрастирование 1,5 % уранилацетатом). Стрелки: сплошная – полноценный (заполненный ДНК) капсид, пунктирная – дефектный (пустой) капсид. HV=160 кВ, масштабный отрезок 100 нм (увеличение ×150 000) и 50 нм (×250 000)

При подсчёте частиц на серии из 12 микрофотографий идентифицировано 3867 частиц AAV. Из них 1115 отнесены к полноценным капсидам, 2752 – к дефектным капсидам. Полные данные представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Соотношение полноценных и дефектных капсидов rAAV-Hsp70

Изображение	**Полноценные капсиды, n**	**Дефектные капсиды, n**	**Всего частиц, n**	**Доля полноценных, %**	**Доля дефектных, %**
1	628	753	1381	45,5	54,5
2	52	145	197	26,4	73,6
3	46	153	199	23,1	76,9
4	57	186	243	23,5	76,5
5	44	151	195	22,6	77,4
6	36	191	227	15,9	84,1
7	41	195	236	17,4	82,6
8	36	196	232	15,5	84,5
9	47	197	244	19,3	80,7
10	46	206	252	18,3	81,7
11	37	203	240	15,4	84,6
12	45	176	221	20,4	79,6
Итого, 1-12	1115	2752	3867	28,8	71,2
Среднее, 2-12				19,78	
СО, 2-12				3,71	

Первое изображение, полученное при ином масштабе (100 нм), включали в общий подсчёт частиц, однако межкадровую вариабельность оценивали отдельно по однородной серии

изображений. Таким образом, суммарная доля полноценных капсидов составила 28.8%, дефектных – 71.2%. При анализе однородной серии изображений доля полноценных капсидов составила в среднем 19.78 ± 3.71% (CO). Доля полноценных капсидов не превышала 25-26% в большинстве проанализированных полей зрения и в среднем составила около 20%. Наличие значительной доли пустых/дефектных капсидов является типичным для препаратов rAAV. При их продукции могут формироваться пустые и частично заполненные частицы, а доля пустых капсидов может варьировать от 10 до 90% от их общего числа [299]

3.2.5 Оценка продукта экспрессии трансгена в клеточных культурах SH-SY5Y и CHO-S

Для оценки наличия продукта экспрессии экзогенного *HSPA1A* доставленного с помощью rAAV-Hsp70 использовали иммунофлуоресцентный анализ. С этой целью клетки нейробластомы SH-SY5Y трансдуцировали rAAV-Hsp70. Внутриклеточный продукт экспрессии Hsp70 оценивали на 3-й день после трансдукции. В результате была обнаружена значительный детектируемый уровень Hsp70 в цитоплазме клеток SH-SY5Y, трансдуцированных rAAV-Hsp70, тогда как в контрольных клетках продукт экспрессии отсутствовал. Микрофотографии результатов иммунофлуоресцентного анализа представлены на рисунке 35.

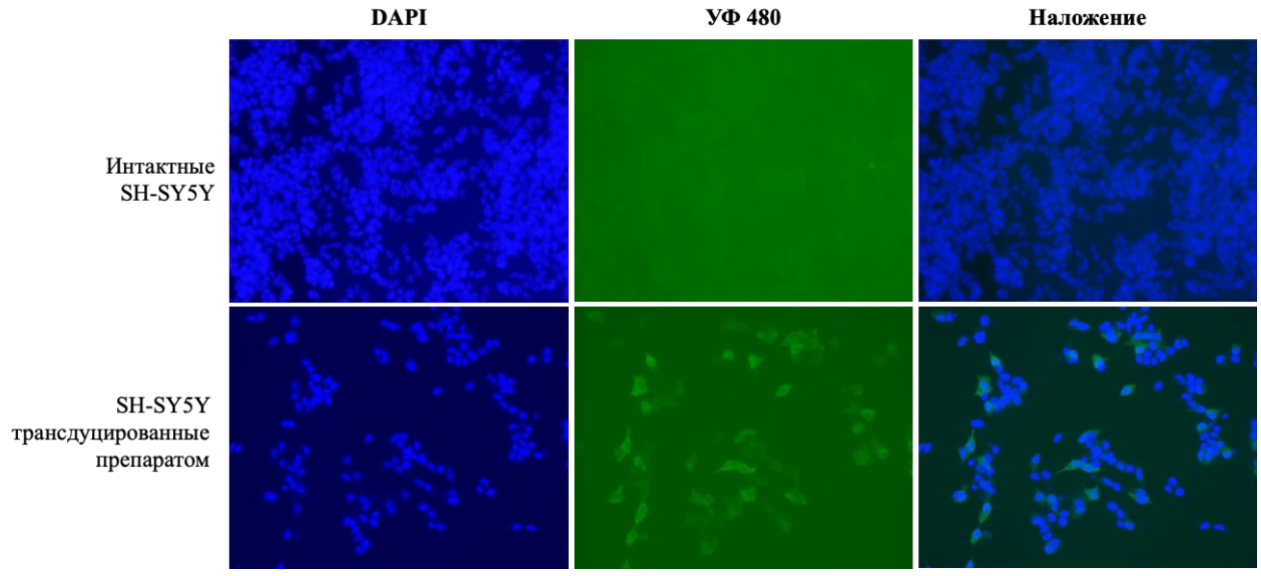


Рисунок 35 – Снимки иммунофлуоресцентного анализа продукта экспрессии экзогенного белка Hsp70 в клетках нейробластомы SH-SY5Y после трансдукции rAAV-Hsp70

Клетки трансдуцированы препаратом в дозе 10^5 геномных копий на клетку. Через 72 ч клетки фиксировали, инкубировали с антителами к FLAG-метке (GB1539, разведение 1:500) и вторичными антителами, конъюгированными с FITC (разведение 1:500). Микроскопия, увеличение ×10. Наблюдается выраженная цитоплазматическая флуоресценция (зелёный канал) в трансдуцированных клетках. Контрольные (нетрансдуцированные) клетки сигнала не давали.

Помимо клеток SH-SY5Y, трансдукция rAAV-Hsp70 клеток CHO-S также привела к выраженному накоплению в цитоплазме продукта экспрессии введённого конструкта Hsp70 с FLAG-меткой (рисунок 36).

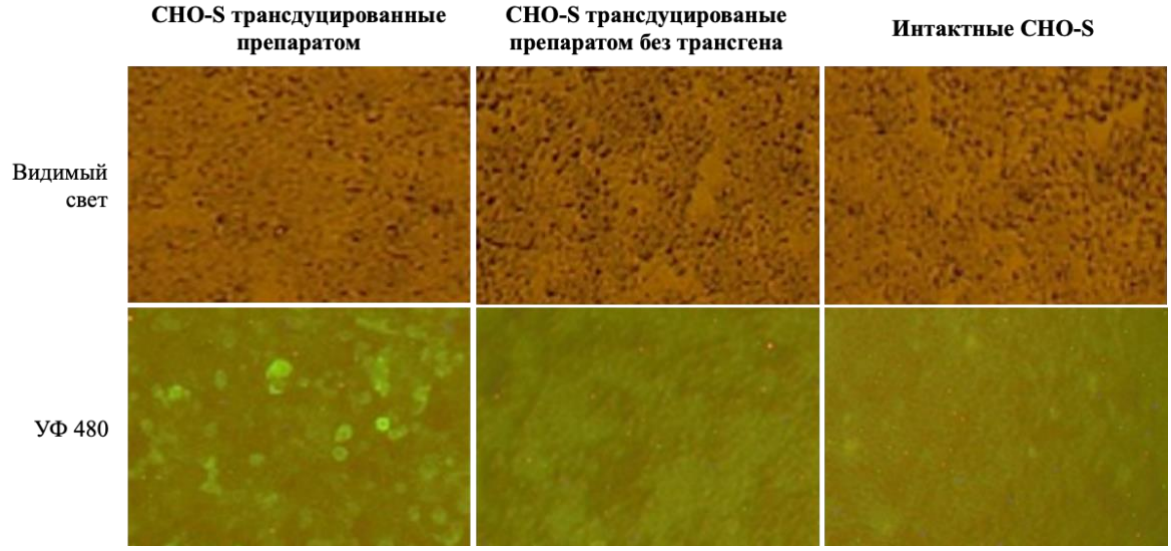


Рисунок 36 – Снимки иммунофлуоресцентного анализа продукта экспрессии экзогенного Hsp70 с FLAG-меткой в клетках CHO-S после трансдукции rAAV-Hsp70

Клетки трансдуцированы вирусом в дозе 10^5 геномных копий на клетку. Через 72 ч проведены фиксация и иммуноцитохимическое окрашивание с антителами к FLAG-метке (GB1539, 1:500) и вторичными антителами, конъюгированными с FITC меткой (1:500). Микроскопия, увеличение ×10. Выявлена яркая цитоплазматическая флуоресценция (зелёный канал). Контрольные клетки флуоресценции не давали.

Краткие выводы по главе 3.2

1. **Получена и верифицирована плазмидная конструкция.** Методом рестрикционного клонирования создана плазмида pAAV-CASI-HSPA1A-3xFLAG-WPRE, содержащая нуклеотидную вставку последовательности гена HSPA1A человека с FLAG-меткой под контролем гибридного промотора CASI. Рестрикционный анализ пяти независимых клонов подтвердил правильность сборки;
2. **Наработана и очищена плазмидная ДНК для продукции AAV.** Проведена трёхстадийная хроматографическая очистка с получением высокоочищенной сверхскрученной плазмидной ДНК;
3. **Получены препараты рекомбинантного AAV-вектора.** После трансфекции суспензионных клеток HEK293 и двухстадийной очистки получен очищенный препарат rAAV-Hsp70 (rAAV-casi-HSPA1A3-3xFLAG-WPRE) с оптической плотностью A260 = 1,453 и отношением A260/280 = 0,98;
4. **Электрофорез и электронная микроскопия подтвердили качество вирусного препарата.** SDS-PAGE показал три характерные полосы капсидных белков AAV (VP1, VP2,

VP3) без видимых примесей. Трансмиссионная электронная микроскопия выявила икосаэдрические частицы диаметром ~22 нм, доля полноценных (заполненных ДНК) капсидов составила в среднем 19,78 ± 3,71%.

5. **Экспрессия трансгена подтверждена *in vitro.*** Иммунофлуоресцентный анализ клеток нейробластомы SH-SY5Y и клеток CHO-S после трансдукции rAAV-Hsp70 выявил выраженную цитоплазматическую локализацию продукта экспрессии экзогенного белка Hsp70 с FLAG меткой, что подтверждает функциональность полученного вирусного конструкта.

3.3 Эффект однократного системного введения вирусного препарата rAAV-Hsp70 на модели FUS-протеинопатии

На предыдущих этапах были детально охарактеризованы фенотипические особенности модели S-FUS(1-359) (раздел 3.1) и получен функциональный вирусный препарат rAAV-Hsp70 (раздел 3.2). Следующий этап работы был направлен на оценку терапевтического эффекта системной доставки Hsp70 *in vivo*.

Препарат вводили однократно ретроорбитально (системно) в двух дозах: низкой (5×10^{10} геномных копий/мышь) и высокой (5×10^{11} геномных копий/мышь). Ниже представлены результаты оценки терапевтического потенциала данного препарата после однократного системного введения трансгенным мышам. Эффективность системной доставки rAAV-Hsp70 в ЦНС при выбранных дозах подтверждается литературными данными для вектора AAV-PHP.eB с идентичной генетической платформой [300], а также детекцией рекомбинантного белка Hsp70 с FLAG-меткой в образцах спинного мозга (раздел 3.4) и его локализацией в нейронах (раздел 3.5). Это свидетельствует о способности использованного вектора преодолевать гематоэнцефалический барьер и обеспечивать экспрессию трансгена в клетках-мишенях.

3.4 Продукция Hsp70 в ЦНС

Иммуноблоттинг с использованием высокоспецифичных анти-FLAG-антител подтвердил присутствие продукта экспрессии экзогенного белка Hsp70 ожидаемой массы (~75 кДа) в спинном мозге животных, получавших препарат rAAV-Hsp70, тогда как в контрольной группе сигнал отсутствовал (рисунок 37)

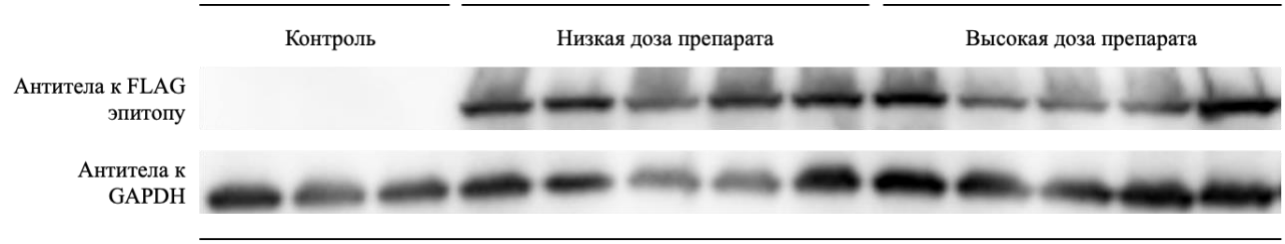


Рисунок 37 – Микрофотография иммуноблота с уровнями рекомбинантного белка Hsp70 с FLAG-меткой (~75 кДа) в образцах спинного мозга трансгенных и контрольных животных

3.5 Локализация Hsp70 в спинном мозге

Для определения типа клеток, в которых происходит экспрессия трансгена после системного введения rAAV-Hsp70, был проведён иммуногистохимический анализ по обнаружению продуктов экспрессии на срезах грудного отдела спинного мозга животных дикого типа. Рекомбинантный белок Hsp70 визуализировали с использованием антител к FLAG-метке (anti-FLAG), а для идентификации клеточных популяций применяли маркёры: NeuN (нейроны), Iba1 (микроглия) и GFAP (астроциты). Качественный анализ проводили на серии срезов при увеличении ×200, ×400 и ×800, что позволило детально охарактеризовать распределение трансгена.

Локализация Hsp70 в нейронах

Иммунофлуоресцентный анализ выявил выраженную колокализацию анти-FLAG сигнала со специфическим маркёром нейронов NeuN (рисунок 38).

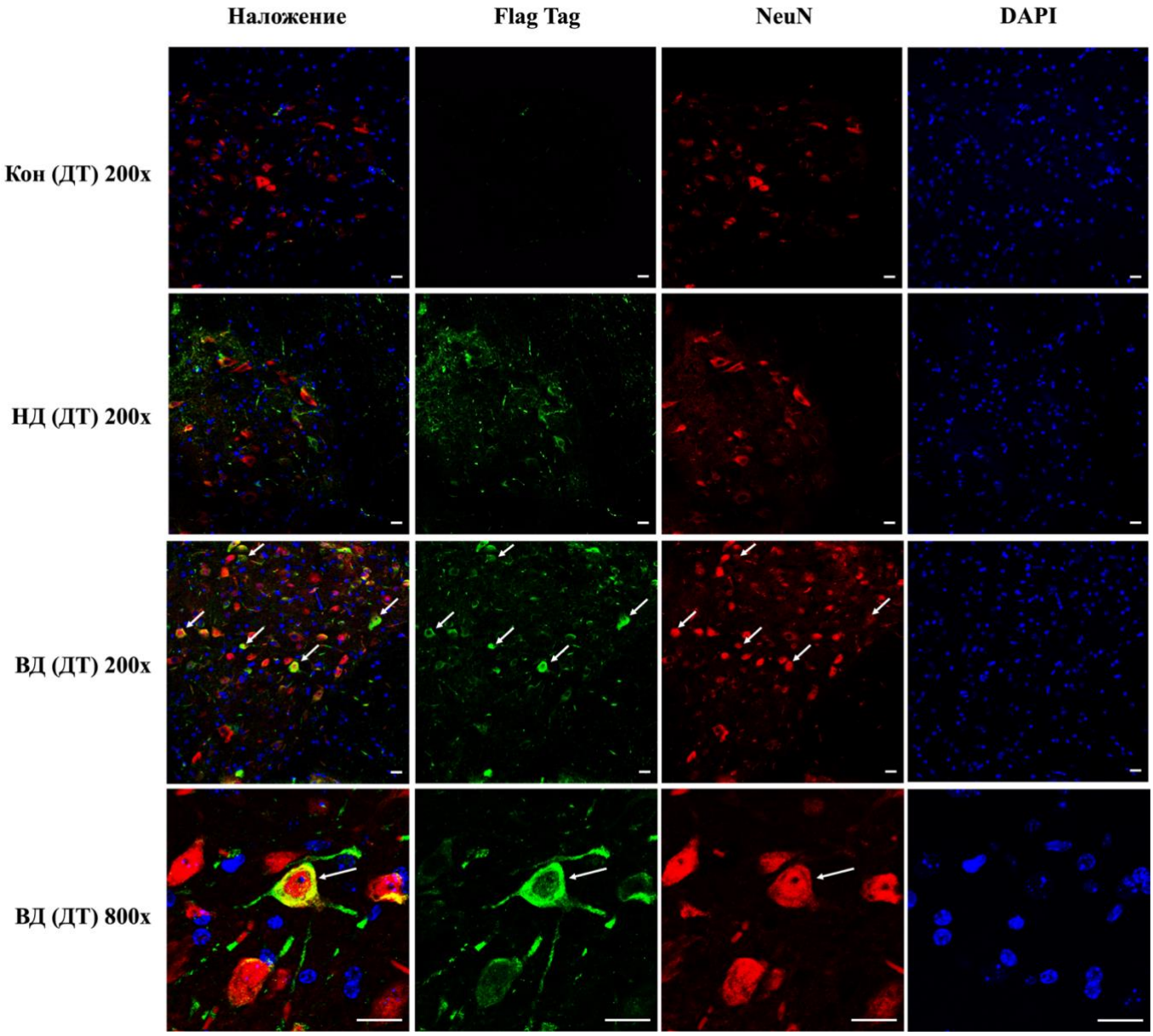


Рисунок 38 – Конфокальные изображения срезов грудного отдела спинного мозга мышей дикого типа (ДТ) после системного введения rAAV-Hsp70 в низкой (НД) или высокой (ВД) дозе либо растворителя (Кон). Рекомбинантный Hsp70 визуализирован с помощью антител к FLAG-метке (зелёный), нейроны – маркером NeuN (красный), ядра окрашены DAPI (синий). Столбцы: Наложение – совмещение каналов, каналы Flag Tag, NeuN, DAPI. Колокализация FLAG и NeuN (белые стрелки) в группах НД и ВД, в контрольных группах FLAG-сигнал отсутствует. Масштабная линейка – 20 мкм (×200), 10 мкм (×800)

Это свидетельствует о том, что рекомбинантный Hsp70 синтезируется непосредственно в нейрональных клетках спинного мозга после однократного ретроорбитального введения вирусного вектора. Данный результат подтверждает способность AAV-серотипа PHP.eB эффективно трансдуцировать нейрональную популяцию и обеспечивать продукцию

терапевтического белка в клетках-мишенях [253]. Вместе с тем, колокализация не являлась абсолютной. Не все NeuN-положительные клетки демонстрировали наличие FLAG-метки, и, наоборот, не все FLAG-положительные клетки были иммунореактивны к NeuN. Отсутствие сигнала у части нейронов вероятно, можно объяснить неполной трансдукцией нейронального пула при системном введении, что согласуется с литературными данными о гетерогенности распределения AAV-PHP.eB в ЦНС и вариабельностью уровня экспрессии трансгена в отдельных клетках [250, 253]. В дополнение, наличие FLAG-сигнала в клетках, отрицательных по NeuN, может указывать на то, что трансдукция не ограничивается исключительно нейрональной популяцией. Для идентификации этих клеток требуются дополнительные исследования с использованием маркеров других типов клеток ЦНС (олигодендроцитов, эндотелия, перицитов и тд.). В настоящей работе анализировались три основные популяций клеток - нейроны, микроглия и астроциты. По этой причине экспрессия трансгена не может быть исключена в других типах клеток.

Отсутствие продукции Hsp70 в клетках микроглии

В проанализированных срезах грудного отдела спинного мозга колокализации FLAG-сигнала с маркёром микроглии Iba1 не было обнаружено. Это позволяет предположить, что в условиях данного исследования трансдукция микроглии при системном введении rAAV-Hsp70 либо отсутствует, либо находится ниже предела детекции. Однако, учитывая качественный характер анализа и ограниченное число исследованных полей зрения, нельзя полностью исключить наличие низкоуровневой экспрессии трансгена в микроглии. Таким образом, интерпретация наблюдаемого от введения rAAV-Hsp70 эффекта как исключительно результата прямого действия Hsp70 в нейронах требует осторожности; нельзя полностью отрицать возможный вклад опосредованных эффектов через другие клеточные популяции или периферические ткани (рисунок 39).

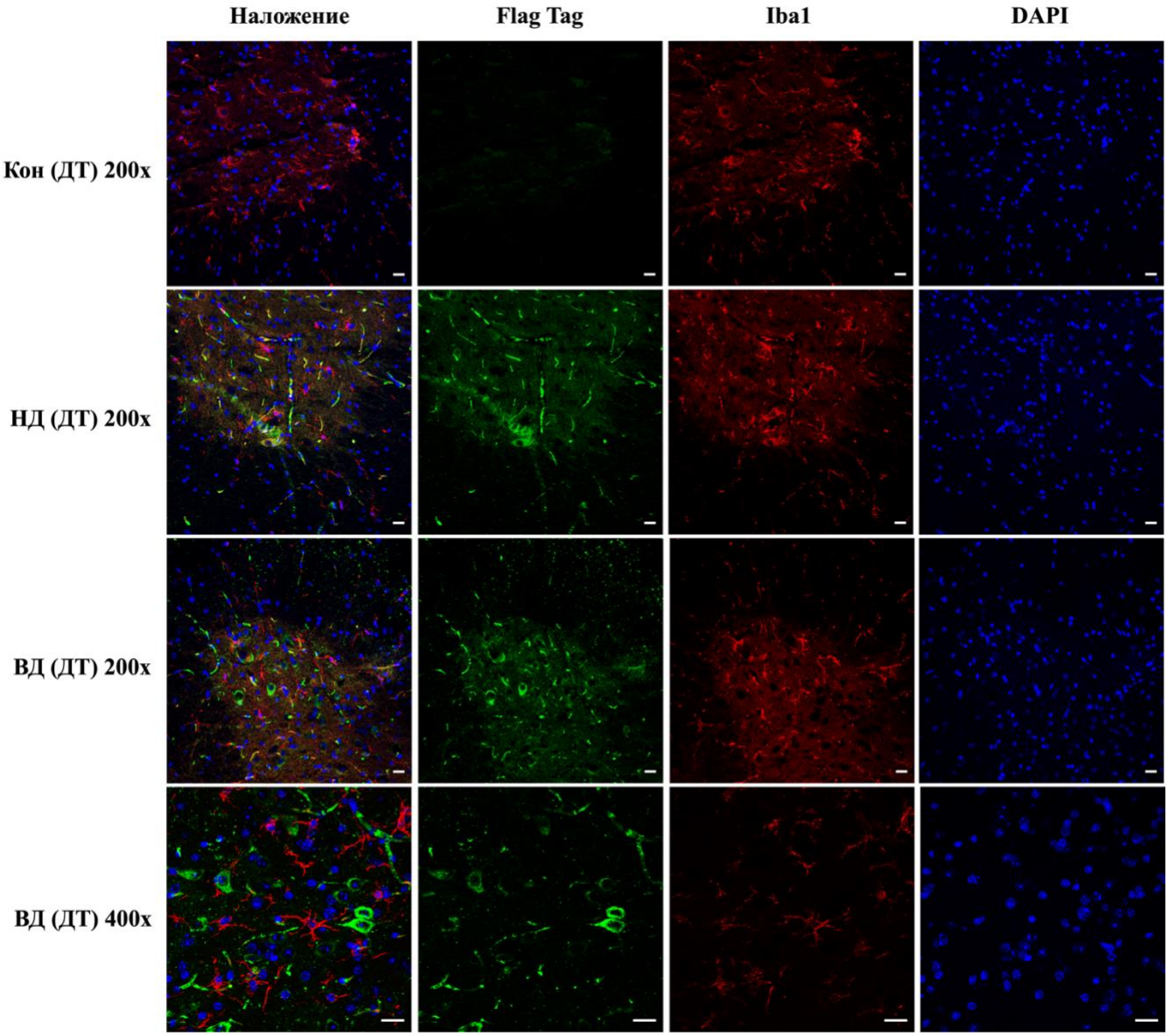


Рисунок 39 – Отсутствие продукта экспрессии экзогенного белка Hsp70 в микроглии спинного мозга. Конфокальные изображения срезов грудного отдела спинного мозга мышей S-FUS(1-359) (Тг) и дикого типа (ДТ) после системного введения rAAV-Hsp70 в низкой (НД) или высокой (ВД) дозе либо растворителя (Кон). Рекомбинантный Hsp70 визуализирован с помощью антител к FLAG-метке (зелёный), микроглия – маркером Iba1 (красный), ядра – DAPI (синий). Столбцы: Наложение – совмещение каналов, каналы Flag Tag, Iba1, DAPI. Масштабная линейка – 20 мкм (×200), 10 мкм (×400)

Оценка астроцитарной активации

Помимо оценки колокализации с маркёрами нейронов и микроглии, был проведён анализ совместной локализации FLAG-сигнала с маркёром астроцитов GFAP. Двойное окрашивание на FLAG и GFAP не выявило перекрывания флуоресцентных сигналов в GFAP-положительных клетках (рисунок 40).

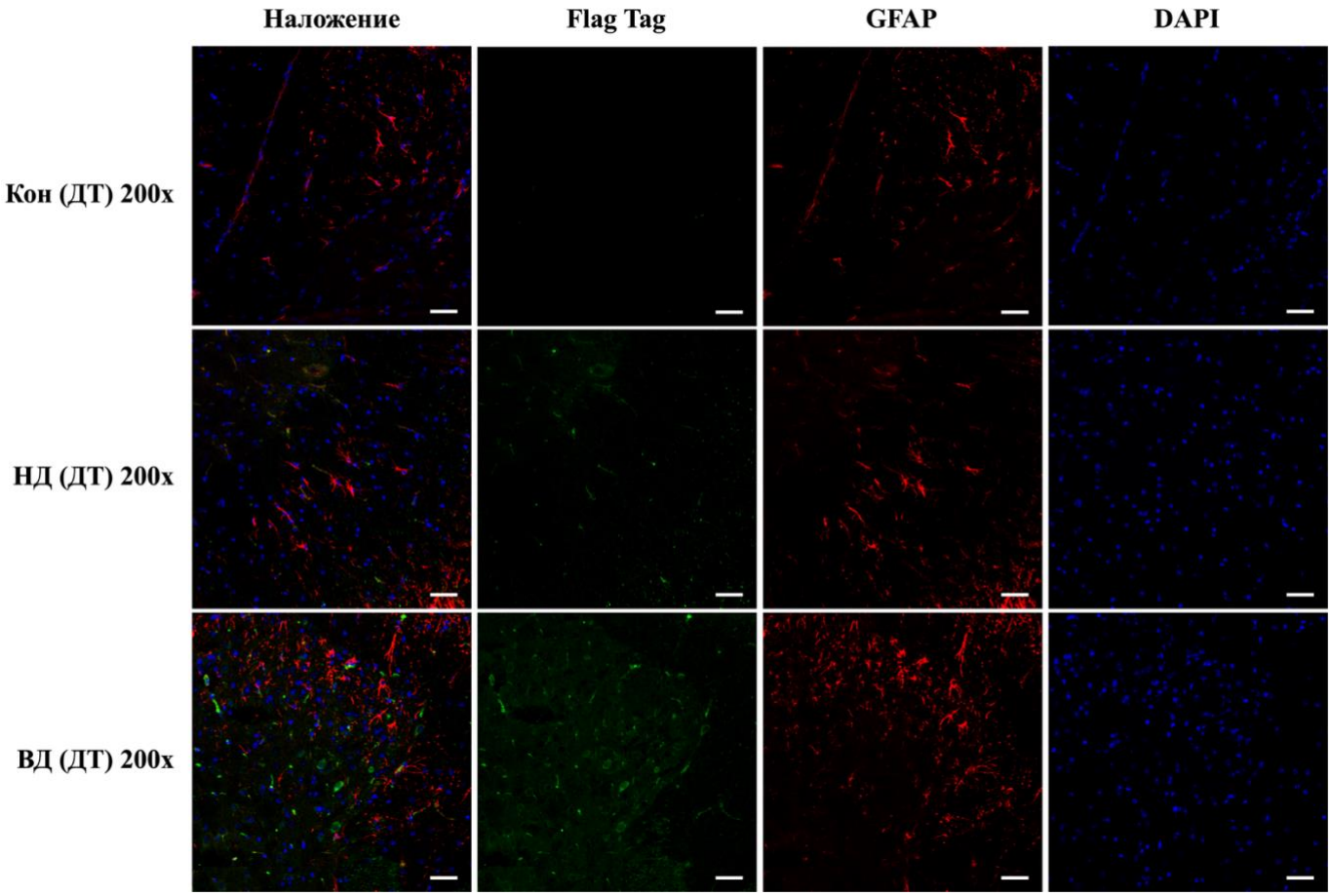


Рисунок 40 – Конфокальные изображения срезов грудного отдела спинного мозга мышей S-FUS(1-359) (Тг) и дикого типа (ДТ) после системного введения rAAV-Hsp70 в низкой (НД) или высокой (ВД) дозе либо растворителя (Кон). Рекомбинантный Hsp70 визуализирован с помощью антител к FLAG-метке (зелёный), астроциты – маркером GFAP (красный), ядра – DAPI (синий). Столбцы: наложение – совмещение каналов, каналы FLAG, GFAP, DAPI. Масштабная линейка – 20 мкм (×200), 10 мкм (×400)

Такой результат может указывать на то, что в условиях данного исследования астроциты, по-видимому, не являются основным источником рекомбинантного Hsp70. Однако, как и в случае с микроглией, окончательное заключение об отсутствии экспрессии в астроцитах требует количественного анализа и более чувствительных методов детекции.

Все представленные выше данные свидетельствуют о нейрональной тропности используемого вирусного препарата в модели S-FUS(1-359) и демонстрируют, что рекомбинантный Hsp70 продуцируется в нейронах, но не в микроглии или астроцитах. Это позволяет предположить, что наблюдаемые эффекты на выживаемость и прогрессирование фенотипа в условиях данного исследования опосредованы, главным образом, нейрональной экспрессией шаперона.

3.6 Оценка системной безопасности rAAV-Hsp70 у мышей дикого

Оценка хронического нейровоспаления

Экспрессию *Il-1b*, *Il-6* и *Tnf alfa* в гипокампе у мышей дикого типа после введения вирусного вектора в двух дозах и в группе PBS на 150 сутки жизни животных оценивали как контроль возможной длительной нейровоспалительной активации, индуцируемой самим препаратом. Такой подход обоснован тем, что вирусные векторы способны запускать врождённый иммунный ответ в ЦНС, причём его выраженность зависит от дозы, свойств вектора и экспрессии трансгена [301, 302]. Провоспалительные цитокины IL-1β, IL-6 и TNF являются стандартными маркерами такого ответа, поскольку их повышение описано после введения вирусных векторов в мозг, в том числе независимо от наличия терапевтического трансгена [303]. Анализ на 150-е сутки позволяет оценить не острый постинъекционный эффект, а возможный хронический воспалительный след, что особенно важно, поскольку именно длительное, а не кратковременное, воспаление ассоциировано с токсичностью и изменением устойчивости экспрессии [302, 304].

Уровень *Il-1b* не различался между группами контроля, высокой и низкой доз (критерий Краскела-Уолиса, p = 0,2058). Аналогично, уровень *Tnf alfa* не показал статистически значимых различий между группами (критерий Краскела-Уолиса, p = 0,2347). Экспрессия *Il-6* не была обнаружена ни в одном из проанализированных образцов. Отсутствие повышения *Il1-b*, и *Tnf alfa*, а также отсутствие детектируемой экспрессии *Il-6* у дикотипных животных через 150 суток после введения вектора в обеих дозах может свидетельствовать в пользу того, что вирусный препарат rAAV-Hsp70 не формирует выраженного длительного нейровоспалительного фона у мышей дикого типа (рисунок 41).

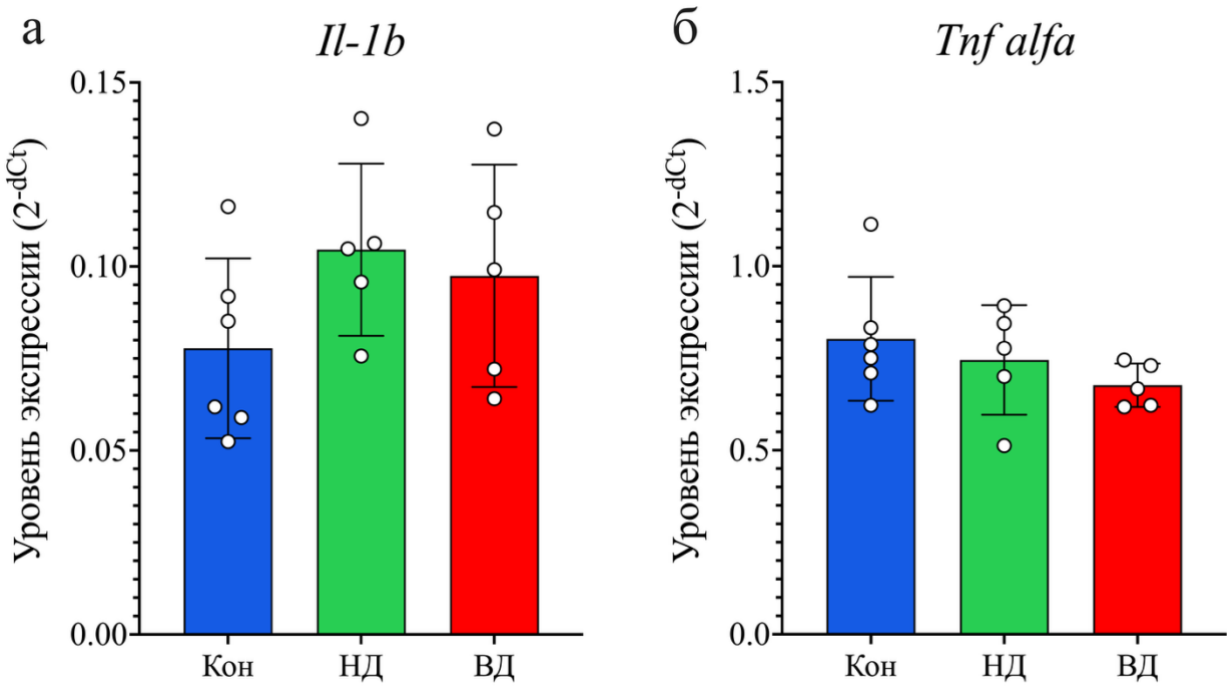


Рисунок 41 – Относительный уровень экспрессии *Il-1b* **(а)** и *Tnf alfa* **(б)** в головном мозге мышей дикого типа через 150 суток после введения rAAV-Hsp70. Группы: PBS (n = 6), НД – низкая доза rAAV-Hsp70 (n = 5), ВД – высокая доза rAAV-Hsp70 (n = 5)

Таким образом, совокупность полученных данных (нейрональная локализация рекомбинантного Hsp70 и отсутствие хронического воспалительного ответа) позволяет с большей уверенностью интерпретировать далее описанный, наблюдаемый эффект на трансгенной модели S-FUS(1-359) как следствие специфического действия шаперона Hsp70, а не неспецифической, а не неспецифического иммунного буста, вызванного самим вирусным вектором [305, 306].

Отсутствие системной, долговременной токсичности

При анализе биохимических показателей сыворотки крови мышей дикого типа через 150 суток после введения rAAV-Hsp70 (активность АЛТ, АСТ, ЩФ, коэффициент де Ритиса, концентрация мочевины и креатинина, их соотношение, активность КФК) статистически значимых различий между группами выявлено не было ($p > 0,05$ для всех, критерий Краскела-Уоллиса). Активность АЛТ составила 53,8 ± 38,8 Ед/л в контроле, 57,0 ± 20,5 Ед/л в группе низкой дозы и 27,7 ± 0,6 Ед/л в группе высокой дозы ($p = 0,5563$). Активность АСТ – 84,2 ± 36,0; 117,4 ± 21,6 и 87,0 ± 37,3 Ед/л соответственно ($p = 0,2162$). Коэффициент де Ритиса не различался между группами (2,2 ± 1,3; 2,4 ± 1,3 и 3,2 ± 1,3; $p = 0,3345$). Активность ЩФ составила 32,8 ± 10,7; 45,2 ± 16,2 и 37,3 ± 4,0 Ед/л ($p = 0,4689$). Концентрация мочевины составила 9,7 ± 1,3; 8,5 ± 1,1 и 9,3 ± 1,3 ммоль/л ($p = 0,373$), креатинина – 25,2 ± 1,9; 24,8 ± 1,3 и 24,7 ± 0,6 мкмоль/л ($p = 0,9365$), их соотношение – 392,8 ± 55,5; 345,3 ± 44,7 и 377,4 ± 61,5 ($p = 0,3209$). Активность КФК – 117,6 ± 51,7; 127,2 ± 37,0 и 189,0 ± 166,3 Ед/л ($p = 0,4973$) (рисунок 42).

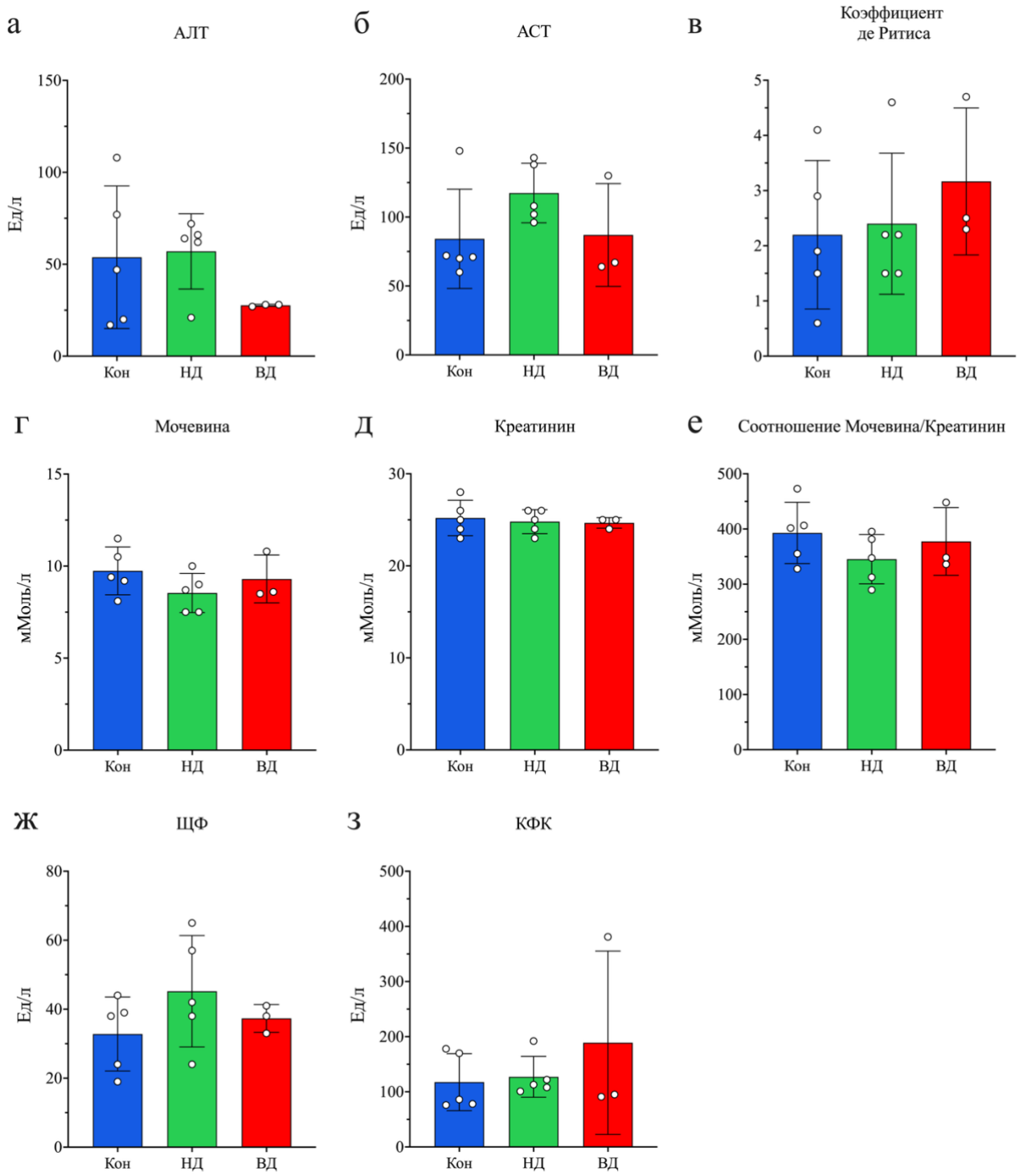


Рисунок 42 – Биохимические показатели сыворотки крови мышей дикого типа через 150 суток после однократного ретроорбитального введения rAAV-Hsp70. **а.** активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) (Кон n = 5, НД n = 5, ВД n = 3; p = 0,5563. **б.** Аспартатаминотрансфераза (АСТ) (p = 0,2162). **в.** коэффициент де Ритиса (АСТ/АЛТ) (p = 0,3345). **г.** Мочевина (p = 0,373). **д.** Креатинин (p = 0,9365). **е.** Соотношение мочевина/креатинин (p = 0,3209). **ж.** Щелочная фосфатаза (ЩФ) (p = 0,4689). **з.** Креатинкиназа (КФК) (p = 0,4973). Данные представлены как среднее ± SEM. Использовали критерий Краскела-Уоллиса. Кон – контроль (PBS); НД – низкая доза rAAV-Hsp70 (5×10^{10} гк/мышь); ВД – высокая доза rAAV-Hsp70 (5×10^{11} гк/мышь)

Все исследованные показатели во всех группах оставались в пределах референсных диапазонов для мышей линии CD-1 [307, 308] . Единичное повышение активности КФК (381 Ед/л) в группе высокой дозы у одного животного не сопровождалось изменением других маркеров и, вероятно, отражает индивидуальную вариабельность. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии системной токсичности и хорошей переносимости rAAV-Hsp70 в использованных дозах. Следует отметить, что малый размер выборок (n = 3–5) ограничивает статистическую мощность анализа, что не позволяет исключить наличие слабых эффектов, не выявленных в данном исследовании.

3.7 Влияние однократного системного введения rAAV-Hsp70 на выживаемость мышей линии S-FUS(1-359)

Выживаемость анализировали методом Каплана-Мейера. Сравнивали три группы трансгенных животных: контроль с растворителем (PBS, n = 18); rAAV-Hsp70 в низкой дозе (НД, n = 13); rAAV-Hsp70 в высокой дозе (ВД, n = 14). Общие различия между группами были значимыми по лог-ранговому критерию и показали статистически значимые различия в выживаемости (χ^2=8,025, df=2, p = 0,0181) (рисунок 43).

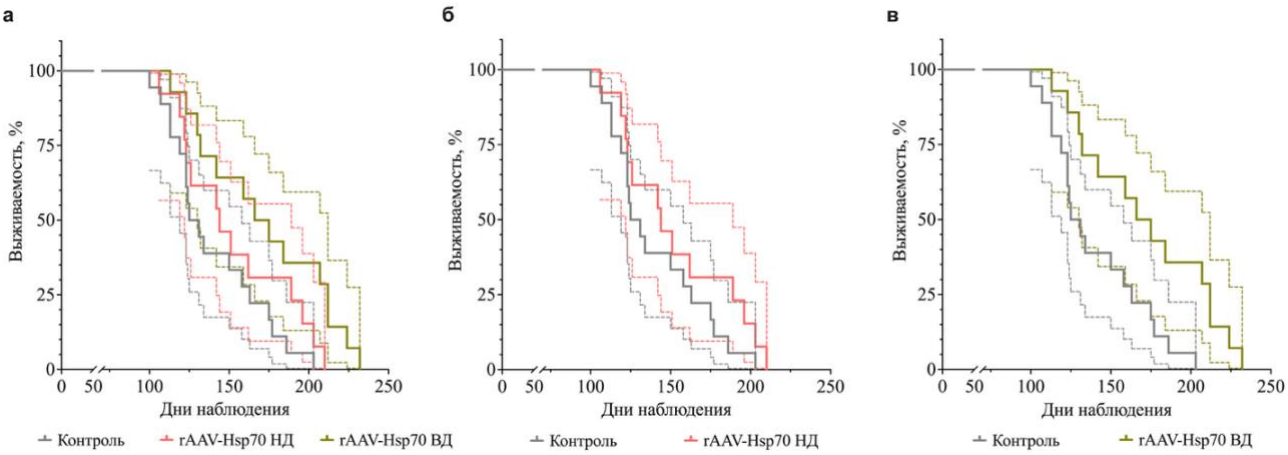


Рисунок 43 – Влияние однократного ретроорбитального введения rAAV-Hsp70 на выживаемость у трансгенных мышей S-FUS(1-359). **а.** Кривые выживаемости Каплана-Мейера для групп: контроль-PBS (n = 18), низкая доза rAAV-Hsp70 (НД, n = 13) и высокая доза rAAV-Hsp70 (ВД, n = 14) (p = 0,0181, лог-ранговый критерий Мантела-Кокса; p = 0,0633, критерий Гехана-Бреслоу-Вилкоксона). **б**. Попарное сравнение групп Контроль и НД. Медиана выживаемости: 128 дней (контроль) и 144 дня (НД). **в.** Попарное сравнение групп контроль и ВД. Медиана выживаемости: 128 дней (контроль) и 170,5 дней (ВД) (p = 0,0089, лог-ранговый критерий Мантела-Кокса; p = 0,0220, критерий Гехана-Бреслоу-Вилкоксона)

Лог-ранговый критерий для оценки тренда также подтвердил пороговый характер эффекта (χ^2=8,007, df=1, p = 0,0047). При попарном сравнении групп медиана выживаемости в контрольной группе составила 128 дней. Введение низкой дозы вектора (НД) увеличило медиану выживаемости до 144 дней; однако различие с контрольной группой не достигло статистической значимости (лог-ранговый критерий χ^2=1,507, p = 0,2195; отношение рисков (HR)=0,6582, 95%

ДИ 0,33–1,32) (см. рисунок 43б). Напротив, терапия в высокой дозе (ВД) достоверно увеличила медиану выживаемости до 170,5 дней (лог-ранговый критерий χ^2=6,833, p = 0,0089; HR=0,4359, 95% ДИ 0,21–0,90). Это также было подтверждено критерием Гехана-Бреслоу-Уилкоксона (χ^2=5,247, p = 0,0220) (см. рисунок 43в).

Полученные данные свидетельствуют о том, что однократное ретроорбитальное введение высокой дозы rAAV-Hsp70 достоверно увеличивает продолжительность жизни трансгенных мышей S-FUS(1-359), повышая медиану выживаемости на 42,5 дня (приблизительно на 33%) по сравнению с контрольной группой. Эффект низкой дозы проявлялся в виде тенденции к улучшению выживаемости, но не достиг статистической значимости. Полученные данные указывают на пороговый характер эффекта rAAV-Hsp70. Это позволяет предположить, что для реализации нейропротекторного действия Hsp70 необходим определённый минимальный уровень экспрессии трансгена, возможно, ниже которого компенсаторное усиление шаперонной системы оказывается недостаточным.

3.8 Влияние rAAV-Hsp70 на фенотипические характеристики модели

Средняя продолжительность жизни трансгенных мышей, получавших растворитель (PBS, контроль, n = 18), составила 140,2 ± 30,1 дня (среднее ± СО). Низкая доза rAAV-Hsp70 (НД, n = 13) увеличила среднюю продолжительность жизни до 153,3 ± 35,5 дня, а высокая доза (ВД, n = 14) – до 172,2 ± 40,4 дня. Однофакторный дисперсионный анализ выявил значимый эффект группы (F(2,42) = 3,273, p = 0,0478). Пост-тест Даннетта показал значимое увеличение продолжительности жизни в группе ВД по сравнению с контролем (разность средних 32,0 дня; 95% ДИ 3,3–60,7; скорректированный p = 0,0271), тогда как различия между группой НД и контролем были незначимы (тогда как различия между группой НД и контролем были незначимы (разность средних 13,1 дня; 95% ДИ −16,3–42,4; скорректированный p = 0,5011) (рисунок 44).

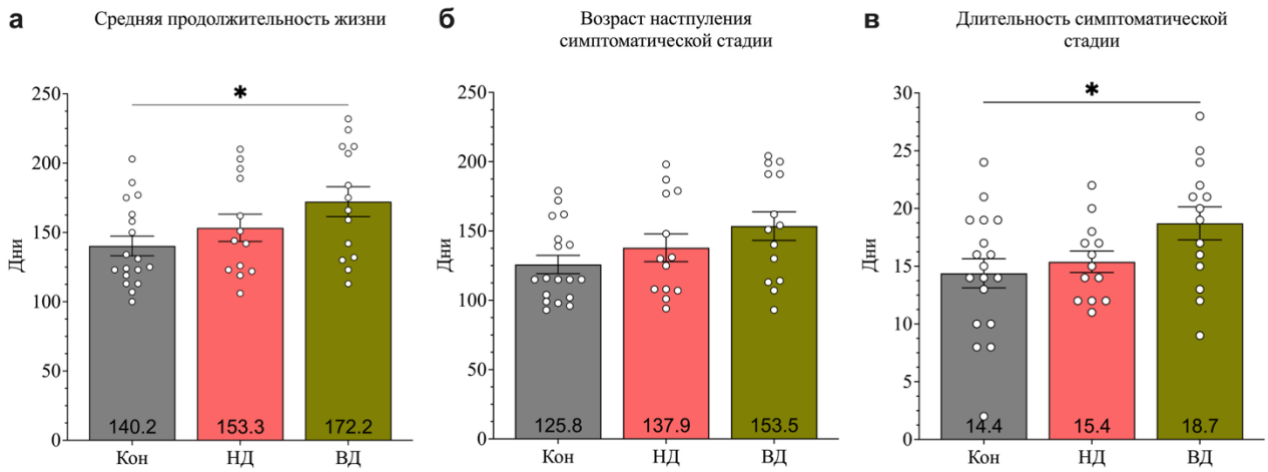


Рисунок 44 – Влияние однократного ретроорбитального введения rAAV-Hsp70 на ключевые параметры БАС-подобного фенотипа у трансгенных мышей S-FUS(1-359). **а.** Средняя продолжительность жизни (среднее ± SEM) – контроль 140,2 ± 7,1 дней (n = 18), НД 153,3 ± 9,9 дней (n = 13), ВД 172,2 ± 10,8 дней (n = 14). Однофакторный дисперсионный анализ: F(2,42) = 3,273, p = 0,0478; пост-тест Даннетта – ВД vs контроль разность средних

32,0 дня (95% ДИ 3,3-60,7), скорректированный $p = 0,0271$; НД vs контроль разность средних 13,1 дня (95% ДИ −16,3–42,4), скорректированный $p = 0,5011$. **б.** Возраст появления первых двигательных симптомов (среднее ± SEM): контроль 125,8 ± 6,6 дней (n = 18), НД 137,9 ± 10,2 дней (n = 13), ВД 153,5 ± 10,3 дней (n = 14). Однофакторный дисперсионный анализ: $F(2,42) = 2,617$, $p = 0,0849$ (общее сравнение не значимо). **в.** Продолжительность симптоматической стадии (среднее ± SEM): Кон 14,39 ± 1,3 дней (n = 18), НД 15,38 ± 0,9 дней (n = 13), ВД 18,71 ± 1,4 дней (n = 14). Однофакторный дисперсионный анализ: $F(2,42) = 3,262$, $p = 0,0482$; пост-тест Даннетта: ВД vs контроль разность средних 4,33 дня (95% ДИ 0,34–8,31), скорректированный $p = 0,0317$; НД vs контроль разность средних 1,00 дня (95% ДИ −3,08-5,07), скорректированный $p = 0,8047$. Кон – контроль с введением растворителя; НД – низкая доза rAAV-Hsp70 (5×10^{10} гк/мышь); ВД – высокая доза rAAV-Hsp70 (5×10^{11} гк/мышь). Значимые различия между группой ВД и контрольной группой, *$p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Возраст появления первых двигательных нарушений составил 125,8 ± 27,9 дня (среднее ± СО) в контрольной группе (n = 18), 137,9 ± 36,1 дня в группе НД (n = 13) и 153,5 ± 38,7 дня в группе ВД (n = 14). Однофакторный дисперсионный анализ не выявил статистически значимых общих различий между группами ($F(2,42) = 2,617$; $p = 0,0849$) (см. рисунок 44б). Длительность симптоматической стадии в контрольной группе составила 14,39 ± 5,36 дня (n = 18). В группе НД этот параметр значимо не изменился (15,38 ± 3,36 дня; разность средних 1,00 дня; 95% ДИ −3,08–5,07; скорректированный $p = 0,8047$), тогда как в группе ВД он значимо увеличился до 18,71 ± 5,36 дня (однофакторный ANOVA, $F(2,42)=3,262$, $p = 0,0482$; разность средних 4,33 дня; 95% ДИ 0,34–8,31; скорректированный $p = 0,0317$) (см. рисунок 44в).

Отсутствие достоверного сдвига возраста начала двигательных нарушений при одновременном увеличении продолжительности жизни и длительности симптоматической стадии свидетельствует о том, что эффект rAAV-Hsp70 реализуется преимущественно после манифестации заболевания. Таким образом, возможно, в данной экспериментальной схеме Hsp70 действует не как фактор, предотвращающий запуск патологического каскада, а как модификатор скорости прогрессирования уже развившегося БАС-подобного фенотипа.

3.9 Дозозависимое и регионарно-избирательное влияние rAAV-Hsp70

Анализ симптомов со стороны отдельных конечностей выявил избирательное положительное действие высокой дозы rAAV-Hsp70 (ВД) на течение симптоматической стадии. В сравнении с контролем, высокая доза вирусного препарата значительно увеличила продолжительность ограниченной подвижности левой и правой задних конечностей (разность средних 3,26 дня; 95% ДИ 0,53–5,99; скорректированный $p = 0,0158$; и 3,64 дня; 95% ДИ 0,90-6,37; скорректированный $p = 0,0063$, соответственно; двухфакторный ANOVA с пост-тестом Даннетта), а также паралича левой задней конечности (разность средних 2,98 дня; 95% ДИ 0,25–5,72; скорректированный $p = 0,0297$). Для паралича правой задней конечности наблюдалась тенденция к увеличению (разность средних 2,53 дня; 95% ДИ − 0,20–5,27;

скорректированный $p = 0{,}0739$), не достигшая статистической значимости после коррекции на множественные сравнения. Статистически значимых различий между группами для передних конечностей или для других сочетаний симптомов и конечностей обнаружено не было. В группе низкой дозы не наблюдалось значимых отличий от контроля ни по одному из оценённых параметров (рисунок 45).

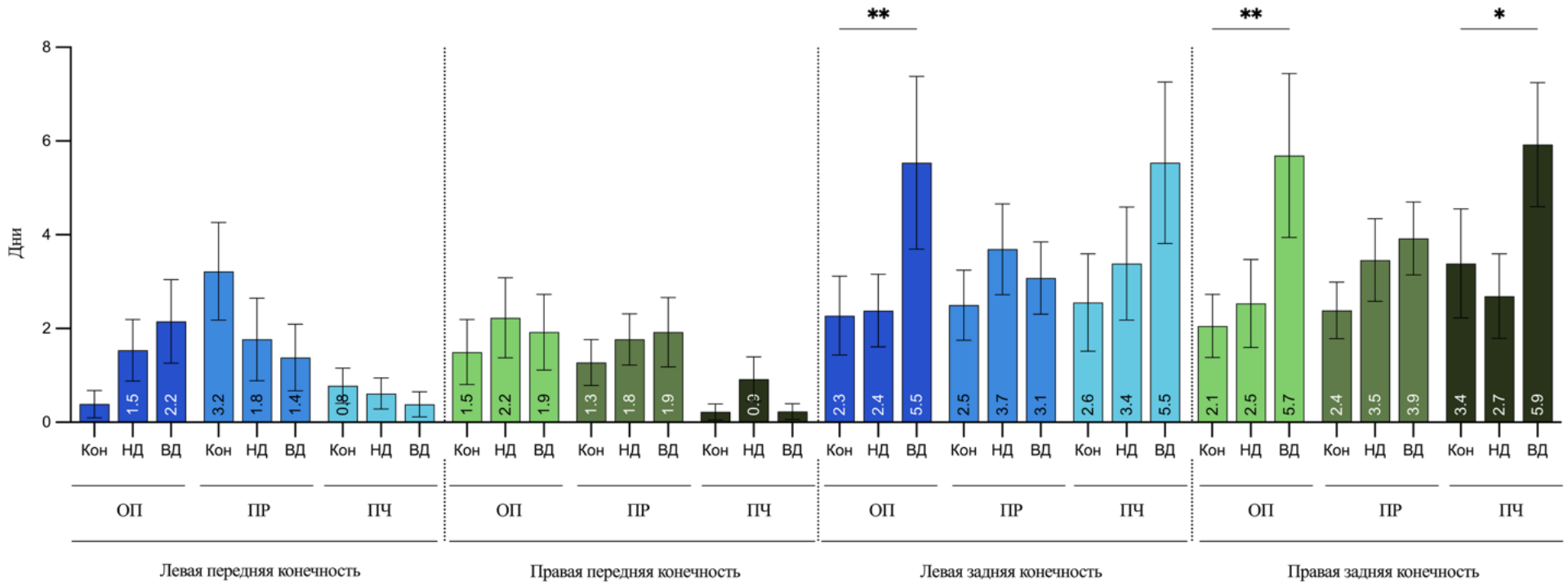


Рисунок 45 – Влияние однократного ретроорбитального введения rAAV-Hsp70 на длительность отдельных проявлений БАС-подобного фенотипа у трансгенных мышей S-FUS(1-359). Продолжительность отдельных двигательных нарушений (ограниченная подвижность, парез, паралич) для каждой конечности (среднее ± SEM). Воздействие высокой дозой избирательно увеличивало длительность ограниченной подвижности левой и правой задних конечностей (разность средних 3,26 дня; 95% ДИ 0,53–5,99; скорректированный $p = 0{,}0158$; и 3,64 дня; 95% ДИ 0,90–6,37; скорректированный $p = 0{,}0063$, соответственно) и паралича левой задней конечности (разность средних 2,98 дня; 95% ДИ 0,25–5,72; скорректированный $p = 0{,}0297$) по сравнению с контрольной группой (двухфакторный ANOVA с пост-тестом Даннетта). Для паралича правой задней конечности наблюдалась тенденция (разность средних 2,53 дня; 95% ДИ −0,20–5,27; скорректированный $p = 0{,}0739$), не достигшая статистической значимости после коррекции на множественные сравнения. Кон – контроль с введением растворителя; НД – низкая доза rAAV-Hsp70 (5×10^{10} гк/мышь); ВД – высокая доза rAAV-Hsp70 (5×10^{11} гк/мышь). Значимые различия между группой ВД и контрольной группой, * $p < 0{,}05$, ** $p < 0{,}01$

3.10 Динамика изменения массы тела мышей дикого типа после вдения AAV-Hsp70

Для оценки потенциальных неспецифических эффектов вирусного препарата на общее состояние животных проводили мониторинг массы тела у мышей дикого типа (ДТ), получавших rAAV-Hsp70 в низкой (НД ДТ, n = 5) и высокой (ВД ДТ, n = 5) дозах, в сравнении с контрольной группой (интактные мыши ДТ, n = 6). Массу тела регистрировали в 18 временных точках, как представлено на рисунке 44. Моделирование со смешанными эффектами (REML) не выявило значимого влияния фактора группы (p = 0,95) или взаимодействия группа × время (p = 0,052) на массу тела. Попарные сравнения в каждой временной точке не показали статистически значимых различий между группами ни в один из сроков наблюдения. Таким образом, однократное ретроорбитальное введение rAAV-Hsp70 в любой из доз не влияло на массу тела у нетрансгенных мышей дикого типа, что может косвенно свидетельствовать о хорошей переносимости вектора и отсутствии системной токсичности (рисунок 46).

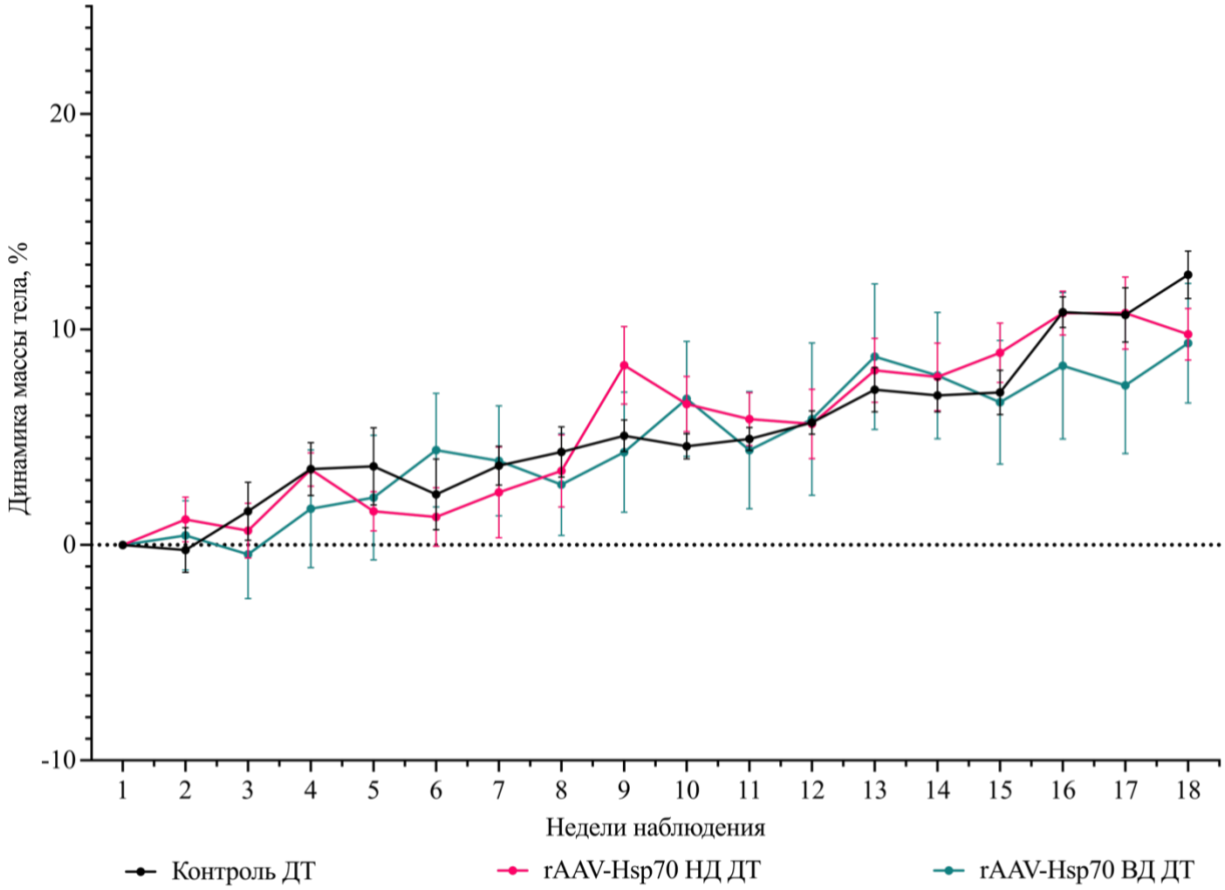


Рисунок 46 – Влияние однократного ретроорбитального введения rAAV-Hsp70 на массу тела у мышей дикого типа. Динамика массы тела (% от исходной массы тела на день включения в эксперимент) у мышей дикого типа (не трансгенных): группа контроля (n = 6), группа rAAV-Hsp70 НД (n = 5) и группа rAAV-Hsp70 ВД (n = 5) (p = 0,95 для фактора группы; p = 0,052 для взаимодействия группа × время; модель смешанных эффектов, REML). Данные представлены как среднее значение ± SEM. ДТ – дикий тип, ВД – высокая доза, НД – низкая доза

Следует подчеркнуть, что оценка безопасности в настоящей работе была ограничена мониторингом массы тела и общего состояния животных дикого типа. Гистологический анализ внутренних органов, оценка цитокинового профиля и детальное исследование иммунного ответа не проводились. Поэтому полученные данные следует рассматривать как свидетельство хорошей переносимости rAAV-Hsp70 в условиях проведённого эксперимента, но не как завершённую токсикологическую характеристику препарата.

3.11 Динамика изменения массы тела трансгенных мышей линии S-FUS(1-359) после введения rAAV-Hsp70

Анализ массы тела трансгенных животных от момента появления первых двигательных нарушений до гибели выявил значимое влияние как фактора времени от начала симптомов ($F(3.118, 99.42) = 143.3$, $p < 0{,}0001$), так и фактора группы лечения ($F(2, 42) = 9.421$, $p = 0{,}0004$), а также их взаимодействия ($F(36, 574) = 3.933$, $p < 0{,}0001$; модель со смешанными эффектами, REML). У животных всех групп наблюдалась прогрессирующая потеря массы тела на протяжении всей симптоматической стадии. Масса тела животных, получавших высокую дозу rAAV (ВД), была значительно больше, чем у контролей, начиная с 5-го дня и в ряде последующих временных точек вплоть до терминальной стадии ($p < 0{,}05$, пост-тест Фишера LSD). Эти данные указывают на то, что высокая доза rAAV-Hsp70 замедляет скорость симптоматической потери массы тела, что согласуется с благоприятными эффектами rAAV-Hsp70 на выживаемость и удлинение симптоматической стадии (рисунок 47).

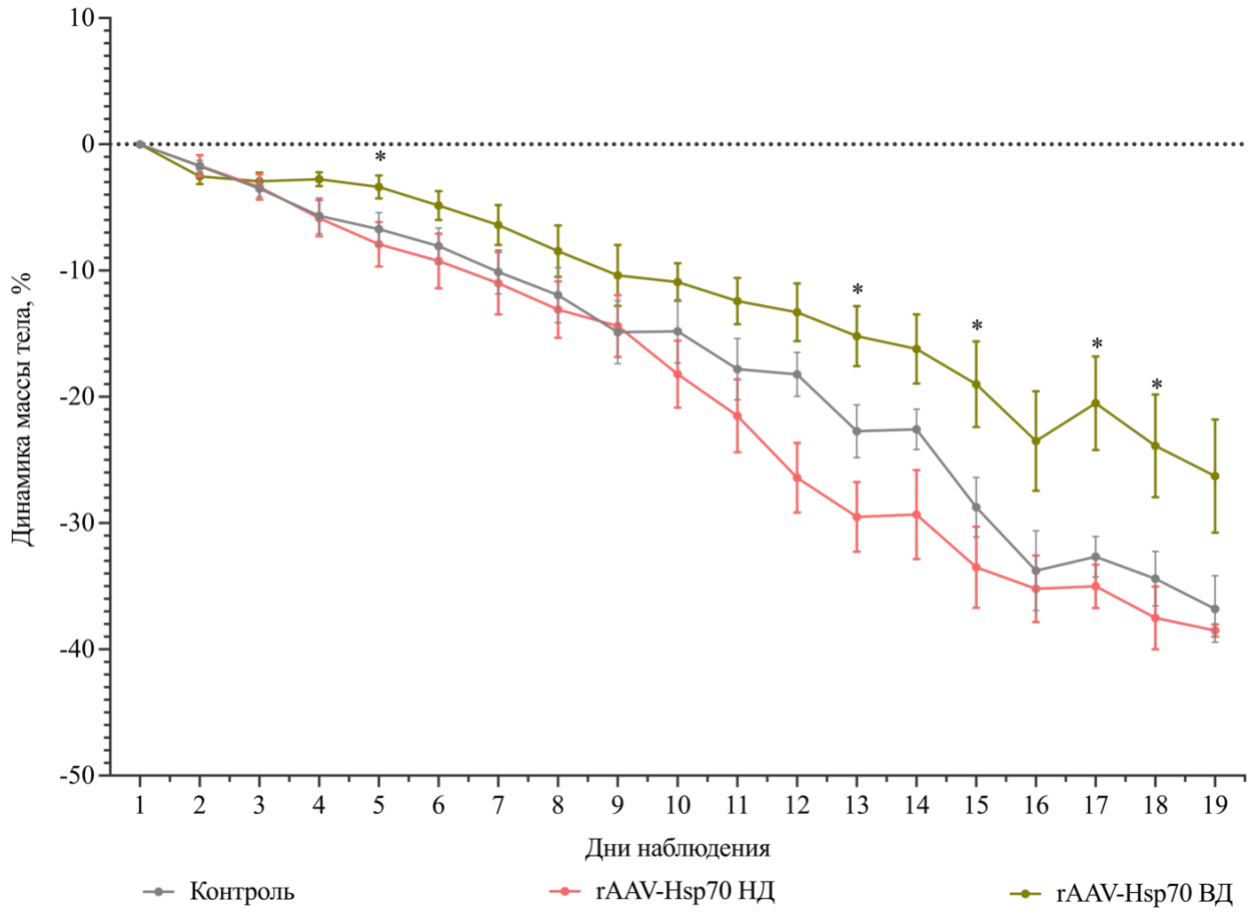


Рисунок 47 – Влияние однократного ретроорбитального введения rAAV-Hsp70 на массу тела у трансгенных мышей S-FUS(1–359). Динамика массы тела (% от массы тела в первый день появления БАС-подобных симптомов) у трансгенных мышей S-FUS(1-359) на симптоматической стадии: группа контроля (n = 18), группа rAAV-Hsp70 НД (n = 13) и группа rAAV-Hsp70 ВД (n = 14) (модель смешанных эффектов, REML: эффект времени $p < 0{,}0001$, эффект группы $p = 0{,}0004$, взаимодействие $p < 0{,}0001$). Данные представлены как среднее значение ± SEM. Значимые различия между группой ВД и контрольной группой, * $p < 0{,}05$, ** $p < 0{,}01$, *** $p < 0{,}001$, критерий Фишера (LSD)

3.12 Отсутствие значимого влияния rAAV-Hsp70 на двигательные функции трансгенных мышей S-FUS(1-359)

В тесте на силу хвата передних конечностей все группы демонстрировали прогрессирующее снижение показателей с течением времени. Анализ с помощью модели смешанных эффектов (REML) выявил значимое влияние фактора времени ($F(4{,}672;\ 104{,}1)=13{,}48$, $p < 0{,}0001$), но не выявил значимого влияния фактора группы ($F(2,\ 38)=0{,}5648$, $p = 0{,}5732$) или взаимодействия группа × время ($F(28,\ 312)=1{,}478$, $p = 0{,}0602$). По сравнению с исходным уровнем (1-я неделя), контрольная группа показала значимое снижение силы хвата только на 13-й неделе ($p = 0{,}0484$, критерий Фишера LSD). В группе низкой дозы (НД) значимое снижение наблюдалось уже со 2-й недели ($p = 0{,}0002$) и сохранялось на 4–7, 9–12 и 14-й неделях ($p < 0{,}05$ для всех) (рисунок 48).

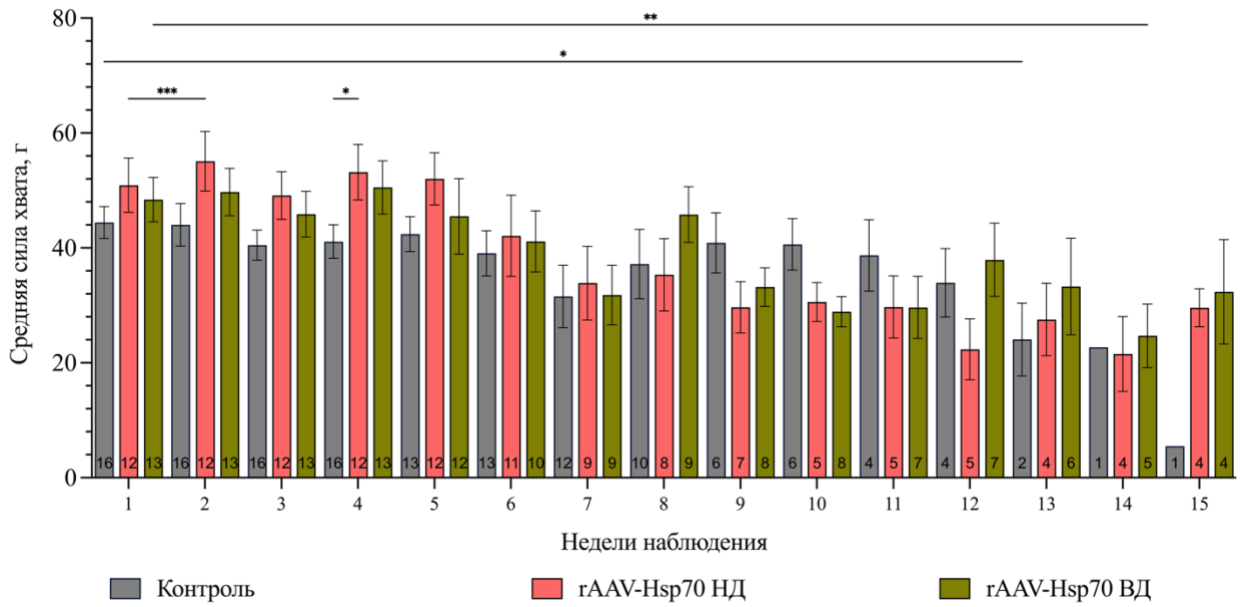


Рисунок 48 – Влияние однократного ретроорбитального введения rAAV-Hsp70 на мышечную силу в тесте сила хвата у трансгенных мышей S-FUS(1–359). Тест на силу хвата передних конечностей (фактор группы, p = 0,5732; взаимодействие группы × время, p = 0,0602; модель со смешанными эффектами, REML). Цифры внизу столбцов количество животных в каждой группе. Данные представлены среднее значение ± SEM. Значимых межгрупповых различий не выявлено

Следует отметить, что данное различие носило единичный характер и не сопровождалось устойчивым межгрупповым эффектом по всему периоду наблюдения. С учётом отсутствия значимого влияния фактора группы, большого числа временных точек и отсутствия аналогичного ухудшения по другим интегральным показателям этот результат следует интерпретировать, вероятно, как единичное различие, не указывающее на воспроизводимый неблагоприятный эффект низкой дозы. В группе высокой дозы (ВД) значимое снижение было зафиксировано на 7, 9, 10 и 14-й неделях ($p < 0,05$ для всех). Межгрупповые сравнения выявили единственное значимое различие на 4-й неделе, где животные из группы НД показали худшие результаты, чем контроль (разность средних −12,09 г; 95% ДИ −23,93 до −0,26; $p = 0,0457$). Никакие другие межгрупповые различия не достигли статистической значимости.

В тесте «перевёрнутая сетка» модель смешанных эффектов (REML) не выявила значимого влияния фактора группы ($F(2, 35)=0,5338$, $p = 0,5911$), фактора времени ($F(5,715; 116,7)=1,024$, $p = 0,4114$), а также значимого взаимодействия группа × время ($F(28, 286)=1,320$, $p = 0,1347$) (рисунок 49).

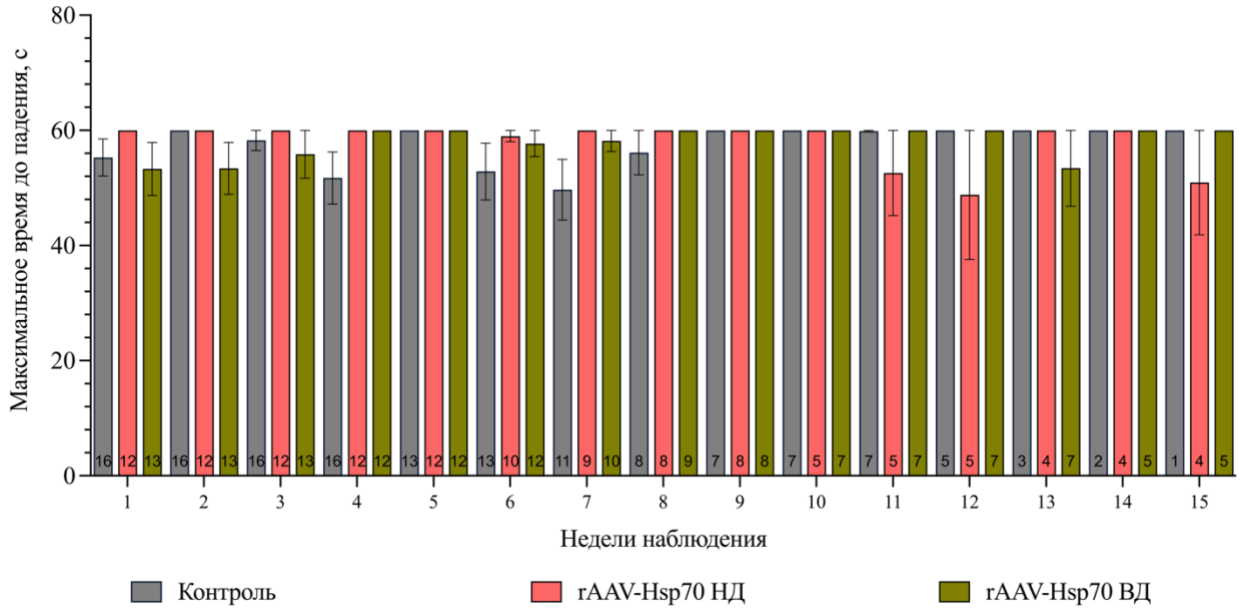


Рисунок 49 – Влияние однократного ретроорбитального введения rAAV-Hsp70 на общую координацию в тесте перевернутая сетка у трансгенных мышей S-FUS(1-359). Тест на перевернутой решетке (время удержания, с) (фактор группы, p = 0,5911; взаимодействие группы × время, p = 0,1347; модель со смешанными эффектами, REML). Цифры внизу количество животных в каждой группе на соответствующей неделе наблюдения. Данные представлены как среднее ± SEM. Значимых межгрупповых различий не выявлено

Попарные пост-тестовые сравнения в отдельные временные точки также не показали значимых различий между группами (p>0,05 для всех, критерий Фишера LSD). Таким образом, эффект однократного ретроорбитального введения rAAV-Hsp70 не улучшил результаты в тесте «перевёрнутая сетка» и не предотвратила прогрессирующее снижение силы хвата передних конечностей, наблюдаемое у трансгенных мышей S-FUS(1-359).

Отсутствие значимых межгрупповых различий в тестах силы хвата и перевёрнутой сетки не противоречит увеличению выживаемости. Эти тесты отражают интегральное функциональное состояние животного на симптоматической стадии, когда часть двигательных нейронов уже повреждена, а компенсаторные возможности двигательной системы ограничены. Поэтому эффект рекомбинантного Hsp70 в данной модели может проявляться не как восстановление утраченной функции, а как замедление дальнейшего прогрессирования патологического процесса.

Краткие выводы по главе 3.3

1. **В шейном отделе спинного мозга подтверждена экспрессия экзогенного Hsp70 с FLAG-меткой** после однократного системного введения rAAV-Hsp70. В грудном отделе спинного мозга иммуногистохимический анализ выявил локализацию Hsp70 преимущественно в нейронах (совместная локализация с маркером нейронов NeuN) и не обнаруживается в микроглии (Iba1) и астроцитах (GFAP), что позволяет предположить преимущественно нейрональную направленность трансдукции в условиях данного исследования.

2. **Однократное ретроорбитальное введение rAAV-Hsp70 в высокой дозе (5×10^{11} геномных копий/мышь) достоверно увеличивает продолжительность жизни трансгенных мышей S-FUS(1-359).** Медиана выживаемости увеличивается на 33% (со 128 до 170,5 дней), средняя продолжительность жизни – на 23% (с 140,2 до 172,2 дней). Низкая доза (5×1010) даёт лишь тенденцию к улучшению, не достигающую статистической значимости.

3. **Введение rAAV-Hsp70 не сопровождалось выраженными признаками системной токсичности у мышей дикого типа.** Оценка уровней экспрессии генов провоспалительных цитокинов *Il-1b*, *Il-6* и *Tnf* в гиппокампе через 150 суток после введения показала отсутствие хронического нейровоспалительного ответа. Биохимический анализ сыворотки крови через 150 суток после введения не выявил статистически значимых различий между группами по активности АЛТ, АСТ, ЩФ и КФК, концентрации мочевины и креатинина, коэффициенту де Ритиса и их соотношению все показатели оставались в пределах референсных диапазонов для линии CD-1. Это свидетельствует о хорошей переносимости препарата по использованным критериям оценки.

4. **Эффект вирусного препарата реализуется за счёт замедления прогрессирования заболевания после дебюта симптомов, а не отсрочки их возникновения.** Возраст начала двигательных нарушений достоверно не меняется, тогда как длительность симптоматической стадии значимо увеличивается в группе высокой дозы (с 14,4 до 18,7 дней).

5. **Высокая доза rAAV-Hsp70 замедляет потерю массы тела в симптоматической стадии.** Масса тела животных группы ВД достоверно выше, чем в контроле, начиная с 5-го дня после дебюта симптомов и до терминальной стадии.

6. **Избирательное влияние на задние конечности.** Высокая доза вирусного препарата значимо увеличивает продолжительность ограниченной подвижности и паралича задних конечностей (но не передних), что указывает на регионарную гетерогенность нейропротекторного эффекта.

7. **В тестах на силу хвата передних конечностей и перевёрнутую сетку значимых межгрупповых различий не выявлено.** Все группы демонстрировали прогрессирующее ухудшение, что может отражать недостаточность оставшегося пула двигательных нейронов для восстановления сложных моторных актов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

4.1 Пороговая модуляция FUS-протеинопатии

В настоящем исследовании впервые показано, что однократное ретроорбитальное введение рекомбинантного AAV-вектора, кодирующего форму Hsp70 человека (*HSPA1A*), трансгенным мышам S-FUS(1-359) приводит к дозозависимому увеличению выживаемости, удлинению симптоматической стадии и замедлению потери массы тела, при этом не влияя на возраст начала двигательных нарушений и не вызывая признаков системной токсичности у животных дикого типа. В качестве носителя для доставки гена *HSPA1A* был использован химерный серотип AAV-PHP.eB, который, как было показано, эффективно преодолевает гематоэнцефалический барьер у мышей и трансдуцирует клетки центральной нервной системы после периферического введения [253].

При этом эффект носит не классический линейный, а пороговый характер: низкая доза (5×10^{10} геномных копий) не даёт статистически значимого эффекта, тогда как высокая (5×10^{11}) увеличивает медиану выживаемости на 33%. Это может указывать на существование критического уровня экспрессии белка Hsp70, возможно, ниже которого нейропротекция не запускается. Отсутствие эффекта низкой дозы согласуется с литературными данными о том, что эффективность Hsp70 зависит не только от его концентрации, но и от способности формировать функциональные кластеры для связывания с патологическими агрегатами FUS [36, 309, 310]. Возможно, низкая доза не обеспечивает достаточного внутриклеточного пула шаперона для эффективного вмешательства в процессы агрегации. Увеличение выживаемости на 33% в агрессивной модели быстропрогрессирующей протеинопатии сопоставимо по величине с эффектами, рассматриваемыми как клинически значимые в исследованиях терапии БАС у человека; вместе с тем такая интерпретация требует осторожности ввиду различий между доклинической моделью и клиническим течением заболевания [137, 311–313].

Отсутствие эффекта при низкой дозе, вероятно, не связано с неэффективной доставкой, поскольку, согласно литературным данным [300] и данным, полученным в рамках диссертационной работы (синтез FLAG-меченого Hsp70 в нейронах, разделы 3.4 и 3.5), доза 5×10^{10} геномных копий обеспечивает трансдукцию ЦНС. Вероятно, этой концентрации шаперона недостаточно для преодоления патологической нагрузки, что указывает на существование порогового уровня Hsp70, необходимого для нейропротекции. Установленный пороговый характер эффекта определяет требования к уровню экспрессии трансгена, необходимому для достижения терапевтического действия, что критически важно для возможного планирования будущих доклинических исследований.

4.2 Предполагаемый механизм действия Hsp70

Обнаруженное нами снижение экспрессии генов семейства Hsp70 на симптоматической стадии FUS-протеинопатии отражает истощение эндогенной шаперонной системы по мере прогрессирования модельного заболевания. Это делает экзогенное восполнение Hsp70 патогенетически обоснованным подходом: в условиях, когда собственная шаперонная защита нейронов ослабевает, дополнительная доставка Hsp70 способна, предположительно, компенсировать её дефицит и, возможно замедлить накопление токсичных агрегатов.

Известно, что нейропротекторный эффект Hsp70 связан с тремя механизмами, которые образуют многоуровневую систему защиты: (1) предотвращение первичной агрегации – блокирование патологического перехода жидких белковых агрегатов (в том числе содержащих FUS) в гелеобразное или амилоидное состояние; (2) АТФ-зависимая разборка уже сформированных агрегатов (дезагрегация) с помощью механизма энтропийного вытягивания; (3) направление аберрантных белков в протеасомную и аутофагическую системы деградации [171, 199, 314]. В данном исследовании невозможно напрямую дифференцировать эти механизмы. Тем не менее, особенности эксперимента позволяют предположить, что наиболее реалистичным является первый механизм – предотвращение *de novo* агрегации. Ключевым аргументом в пользу этого предположения служит время начала терапии. Препарат вводили животным в возрасте 58-60 дней. К этому моменту у трансгенных S-FUS(1-359) мышей, согласно литературным данным, уже накоплено значительное количество цитоплазматических агрегатов FUS, а существенная часть двигательных нейронов погибла или находится в состоянии тяжёлой дисфункции [263, 315]. Оставшиеся нейроны функционируют в условиях выраженного протеостатического стресса: энергетический баланс нарушен (наблюдается дефицит АТФ), а убиквитин-протеасомная и аутофагосоная системы перегружены и не справляются с клиренсом патологических белков [83, 316]. В такой ситуации АТФ-зависимая дезагрегация вряд ли может быть эффективной. Механизм «энтропийного вытягивания» требует множественных циклов гидролиза АТФ для работы Hsp70 и кооперативного действия всей шаперонной сети (Hsp40, Hsp110) [200, 314]. При энергетическом дефиците и истощении клеточных ресурсов этот процесс становится энергетически невыгодным и маловероятным.

Важным дополнением к гипотезе о непосредственном действии Hsp70 в нейронах стали результаты иммуногистохимического анализа. Обнаруженная колокализация FLAG-меченого Hsp70 с маркёром нейронов NeuN подтверждает, что системно введённый вирусный препарат обеспечивает экспрессию трансгена непосредственно в нейронах – клетках, являющихся первичной мишенью патологического процесса при FUS-протеинопатии. В то же время отсутствие колокализации Hsp70 с маркёром микроглии Iba1 в исследованных срезах не позволяет сделать однозначный вывод о вовлечённости микроглии в наблюдаемый эффект.

Однако, это не исключает возможности опосредованного влияния экспрессии белка Hsp70 через другие типы клеток или периферические ткани. Таким образом, можно предположить, что основное влияние экзогенного Hsp70 в условиях данного эксперимента реализуется непосредственно в нейронах. Отсутствие полной колокализации Hsp70 с NeuN (не во всех нейронах был обнаружен трансген Hsp70 методом ИГХ) также согласуются с пороговым характером эффекта. Часть нейронального пула остаётся без дополнительной шаперонной поддержки.

Механизм направления в системы деградации (через адаптеры CHIP и BAG3) также проблематичен, поскольку убиквитин-протеасомная система и макроаутофагия уже работают на пределе или дают сбои вследствие хронической перегрузки, что характерно для поздних стадий нейродегенеративных заболеваний [210, 212, 213].

Напротив, предотвращение *de novo* агрегации в ещё живых клетках не требует больших затрат АТФ и не зависит от перегруженных путей деградации. Как было показано в литературе, Hsp70 способен действовать как молекулярный «буфер», встраиваясь в жидкие конденсаты FUS и TDP-43 и поддерживая их динамическую подвижность, предотвращая необратимый переход в твёрдое гелеобразное состояние [36, 186]. Этот механизм способен замедлить дальнейшую гибель нейронов, но, по-видимому, не может восстановить уже утраченные функции, что согласуется с отсутствием улучшения в тестах на силу хвата и перевёрнутую сетку при сохранении положительного эффекта на выживаемость и длительность симптоматической стадии.

Таким образом, совокупность данных позволяет предположить, что эффект rAAV-опосредованной экспрессии белка Hsp70 в модели S-FUS(1-359) возможно связан с замедлением накопления новых токсичных агрегатов FUS в оставшихся жизнеспособных нейронах, что обеспечивает увеличение продолжительности жизни за счёт удлинения симптоматической стадии, но не отсрочки дебюта заболевания. Для прямого подтверждения этой гипотезы необходимы дальнейшие исследования с анализом агрегации FUS, активности шаперонной сети и состояния систем деградации в тканях ЦНС после введения вирусного препарата.

Важным аргументом в пользу специфичности наблюдаемого эффекта служит отсутствие признаков хронического нейровоспаления и системной токсичности после введения rAAV-Hsp70 у мышей дикого типа. Оценка экспрессии генов провоспалительных цитокинов *Il1b, Il6* и *Tnf alfa* в гиппокампе через 150 суток после введения препарата не выявила статистически значимого повышения их уровня. При этом Hsp70, посредством FLAG-метки фиксировался в ЦНС животных. Биохимический анализ сыворотки крови также не выявил различий между группами по активности АЛТ, АСТ, ЩФ и КФК, концентрации мочевины и креатинина, коэффициенту де

Ритиса и их соотношению; все показатели оставались в пределах референсных диапазонов для линии CD-1. Это позволяет предположить, что терапевтический эффект не обусловлен неспецифическим иммунным ответом, вызванным самим вирусным препаратом, и не сопровождается субклиническим повреждением печени, почек или мышц. Дополнительным подтверждением специфичности служит преимущественно нейрональная локализация рекомбинантного Hsp70 (колокализация с NeuN) при отсутствии значимого сигнала в микроглии (Iba1) и астроцитах (GFAP), что указывает на прямое действие шаперона в нейронах, а не на опосредованный эффект через глиальные клетки.

Механизм нейропротекторного действия Hsp70 в данной работе напрямую не анализировался. В частности, не проводилась количественная оценка агрегации FUS в тканях, состояния эндогенной шаперонной сети, активности протеасомной деградации и аутофагии. Поэтому предположение о преимущественном предотвращении *de novo* агрегации FUS следует рассматривать как интерпретационную гипотезу, основанную на фенотипических данных и известных функциях Hsp70, а не как окончательно доказанный механизм.

4.3 Эффект rAAV-Hsp70 – остановка прогрессии или смещение дебюта вправо?

Одним из наиболее важных и неочевидных результатов настоящего исследования является демонстрация того, что эффект rAAV-опосредованной экспрессии белка Hsp70 реализуется не за счёт отсрочки возникновения двигательных нарушений, а через замедление прогрессирования заболевания после его клинической манифестации. Возраст начала первых двигательных нарушений при общем межгрупповом сравнении достоверно не изменился (ANOVA $F(2,42) = 2{,}617$, $p = 0{,}0849$). В группе высокой дозы наблюдалась тенденция к более позднему дебюту (в среднем на 27,7 дня), однако это различие не достигло статистической значимости при попарном сравнении (скорректированное $p = 0{,}0510$). Таким образом, этот результат не может рассматриваться как самостоятельное доказательство сдвига возраста начала заболевания. Напротив, длительность симптоматической стадии в группе высокой дозы значимо увеличилась с 14,4 до 18,7 дней ($p = 0{,}0334$), а медиана выживаемости возросла на 33% (со 128 до 170,5 дней). Эти данные указывают на то, что увеличение продолжительности жизни обусловлено прежде всего замедлением патологического процесса после появления симптомов.

Данное наблюдение согласуется с естественным течением заболевания у мышей S-FUS(1-359), которое было охарактеризовано ранее в ретроспективном анализе (раздел 3.1). В большой когорте трансгенных животных ($n = 505$) была обнаружена сильная положительная корреляция между возрастом начала симптомов и общей продолжительностью жизни ($R^2 = 0{,}91$-$0{,}99$, $p < 0{,}0001$ для всех групп). Иными словами, в физиологических условиях основным предиктором того, сколько проживёт животное, является время наступления заболевания, а не его длительность. Длительность симптоматической стадии, напротив,

демонстрировала слабую корреляцию с выживаемостью (R^2=0,02–0,22). Это означает, что в отсутствие каких-либо терапевтических интервенций продолжительность жизни животных в первую очередь определяется возрастом дебюта симптомов, тогда как длительность симптоматической стадии выступает вторичным фактором. Хотя абсолютная длительность симптоматической стадии может варьировать между поколениями (в ретроспективном анализе – от 8 до 20 дней), внутри отдельных когорт скорость прогрессирования после дебюта, в целом, остаётся стабильной. Поскольку внутри каждой когорты скорость прогрессирования после дебюта остаётся стабильной, животные с более ранним началом симптомов закономерно погибают раньше, а с более поздним – позже, что и обусловливает сильную корреляцию между возрастом начала симптомов и общей выживаемостью. В группе высокой дозы rAAV-Hsp70 отсутствовал достоверный сдвиг возраста начала двигательных нарушений, однако длительность симптоматической стадии значимо увеличилась (с 14,4 до 18,7 дней; p = 0,0334), а медианная выживаемость возросла на 33% (с 128 до 170,5 дней). Это позволяет предположить, что эффект терапии реализуется преимущественно через замедление прогрессирования заболевания после его манифестации, а не через отсрочку манифестации патологического процесса. Отсутствие значимого влияния на сроки начала заболевания, вероятно, отражает выбранное время терапевтического вмешательства. К возрасту, когда был введён препарат, в двигательных нейронах трансгенных мышей уже накапливается значительное количество FUS-положительных агрегатов, вероятно, приближая клетку к порогу необратимой дисфункции [263, 315]. Вероятно, на этой стадии предотвратить запуск патологического каскада уже невозможно – нейродегенеративный процесс инициирован. Однако, возможно, что повышение внутриклеточного пула Hsp70 способно замедлить дальнейшую гибель оставшихся нейронов, что проявляется в удлинении симптоматической стадии и увеличении общей продолжительности жизни.

Из вышесказанного вытекает важное следствие для будущих терапевтических стратегий: для воздействия на инициацию заболевания и дополнительного усиления терапевтического эффекта может потребоваться более раннее начало лечения – вскоре после отъёма животного, когда агрегация FUS ещё не достигла некого критического порога. В то же время, даже при позднем начале терапии AAV-опосредованная доставка Hsp70 обеспечивает значимый эффект, что согласуется с концепцией «терапевтического окна» для шаперон-ориентированных вмешательств, ограниченного периодом до полного истощения протеостатических систем клетки [33, 209, 241]. Таким образом, основной вывод заключается в том, что нейропротекторный эффект Hsp70 в модели FUS-протеинопатии реализуется не как «смещение дебюта вправо», а как «замедление прогрессии» после того, как заболевание уже манифестировало. Это концептуально отличает механизм действия Hsp70 на данной модели от классических нейропротекторных

вмешательств, которые часто отодвигают дебют болезни, но не влияют на её течение после начала симптомов [107, 197, 209].

4.4 Регионарная гетерогенность эффекта и функциональные тесты

Анализ продолжительности двигательных нарушений по отдельным конечностям выявил избирательное действие высокой дозы rAAV-Hsp70. В группе высокой дозы значимо увеличилась длительность ограниченной подвижности и паралича задних конечностей (на 3,3 и 3,0 дня соответственно), тогда как для передних конечностей статистически значимых различий обнаружено не было. Этот феномен регионарной избирательности может быть обусловлен несколькими не исключающими друг друга причинами.

Во-первых, AAV-серотип PHP.eB, хотя и обеспечивает широкую трансдукцию ЦНС после системного введения, может демонстрировать различную эффективность трансдукции разных популяций нейронов [253, 317]. Известно, что эффективность проникновения через гематоэнцефалический барьер и трансдукции зависит от регионарных особенностей сосудистого русла и рецептора LY6A [249, 250]. Возможно, нейроны, иннервирующие задние конечности, были трансдуцированы более эффективно, чем нейроны, контролирующие передние конечности. Во-вторых, различные пулы двигательных нейронов могут обладать разной уязвимостью к FUS-опосредованной токсичности [318]. Возможно, что в трансгенной модели нейроны, иннервирующие задние конечности, сохраняют большую чувствительность к шаперонной поддержке, в то время как нейроны передних конечностей уже утратили способность к восстановлению к моменту начала терапии. Кроме того, результаты иммуногистохимического анализа показали, что продукт экспрессии трансгена был обнаружен не во всех нейронах даже в пределах одного клеточного пула: часть NeuN-положительных клеток не содержала FLAG-метки. Это может связано с ограничениями при иммуноокрашивании или же свидетельствовать о том, что дополнительная шаперонная поддержка доступна не всем клеткам и, возможно, является одной из причин ограниченного восстановления двигательных функций, выявленного в поведенческих тестах в рамках настоящего исследования.

Важно отметить, что несмотря на избирательное влияние на задние конечности, в функциональных тестах (сила хвата передних конечностей и перевёрнутая сетка) значимых межгрупповых различий не наблюдалось. Отсутствие значимого улучшения двигательных функций в поведенческих тестах в свою очередь может объясняться несколькими факторами. Во-первых, тесты проводились на животных с уже развившимся симптоматическим процессом на стадии, когда компенсаторные возможности ЦНС, вероятно, были в значительной степени истощены. Во-вторых, сила хвата и время удержания на сетке являются относительно грубыми показателями, которые могут не отражать тонкие изменения в моторной координации или выносливости [319, 320]. В-третьих, основной эффект Hsp70, по-видимому, опосредован

сохранением выживаемости двигательных нейронов, а не функциональным восстановлением уже повреждённых клеток [170, 198]. Таким образом, отсутствие выраженного эффекта в тестах силы хвата и перевёрнутой сетки не исключает терапевтического действия rAAV-Hsp70, поскольку основной эффект препарата проявлялся не как восстановление уже нарушенной функции, а как замедление дальнейшего прогрессирования заболевания. Наряду с оценкой эффективности терапии важным компонентом трансляционного потенциала rAAV-Hsp70 является его переносимость, которую в настоящей работе оценивали независимо у мышей дикого типа.

4.5 Переносимость вирусного препарата и возможная периферическая экспрессия

Важным аспектом любой терапевтической стратегии является оценка её безопасности и потенциальных нецелевых эффектов. В настоящем исследовании переносимость rAAV-Hsp70 оценивалась путём мониторинга массы тела у не трансгенных мышей дикого типа, получавших препарат в низкой и высокой дозах. Не было обнаружено значимого влияния введения rAAV-Hsp70 на динамику массы тела ни в одной из доз по сравнению с контрольной группой ($p = 0{,}95$ для фактора группы; $p = 0{,}052$ для взаимодействия группа × время). Эти данные косвенно свидетельствуют об отсутствии выраженных признаков системной токсичности и хорошей переносимости препарата в условиях проведённого эксперимента. Отсутствие изменений массы тела – интегральный показатель, косвенно указывающий на то, что препарат не вызывает выраженных неблагоприятных эффектов, таких как хроническое воспаление, нарушение функции питания или полиорганная дисфункция. Оценка экспрессии генов провоспалительных цитокинов *Il-1b, Il-6* и *Tnf alfa* в гиппокампе мышей дикого типа через 150 суток после введения rAAV-Hsp70 не выявила статистически значимого повышения их уровня, что свидетельствует об отсутствии хронического нейровоспалительного ответа, индуцируемого вирусным препаратом. Вместе с тем гистологический анализ внутренних органов (печени, селезёнки, лёгких, сердца и почек) не проводился, а цитокиновый профиль не оценивался. По этой причине нельзя полностью исключить субклинические иммунные реакции. Однако визуальное наблюдение за животными (активность, состояние шёрстного покрова, отсутствие диареи и других признаков дистресса) не выявило отклонений от нормы ни в одной из групп. Это согласуется с литературными данными о сравнительно низкой иммуногенности AAV-векторов, особенно при введении в ЦНС [242, 243]. Дополнительным свидетельством безопасности вирусного препарата служат результаты биохимического анализа сыворотки крови мышей дикого типа через 150 суток после введения rAAV-Hsp70. Ни по одному из исследованных показателей – активности АЛТ, АСТ, ЩФ и КФК, концентрации мочевины и креатинина, коэффициенту де Ритиса и соотношению мочевина/креатинин – статистически значимых различий между группами выявлено не было. Все значения оставались в пределах референсных

диапазонов для мышей линии CD-1. Отсутствие отклонений по всем исследованным маркерам функции печени, почек и мышц согласуется с данными по массе тела и экспрессии генов цитокинов и указывает на отсутствие системной токсичности препарата в использованных дозах.

Отдельного обсуждения заслуживает вопрос о возможной периферической экспрессии трансгена. Хотя AAV-серотип PHP.eB был разработан для эффективного преодоления гематоэнцефалического барьера и трансдукции клеток ЦНС [249, 250], он не является строго нейроспецифичным. Известно, что AAV-PHP.eB может трансдуцировать также периферические ткани [253, 321]. В настоящем исследовании невозможно утверждать, где именно – в ЦНС, в периферических тканях или в обоих областях происходила экспрессия белка Hsp70. Тем не менее, даже если периферическая экспрессия имела место, она, по-видимому, не приводила к неблагоприятным эффектам, поскольку масса тела и общее состояние животных не изменялись. Более того, нельзя исключать, что периферическая экспрессия белка Hsp70 могла вносить вклад в наблюдаемый нейропротекторный эффект. Известно, что при БАС патологические изменения затрагивают не только двигательные нейроны, но и нервно-мышечные синапсы, а также скелетные мышцы [322, 323]. Однако для проверки этой гипотезы необходимы дополнительные исследования с клеточно-специфической доставкой трансгена. Проведённый в настоящей работе иммуногистохимический анализ спинного мозга показал, что экзогенный белок Hsp70 экспрессируется в нейронах, что подтверждено колокализацией с маркером зрелых нейронов, NeuN. В исследованных образцах колокализация FLAG-сигнала с маркёром микроглии Iba1 не наблюдалась, что не противоречит гипотезе о преимущественно нейрональной экспрессии в ЦНС, однако не исключает возможности низкоуровневой экспрессии в глиальных клетках или в других клетках нервной системы. Это также не исключает возможности периферической экспрессии трансгена в других тканях.

4.6 Ограничения исследования и перспективы

К ограничениям настоящего исследования следует отнести несколько групп факторов. Во-первых, животные получали вирусный препарат в возрасте 58-60 дней, то есть на пресимптоматической стадии, но уже после вероятного начала накопления FUS-положительных агрегатов в нейронах. Поэтому работа не позволяет оценить, насколько более раннее введение rAAV-Hsp70 могло бы повлиять на инициацию патологического процесса.

Во-вторых, в настоящем исследовании не проводилась прямая количественная оценка агрегации FUS, состояния эндогенной шаперонной сети, активности протеасомной деградации и аутофагии. В связи с этим предложенный механизм действия Hsp70 следует рассматривать как интерпретационную гипотезу, основанную на фенотипических данных и литературных сведениях.

В-третьих, оценка безопасности была ограничена мониторингом массы тела, общего состояния мышей дикого типа, биохимическим анализом сыворотки крови и оценкой экспрессии генов ключевых провоспалительных цитокинов в гиппокампе. Биохимический анализ включал маркеры функции печени (АЛТ, АСТ, ЩФ), почек (мочевина, креатинин) и мышц (КФК), что позволило исключить системную токсичность по основным органам-мишеням. Оценка цитокинов позволила исключить хроническую нейровоспалительную активацию как фактор, маскирующий терапевтический эффект. Вместе с тем биохимический анализ был выполнен на малых выборках (n = 3-5), что ограничивает статистическую мощность и не позволяет исключить наличие слабых эффектов. Кроме того, детальный анализ полного цитокинового профиля и иммунного ответа, а также гистологический анализ внутренних органов (печени, селезёнки, лёгких, сердца и почек), не проводились.

В-четвёртых, хотя иммуногистохимический анализ подтвердил экспрессию трансгена в нейронах и отсутствие в микроглии, количественная оценка доли трансдуцированных нейронов не проводилась и не анализировались другие типы клеток ЦНС. Кроме того, клеточно-специфическая доставка трансгена не применялась, поэтому невозможно полностью разделить вклад центральной и периферической экспрессии белка Hsp70 в наблюдаемый эффект.

В-пятых, иммуногистохимический анализ проводился на ограниченном числе срезов грудного отдела спинного мозга и носил качественный характер. Отсутствие колокализации FLAG-сигнала с маркерами микроглии и астроцитов не является количественным доказательством полного отсутствия экспрессии трансгена в этих клеточных популяциях. Для окончательных выводов необходимы дополнительные исследования с применением количественного анализа.

Указанные ограничения определяют направления дальнейших исследований: более раннее начало терапии, количественный анализ агрегации FUS, оценку протеостатических механизмов, анализ двигательных нейронов и нервно-мышечных синапсов, а также исследование экспрессии трансгена в других типах клеток ЦНС и периферических тканях.

ВЫВОДЫ

1. В ЦНС модельных животных при FUS-протеинопатии развивается регион-специфичная дофаминовая дисрегуляция (накопление ДА и его метаболитов в стриатуме при снижении уровня экспрессии *Maob*), указывающая на вклад окислительного стресса в нейрональную дисфункцию; нейровоспаление доминирует в среднем мозге и стриатуме, тогда как в спинном мозге преобладает астроглиоз без цитокинового ответа, что определяет разные механизмы нейродегенерации в разных отделах ЦНС. Наряду с этим ретроспективный анализ фенотипа животных подтвердил, что возраст манифестации симптомов, а не их длительность, является основным предиктором выживаемости. Полученные данные характеризуют линию S-FUS(1-359) как адекватную тест-систему для оценки терапевтических воздействий при FUS-протеинопатии.

2. Установлено истощение эндогенной шаперонной системы при FUS-протеинопатии из-за снижения уровня экспрессии *Hspa1a* и генов семейства Hsp70 на симптоматической стадии, что подтверждает обоснованность выбора экзогенного Hsp70 в качестве потенциального терапевтического агента.

3. Сконструированный rAAV-вектор серотипа PHP.eB обеспечивает доставку гена *HSPA1A* в ЦНС при однократном системном введении, а также длительную экспрессию экзогенного Hsp70 в спинном мозге (не менее 200 дней) и преимущественную нейрональную локализацию его продукта экспрессии, без значимого уровня экзогенного белка в микроглии и астроцитах, что обосновывает его использование для оценки действия Hsp70 на течение FUS-протеинопатии.

4. Однократное системное введение rAAV-Hsp70 мышам дикого типа в высокой и низкой дозах не вызывало изменений биохимических показателей сыворотки крови (активность АЛТ, АСТ, ЩФ и КФК, концентрация мочевины и креатинина, коэффициент де Ритиса, соотношение мочевина/креатинин), не индуцировало экспрессию генов провоспалительных цитокинов (*Il-1b*, *Il-6*, *Tnf alfa*) в гиппокампе через 150 суток после введения и не влияло на динамику массы тела, что свидетельствует об отсутствии системной токсичности и хорошей переносимости препарата, а также о специфичности эффекта экзогенного Hsp70.

5. Эффект rAAV-Hsp70 в модели S-FUS(1-359) носит пороговый характер и реализуется преимущественно через замедление прогрессирования БАС-подобного фенотипа после его манифестации, а не через отсрочку дебюта. Высокая доза увеличивает медиану выживаемости на 33% и длительность симптоматической стадии на 30%, замедляет потерю массы тела и избирательно увеличивает продолжительность двигательных нарушений задних конечностей, не влияя на возраст начала симптомов и результаты функциональных тестов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1 Wilson, D. M., Cookson, M. R., Van Den Bosch, L., Zetterberg, H., Holtzman, D. M., Dewachter, I. Hallmarks of neurodegenerative diseases // Cell. – 2023. – Т. 186, № 4. – С. 693–714.

2 Wang, S., Jiang, Y., Yang, A., Meng, F., Zhang, J. The Expanding Burden of Neurodegenerative Diseases: An Unmet Medical and Social Need // Aging Dis. – 2024.

3 Jack, C. R., Knopman, D. S., Jagust, W. J., Petersen, R. C., Weiner, M. W., Aisen, P. S., Shaw, L. M., Vemuri, P., Wiste, H. J., Weigand, S. D., Lesnick, T. G., Pankratz, V. S., Donohue, M. C., Trojanowski, J. Q. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers // The Lancet Neurology. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 207–216.

4 Simonet, C., Bestwick, J., Jitlal, M., Waters, S., Ben-Joseph, A., Marshall, C. R., Dobson, R., Marrium, S., Robson, J., Jacobs, B. M., Belete, D., Lees, A. J., Giovannoni, G., Cuzick, J., Schrag, A., Noyce, A. J. Assessment of Risk Factors and Early Presentations of Parkinson Disease in Primary Care in a Diverse UK Population // JAMA Neurol. – American Medical Association (AMA), 2022. – Т. 79, № 4. – С. 359.

5 Gwathmey, K. G., Corcia, P., McDermott, C. J., Genge, A., Sennfält, S., De Carvalho, M., Ingre, C. Diagnostic delay in amyotrophic lateral sclerosis // European Journal of Neurology. – 2023. – Т. 30, № 9. – С. 2595–2601.

6 Gadhave, D. G., Sugandhi, V. V., Jha, S. K., Nangare, S. N., Gupta, G., Singh, S. K., Dua, K., Cho, H., Hansbro, P. M., Paudel, K. R. Neurodegenerative disorders: Mechanisms of degeneration and therapeutic approaches with their clinical relevance // Ageing Research Reviews. – 2024. – Т. 99. – С. 102357.

7 Agrawal, M., Biswas, A. Molecular diagnostics of neurodegenerative disorders // Front. Mol. Biosci. – Frontiers, 2015. – Т. 2.

8 Uher, T., Adzima, A., Srpova, B., Noskova, L., Maréchal, B., Maceski, A. M., Krasensky, J., Stastna, D., Andelova, M., Novotna, K., Vodehnalova, K., Motyl, J., Friedova, L., Lindner, J., Ravano, V., Burgetova, A., Dusek, P., Fialova, L., Havrdova, E. K., Horakova, D., Kober, T., Kuhle, J., Vaneckova, M. Diagnostic delay of multiple sclerosis: prevalence, determinants and consequences // Mult Scler. – SAGE Publications, 2023. – Т. 29, № 11–12. – С. 1437–1451.

9 Ghosh, N., Sinha, K., Sil, P. C. A review on the new age methodologies for early detection of Alzheimer's and Parkinson's disease // Basic Clin Pharma Tox. – Wiley, 2024. – Т. 134, № 5. – С. 602–613.

10 Soto, C., Pritzkow, S. Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases // Nature neuroscience. – 2018. – Т. 21, № 10. – С. 1332.

11 Tesco, G., Lomoio, S. Pathophysiology of neurodegenerative diseases: an interplay among axonal transport failure, oxidative stress, and inflammation? // Semin Immunol. – 2022. – Т. 59. – С. 101628.

12 Young, A. L., Marinescu, R. V., Oxtoby, N. P., Bocchetta, M., Yong, K., Firth, N. C., Cash, D. M., Thomas, D. L., Dick, K. M., Cardoso, J., Van Swieten, J., Borroni, B., Galimberti, D., Masellis, M., Tartaglia, M. C., Rowe, J. B., Graff, C., Tagliavini, F., Frisoni, G. B., Laforce, R., Finger, E., De Mendonça, A., Sorbi, S., Warren, J. D., Crutch, S., Fox, N. C., Ourselin, S., Schott, J. M., Rohrer, J. D., Alexander, D. C., The Genetic FTD Initiative (GENFI), Andersson, C., Archetti, S., Arighi, A., Benussi, L., Binetti, G., Black, S., Cosseddu, M., Fallström, M., Ferreira, C., Fenoglio, C., Freedman, M., Fumagalli, G. G., Gazzina, S., Ghidoni, R., Grisoli, M., Jelic, V., Jiskoot, L., Keren, R., Lombardi, G., Maruta, C., Meeter, L., Mead, S., Van Minkelen, R., Nacmias, B., Öijerstedt, L., Padovani, A., Panman, J., Pievani, M., Polito, C., Premi, E., Prioni, S., Rademakers, R., Redaelli, V., Rogaeva, E., Rossi, G., Rossor, M., Scarpini, E., Tang-Wai, D., Thonberg, H., Tiraboschi, P., Verdelho, A., The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI), Weiner, M. W., Aisen, P., Petersen, R., Jack, C. R., Jagust, W., Trojanowki, J. Q., Toga, A. W., Beckett, L., Green, R. C., Saykin, A. J., Morris, J., Shaw, L. M., Khachaturian, Z., Sorensen, G., Kuller, L., Raichle, M., Paul, S., Davies, P., Fillit, H., Hefti, F., Holtzman, D., Mesulam, M. M., Potter, W., Snyder, P., Schwartz, A., Montine, T., и др. Uncovering the heterogeneity and temporal complexity of neurodegenerative diseases with Subtype and Stage Inference // Nat Commun. – Springer Science and Business Media LLC, 2018. – Т. 9, № 1.

13 Chen, P., Zhang, S., Zhao, K., Kang, X., Rittman, T., Liu, Y. Robustly uncovering the heterogeneity of neurodegenerative disease by using data-driven subtyping in neuroimaging: A review // Brain Research. – Elsevier BV, 2024. – Т. 1823. – С. 148675.

14 Bennett, C. F., Krainer, A. R., Cleveland, D. W. Antisense Oligonucleotide Therapies for Neurodegenerative Diseases // Annu. Rev. Neurosci. – Annual Reviews, 2019. – Т. 42, № 1. – С. 385–406.

15 Miller, T. M., Cudkowicz, M. E., Genge, A., Shaw, P. J., Sobue, G., Bucelli, R. C., Chiò, A., Damme, P. V., Ludolph, A. C., Glass, J. D., Andrews, J. A., Babu, S., Benatar, M., McDermott, C. J., Cochrane, T., Chary, S., Chew, S., Zhu, H., Wu, F., Nestorov, I., Graham, D., Sun, P., McNeill, M., Fanning, L., Ferguson, T. A., Fradette, S. Trial of Antisense Oligonucleotide Tofersen for SOD1 ALS // The New England journal of medicine. – N Engl J Med, 2022. – Т. 387, № 12. – С. 1099–1110.

16 Simonato, M., Bennett, J., Boulis, N. M., Castro, M. G., Fink, D. J., Goins, W. F., Gray, S. J., Lowenstein, P. R., Vandenberghe, L. H., Wilson, T. J., Wolfe, J. H., Glorioso, J. C. Progress in gene therapy for neurological disorders // Nat Rev Neurol. – Springer Science and Business Media LLC, 2013. – Т. 9, № 5. – С. 277–291.

17 Wang, L., Ma, L., Gao, Z., Wang, Y., Qiu, J. Significance of gene therapy in neurodegenerative diseases // Front Neurosci. – 2025. – Т. 19. – С. 1515255.

18 Sun, J., Roy, S. Gene-based therapies for neurodegenerative diseases // Nature Neuroscience. – 2021. – Т. 24, № 3. – С. 297–311.

19 U.S. Food & Drug Administration. FDA approves innovative gene therapy to treat pediatric patients with spinal muscular atrophy, a rare disease and leading genetic cause of infant mortality [Электронный ресурс] // FDA. – 2024. – URL: https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-innovative-gene-therapy-treat-pediatric-patients-spinal-muscular-atrophy-rare-disease (дата обращения: 23.07.2025).

20 Imam, F., Saloner, R., Vogel, J. W., Krish, V., Abdel-Azim, G., Ali, M., An, L., Anastasi, F., Bennett, D., Pichet Binette, A., Boxer, A. L., Bringmann, M., Burns, J. M., Cruchaga, C., Dage, J. L., Farinas, A., Ferrucci, L., Finney, C. A., Frasier, M., Hansson, O., Hohman, T. J., Johnson, E. C. B., Kivimaki, M., Korologou-Linden, R., Ruiz Laza, A., Levey, A. I., Liepelt-Scarfone, I., Lu, L., Mattsson-Carlgren, N., Middleton, L. T., Nho, K., Oh, H. S.-H., Petersen, R. C., Reiman, E. M., Robinson, O., Rothstein, J. D., Saykin, A. J., Shvetcov, A., Slawson, C., Smets, B., Suárez-Calvet, M., Tijms, B. M., Timmers, M., Vieira, F., Vilor-Tejedor, N., Visser, P. J., Walker, K. A., Winchester, L. M., Wyss-Coray, T., Yang, C., Bose, N., Lovestone, S., Global Neurodegeneration Proteomics Consortium (GNPC). The Global Neurodegeneration Proteomics Consortium: biomarker and drug target discovery for common neurodegenerative diseases and aging // Nat Med. – 2025. – Т. 31, № 8. – С. 2556–2566.

21 Давыдова, Т. К., Николаева, Т. Я. Боковой амиотрофический склероз в Якутии // Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины. – Россия, Томск: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт кардиологии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, 2007. – Т. 22, № S2. – С. 23–25.

22 Ермилов, Е. А., Исаева, Н. В. Эпидемиология бокового амиотрофического склероза в Красноярском крае // Нервно-мышечные болезни. – 2024. – Т. 13, № 4. – С. 20-29.

23 Cherdak, M. A., Mkhitaryan, E. A., Sharashkina, N. V., Ostapenko, V. S., Isaev, R. I., Seyfedinova, A. B., Runikhina, N. K., Kotovskaya, Y. V., Tkacheva, O. N., Yakhno, N. N. Prevalence of cognitive impairment in older adults in the Russian Federation // Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova. – 2024. – Т. 124, № 4. Vyp. 2. – С. 5–11.

24 Brylev, L., Ataulina, A., Fominykh, V., Parshikov, V., Vorobyeva, A., Istomina, E., Shikhirimov, R., Salikov, A., Zakharova, M., Guekht, A., Beghi, E. The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis in Moscow (Russia) // Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener. – 2020. – Т. 21, № 5–6. – С. 410–415.

25 Боголепова, А. Н., Бровко, Э. В., Гаврилова, С. И., Гатман, М. В., Древаль, Р. О., Иллариошкин, С. Н., Катунина, Е. А., Консон, К., Костюк, Г. П., Котовская, Ю. В., Левин, О. С.,

Литвиненко, И. В., Медведев, В. Э., Мхитарян, Э. А., Незнанов, Г. Н., Онегина, Е. Ю., Парфенов, В. А., Ткачева, О. Н., Федотова, Е. Ю., Щеткина, А. Л., Яхно, Н. Н. Дорожная карта по оказанию помощи пациенту с болезнью Альцгеймера в России в формате экосистемы: текущие потребности, барьеры и возможные решения (резолюция научно-практической встречи экспертов) // Журнал неврологии и Психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2022. – Т. 122, № 7.

26 Путятин, И. А., Катунина, Е. А. Эпидемиология болезни Паркинсона в России и мире // Бюллетень Национального общества по изучению болезни Паркинсона и расстройств движений. – 2026. – Т. 2. – С. 175–184.

27 Seliverstov, Y., Dranitsyna, M., Ivashynka, A., Kravchenko, M., Klyushnikov, S., Illarioshkin, S. Huntington Disease in Russia: an Epidemiological Challenge? // Neurology. – Wolters Kluwer, 2017. – Т. 88, № 16_supplement. – С. P4.323.

28 Alzheimer's Association. Medications for Memory, Cognition & Dementia-Related Behaviors [Электронный ресурс] // www.alz.org. – URL: https://www.alz.org/alzheimers-dementia/treatments/medications-for-memory (дата обращения: 24.06.2026).

29 National Institute on Aging. How Is Alzheimer's Disease Treated? [Электронный ресурс] // National Institute on Aging. – 2023. – URL: https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-treatment/how-alzheimers-disease-treated (дата обращения: 24.06.2026).

30 Berdyński, M., Miszta, P., Safranow, K., Andersen, P. M., Morita, M., Filipek, S., Żekanowski, C., Kuźma-Kozakiewicz, M. SOD1 mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis analysis of variant severity // Scientific reports. – Sci Rep, 2022. – Т. 12, № 1.

31 Zhou, W., Xu, R. Current insights in the molecular genetic pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis // Frontiers in Neuroscience. – 2023. – Т. 17.

32 Kuhn, M. A., Williams, L. M. Amyotrophic Lateral Sclerosis and Motor Neuron Disease // Neurologic and Neurodegenerative Diseases of the Larynx / под ред. Weissbrod, P. A., Francis, D. O. – Cham: Springer International Publishing, 2020. – С. 131–141.

33 Chen, H.-J., Mitchell, J. C., Novoselov, S., Miller, J., Nishimura, A. L., Scotter, E. L., Vance, C. A., Cheetham, M. E., Shaw, C. E. The heat shock response plays an important role in TDP-43 clearance: evidence for dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis // Brain. – 2016. – Т. 139, № 5. – С. 1417–1432.

34 François-Moutal, L., Scott, D. D., Ambrose, A. J., Zerio, C. J., Rodriguez-Sanchez, M., Dissanayake, K., May, D. G., Carlson, J. M., Barbieri, E., Moutal, A., Roux, K. J., Shorter, J., Khanna, R., Barmada, S. J., McGurk, L., Khanna, M. Heat shock protein Grp78/BiP/HspA5 binds directly to TDP-43 and mitigates toxicity associated with disease pathology // Scientific Reports. – 2022. – Т. 12, № 1.

35 Lackie, R. E., Maciejewski, A., Ostapchenko, V. G., Marques-Lopes, J., Choy, W.-Y., Duennwald, M. L., Prado, V. F., Prado, M. A. M. The Hsp70/Hsp90 Chaperone Machinery in Neurodegenerative Diseases // Front. Neurosci. – Frontiers, 2017. – Т. 11.

36 Li, Y., Gu, J., Wang, C., Hu, J., Zhang, S., Liu, C., Zhang, S., Fang, Y., Li, D. Hsp70 exhibits a liquid-liquid phase separation ability and chaperones condensed FUS against amyloid aggregation // iScience. – 2022. – Т. 25, № 6. – С. 104356.

37 Броновицкий, Е. В., Чапров, К. Д., Фуников, С. Ю., Евгеньев, М. Б., Устюгов, А. А. Терапевтический потенциал Hsp70 при БАС и других протеинопатиях: от молекулярных механизмов к генотерапии (обзор) // Научные результаты биомедицинских исследований. – 2026. – Т. 12, № 2. – С. 230–268.

38 Knopman, D. S., Amieva, H., Petersen, R. C., Chételat, G., Holtzman, D. M., Hyman, B. T., Nixon, R. A., Jones, D. T. Alzheimer disease // Nature Reviews Disease Primers. – 2021. – Т. 7, № 1. – С. 33.

39 Van Den Bosch, L., Van Damme, P., Bogaert, E., Robberecht, W. The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. – 2006. – Т. 1762, № 11–12. – С. 1068–1082.

40 Wong, Y. C., Krainc, D. α-synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and therapeutic strategies // Nature Medicine. – 2017. – Т. 23, № 2. – С. 1–13.

41 Selkoe, D., Mandelkow, E., Holtzman, D. Deciphering Alzheimer disease // Cold Spring Harbor perspectives in medicine. – Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. – Т. 2, № 1.

42 Butti, Z., Pan, Y. E., Giacomotto, J., Patten, S. A. Reduced C9orf72 function leads to defective synaptic vesicle release and neuromuscular dysfunction in zebrafish // Communications Biology. – 2021. – Т. 4, № 1.

43 Soukup, S., Vanhauwaert, R., Verstreken, P. Parkinson’s disease: convergence on synaptic homeostasis // The EMBO Journal. – 2018. – Т. 37, № 18.

44 Millecamps, S., Julien, J.-P. Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases // Nat Rev Neurosci. – Springer Science and Business Media LLC, 2013. – Т. 14, № 3. – С. 161–176.

45 Sheng, Z.-H., Cai, Q. Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration // Nat Rev Neurosci. – Springer Science and Business Media LLC, 2012. – Т. 13, № 2. – С. 77–93.

46 Lee, V. M.-Y., Goedert, M., Trojanowski, J. Q. Neurodegenerative Tauopathies // Annu. Rev. Neurosci. – Annual Reviews, 2001. – Т. 24, № 1. – С. 1121–1159.

47 Devine, M. J., Kittler, J. T. Mitochondria at the neuronal presynapse in health and disease // Nature Reviews Neuroscience. – 2018. – Т. 19, № 2. – С. 63–80.

48 Andersen, J. K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? // Nat Med. – Springer Science and Business Media LLC, 2004. – Т. 10, № S7. – С. S18–S25.

49 Pech, U., Verstreken, P. α-Synuclein and Tau: Mitochondrial Kill Switches // Neuron. – Elsevier BV, 2018. – Т. 97, № 1. – С. 3–4.

50 Madabhushi, R., Pan, L., Tsai, L.-H. DNA Damage and Its Links to Neurodegeneration // Neuron. – Elsevier BV, 2014. – Т. 83, № 2. – С. 266–282.

51 Tziortzouda, P., Van Den Bosch, L., Hirth, F. Triad of TDP43 control in neurodegeneration: autoregulation, localization and aggregation // Nature Reviews Neuroscience. – 2021. – Т. 22, № 4. – С. 197–208.

52 Qiu, H., Lee, S., Shang, Y., Wang, W.-Y., Au, K. F., Kamiya, S., Barmada, S. J., Finkbeiner, S., Lui, H., Carlton, C. E., Tang, A. A., Oldham, M. C., Wang, H., Shorter, J., Filiano, A. J., Roberson, E. D., Tourtellotte, W. G., Chen, B., Tsai, L.-H., Huang, E. J. ALS-associated mutation FUS-R521C causes DNA damage and RNA splicing defects // J. Clin. Invest. – American Society for Clinical Investigation, 2014. – Т. 124, № 3. – С. 981–999.

53 Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C., Gage, F. H. Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration // Cell. – Elsevier BV, 2010. – Т. 140, № 6. – С. 918–934.

54 Tang, D., Kang, R., Berghe, T. V., Vandenabeele, P., Kroemer, G. The molecular machinery of regulated cell death // Cell Res. – Springer Science and Business Media LLC, 2019. – Т. 29, № 5. – С. 347–364.

55 Chung, W.-S., Welsh, C. A., Barres, B. A., Stevens, B. Do glia drive synaptic and cognitive impairment in disease? // Nat Neurosci. – Springer Science and Business Media LLC, 2015. – Т. 18, № 11. – С. 1539–1545.

56 Forloni, G., La Vitola, P., Balducci, C. Oligomeropathies, inflammation and prion protein binding // Front Neurosci. – 2022. – Т. 16. – С. 822420.

57 Kumar, V., Sami, N., Kashav, T., Islam, A., Ahmad, F., Hassan, Md. I. Protein aggregation and neurodegenerative diseases: From theory to therapy // European Journal of Medicinal Chemistry. – Elsevier BV, 2016. – Т. 124. – С. 1105–1120.

58 Chitnis, T., Weiner, H. L. CNS inflammation and neurodegeneration // Journal of Clinical Investigation. – American Society for Clinical Investigation, 2017. – Т. 127, № 10. – С. 3577–3587.

59 Ravits, J., Ferrey, D., Gundogdu, B., Qayoumi, W., Zale, C. Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Review // JAMA. – 2026. – Т. 335, № 22. – С. 1970–1982.

60 Zou, Z.-Y., Zhou, Z.-R., Che, C.-H., Liu, C.-Y., He, R.-L., Huang, H.-P. Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis // Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry. – 2017. – Т. 88, № 7. – С. 540–549.

61 Braems, E., Swinnen, B., Van Den Bosch, L. C9orf72 loss-of-function: a trivial, stand-alone or additive mechanism in C9 ALS/FTD? // Acta Neuropathologica. – 2020. – Т. 140, № 5. – С. 625–643.

62 Smeyers, J., Banchi, E.-G., Latouche, M. C9ORF72: What It Is, What It Does, and Why It Matters // Frontiers in Cellular Neuroscience. – 2021. – Т. 15.

63 Benson, B. C., Shaw, P. J., Azzouz, M., Highley, J. R., Hautbergue, G. M. Proteinopathies as Hallmarks of Impaired Gene Expression, Proteostasis and Mitochondrial Function in Amyotrophic Lateral Sclerosis // Frontiers in Neuroscience. – 2021. – Т. 15.

64 Higgins, C. M., Jung, C., Xu, Z. ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes // BMC Neuroscience. – 2003. – Т. 4, № 1.

65 Medinas, D. B., Rozas, P., Martínez Traub, F., Woehlbier, U., Brown, R. H., Bosco, D. A., Hetz, C. Endoplasmic reticulum stress leads to accumulation of wild-type SOD1 aggregates associated with sporadic amyotrophic lateral sclerosis // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2018. – Т. 115, № 32. – С. 8209–8214.

66 Peggion, C., Scalcon, V., Massimino, M. L., Nies, K., Lopreiato, R., Rigobello, M. P., Bertoli, A. SOD1 in ALS: Taking Stock in Pathogenic Mechanisms and the Role of Glial and Muscle Cells // Antioxidants. – 2022. – Т. 11, № 4. – С. 614.

67 Moens, T. G., Da Cruz, S., Neumann, M., Shelkovnikova, T. A., Shneider, N. A., Van Den Bosch, L. Amyotrophic lateral sclerosis caused by FUS mutations: advances with broad implications // The Lancet Neurology. – 2025. – Т. 24, № 2. – С. 166–178.

68 Aksoy, Y. A., Deng, W., Stoddart, J., Chung, R., Guillemin, G., Cole, N. J., Neely, G. G., Hesselson, D. “STRESSED OUT”: The role of FUS and TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. – 2020. – Т. 126. – С. 105821.

69 Mackenzie, I. R., Rademakers, R., Neumann, M. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia // The Lancet Neurology. – 2010. – Т. 9, № 10. – С. 995–1007.

70 Rummens, J., Da Cruz, S. RNA-binding proteins in ALS and FTD: from pathogenic mechanisms to therapeutic insights // Molecular Neurodegeneration. – 2025. – Т. 20, № 1.

71 Moda, F., Ciullini, A., Dellarole, I. L., Lombardo, A., Campanella, N., Bufano, G., Cazzaniga, F. A., Giaccone, G. Secondary Protein Aggregates in Neurodegenerative Diseases: Almost the Rule Rather than the Exception // Frontiers in Bioscience-Landmark. – 2023. – Т. 28, № 10.

72 Yin, P., Bai, D., Zhu, L., Deng, F., Guo, X., Li, B., Chen, L., Li, S., Li, X.-J. Cytoplasmic TDP-43 impairs the activity of the ubiquitin-proteasome system // Experimental Neurology. – 2021. – Т. 345. – С. 113833.

73 Dang, M., Wu, L., Zhang, X. Structural insights and milestones in TDP-43 research: A comprehensive review of its pathological and therapeutic advances // International Journal of Biological Macromolecules. – 2025. – Т. 306. – С. 141677.

74 Prasad, A., Bharathi, V., Sivalingam, V., Girdhar, A., Patel, B. K. Molecular Mechanisms of TDP-43 Misfolding and Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis // Frontiers in Molecular Neuroscience. – 2019. – Т. 12.

75 Ederle, H., Dormann, D. TDP-43 and FUS en route from the nucleus to the cytoplasm // FEBS Letters. – 2017. – Т. 591, № 11. – С. 1489–1507.

76 Ayala, Y. M., De Conti, L., Avendaño-Vázquez, S. E., Dhir, A., Romano, M., D'Ambrogio, A., Tollervey, J., Ule, J., Baralle, M., Buratti, E., Baralle, F. E. TDP-43 regulates its mRNA levels through a negative feedback loop: TDP-43 autoregulation of its transcript levels // The EMBO Journal. – 2011. – Т. 30, № 2. – С. 277–288.

77 Koyama, A., Sugai, A., Kato, T., Ishihara, T., Shiga, A., Toyoshima, Y., Koyama, M., Konno, T., Hirokawa, S., Yokoseki, A., Nishizawa, M., Kakita, A., Takahashi, H., Onodera, O. Increased cytoplasmic TARDBP mRNA in affected spinal motor neurons in ALS caused by abnormal autoregulation of TDP-43 // Nucleic Acids Research. – 2016. – Т. 44, № 12. – С. 5820–5836.

78 Duranti, E., Villa, C. Molecular Investigations of Protein Aggregation in the Pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Т. 24, № 1. – С. 704.

79 Gautam, M., Xie, E. F., Kocak, N., Ozdinler, P. H. Mitoautophagy: A Unique Self-Destructive Path Mitochondria of Upper Motor Neurons With TDP-43 Pathology Take, Very Early in ALS // Frontiers in Cellular Neuroscience. – 2019. – Т. 13.

80 Lanuti, P., Ciccocioppo, F., Bologna, G., Ercolino, E., Pierdomenico, L., Simeone, P., Pieragostino, D., Del Boccio, P., Marchisio, M., Miscia, S. Neurodegenerative diseases as proteinopathies-driven immune disorders // Neural Regeneration Research. – 2020. – Т. 15, № 5. – С. 850.

81 Yasuda, K., Clatterbuck-Soper, S. F., Jackrel, M. E., Shorter, J., Mili, S. FUS inclusions disrupt RNA localization by sequestering kinesin-1 and inhibiting microtubule detyrosination // Journal of Cell Biology. – 2017. – Т. 216, № 4. – С. 1015–1034.

82 Szewczyk, B., Günther, R., Japtok, J., Frech, M. J., Naumann, M., Lee, H. O., Hermann, A. FUS ALS neurons activate major stress pathways and reduce translation as an early protective mechanism against neurodegeneration // Cell Reports. – 2023. – Т. 42, № 2. – С. 112025.

83 Deng, J., Wang, P., Chen, X., Cheng, H., Liu, J., Fushimi, K., Zhu, L., Wu, J. Y. FUS interacts with ATP synthase beta subunit and induces mitochondrial unfolded protein response in

cellular and animal models // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2018. – Т. 115, № 41.

84 Zhou, Y., Liu, S., Öztürk, A., Hicks, G. G. FUS-regulated RNA metabolism and DNA damage repair: Implications for amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia pathogenesis // Rare Diseases. – 2014. – Т. 2, № 1. – С. e29515.

85 Murray, D. T., Kato, M., Lin, Y., Thurber, K. R., Hung, I., McKnight, S. L., Tycko, R. Structure of FUS Protein Fibrils and Its Relevance to Self-Assembly and Phase Separation of Low-Complexity Domains // Cell. – 2017. – Т. 171, № 3. – С. 615-627.e16.

86. Law, W. J. TLS, EWS and TAF15: a model for transcriptional integration of gene expression // Briefings in Functional Genomics and Proteomics. – 2006. – Т. 5, № 1. – С. 8–14.

87 Couthouis, J., Hart, M. P., Erion, R., King, O. D., Diaz, Z., Nakaya, T., Ibrahim, F., Kim, H.-J., Mojsilovic-Petrovic, J., Panossian, S., Kim, C. E., Frackelton, E. C., Solski, J. A., Williams, K. L., Clay-Falcone, D., Elman, L., McCluskey, L., Greene, R., Hakonarson, H., Kalb, R. G., Lee, V. M. Y., Trojanowski, J. Q., Nicholson, G. A., Blair, I. P., Bonini, N. M., Van Deerlin, V. M., Mourelatos, Z., Shorter, J., Gitler, A. D. Evaluating the role of the FUS/TLS-related gene EWSR1 in amyotrophic lateral sclerosis // Human Molecular Genetics. – 2012. – Т. 21, № 13. – С. 2899–2911.

88 Couthouis, J., Raphael, A. R., Daneshjou, R., Gitler, A. D. Targeted Exon Capture and Sequencing in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis // PLoS Genetics / под ред. Gibson, G. – 2014. – Т. 10, № 10. – С. e1004704.

89 Kim, H. J., Taylor, J. P. Lost in Transportation: Nucleocytoplasmic Transport Defects in ALS and Other Neurodegenerative Diseases // Neuron. – 2017. – Т. 96, № 2. – С. 285–297.

90 Guil, S., Long, J. C., Cáceres, J. F. hnRNP A1 Relocalization to the Stress Granules Reflects a Role in the Stress Response // Molecular and Cellular Biology. – 2006. – Т. 26, № 15. – С. 5744–5758.

91 Baradaran-Heravi, Y., Van Broeckhoven, C., Van Der Zee, J. Stress granule mediated protein aggregation and underlying gene defects in the FTD-ALS spectrum // Neurobiology of Disease. – 2020. – Т. 134. – С. 104639.

92 Carmo-Silva, S., Nobrega, C., Pereira De Almeida, L., Cavadas, C. Unraveling the Role of Ataxin-2 in Metabolism // Trends in Endocrinology & Metabolism. – 2017. – Т. 28, № 4. – С. 309–318.

93 Ostrowski, L., Hall, A., Mekhail, K. Ataxin-2: From RNA Control to Human Health and Disease // Genes. – 2017. – Т. 8, № 6. – С. 157.

94 Chiò, A., Calvo, A., Moglia, C., Canosa, A., Brunetti, M., Barberis, M., Restagno, G., Conte, A., Bisogni, G., Marangi, G., Moncada, A., Lattante, S., Zollino, M., Sabatelli, M., Bagarotti, A., Corrado, L., Mora, G., Bersano, E., Mazzini, L., D'Alfonso, S., For PARALS, Chiò, A., Cammarosano,

S., Canosa, A., Cocito, D., Lopiano, L., Durelli, L., Ferrero, B., Bertolotto, A., Mauro, A., Pradotto, L., Mazzini, L., Cantello, R., Bersano, E., Nasuelli, N., Giobbe, D., Gionco, M., Sosso, L., Leotta, D., Appendino, L., Cavallo, R., Odddenino, E., Geda, C., Poglio, F., Di Cortemiglia, E. L., Santimaria, P., Massazza, U., Villani, A., Conti, R., Pisano, F., Palermo, M., Ursino, E., Vergnano, F., Sassone, O., Provera, P., Penza, M. T., Aguggia, M., Di Vito, N., Meineri, P., Pastore, I., Ghiglione, P., Seliak, D., Launaro, N., Cavestro, C., Astegiano, G., Corso, G., Bottacchi, E. ATXN2 polyQ intermediate repeats are a modifier of ALS survival // Neurology. – 2015. – Т. 84, № 3. – С. 251–258.

95 Becker, L. A., Huang, B., Bieri, G., Ma, R., Knowles, D. A., Jafar-Nejad, P., Messing, J., Kim, H. J., Soriano, A., Auburger, G., Pulst, S. M., Taylor, J. P., Rigo, F., Gitler, A. D. Therapeutic reduction of ataxin-2 extends lifespan and reduces pathology in TDP-43 mice // Nature. – 2017. – Т. 544, № 7650. – С. 367–371.

96 Kedersha, N., Cho, M. R., Li, W., Yacono, P. W., Chen, S., Gilks, N., Golan, D. E., Anderson, P. Dynamic Shuttling of Tia-1 Accompanies the Recruitment of mRNA to Mammalian Stress Granules // The Journal of Cell Biology. – 2000. – Т. 151, № 6. – С. 1257–1268.

97 Sánchez-Jiménez, C., Izquierdo, J. M. T-cell Intracellular Antigen (TIA)-Proteins Deficiency in Murine Embryonic Fibroblasts Alters Cell Cycle Progression and Induces Autophagy // PLoS ONE / под ред. Jade Lim, H. – 2013. – Т. 8, № 9. – С. e75127.

98 Sekiyama, N., Takaba, K., Maki-Yonekura, S., Akagi, K., Ohtani, Y., Imamura, K., Terakawa, T., Yamashita, K., Inaoka, D., Yonekura, K., Kodama, T. S., Tochio, H. ALS mutations in the TIA-1 prion-like domain trigger highly condensed pathogenic structures // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2022. – Т. 119, № 38.

99 Salton, M., Elkon, R., Borodina, T., Davydov, A., Yaspo, M.-L., Halperin, E., Shiloh, Y. Matrin 3 Binds and Stabilizes mRNA // PLoS ONE / под ред. Papavasiliou, N. – 2011. – Т. 6, № 8. – С. e23882.

100 Tada, M., Doi, H., Koyano, S., Kubota, S., Fukai, R., Hashiguchi, S., Hayashi, N., Kawamoto, Y., Kunii, M., Tanaka, K., Takahashi, K., Ogawa, Y., Iwata, R., Yamanaka, S., Takeuchi, H., Tanaka, F. Matrin 3 Is a Component of Neuronal Cytoplasmic Inclusions of Motor Neurons in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis // The American Journal of Pathology. – 2018. – Т. 188, № 2. – С. 507–514.

101 Drake, J. C., Yan, Z. Targeting healthspan to optimally combat non-communicable disease in an aging world // Sports Medicine and Health Science. – 2019. – Т. 1, № 1. – С. 59–60.

102 Fernández-Villaverde, J., Norrick, P. Terra Incognita: The Economics of a Shrinking World: w35809. – National Bureau of Economic Research, 2026.

103 Jiang, Q., Liu, J., Huang, S., Wang, X.-Y., Chen, X., Liu, G.-H., Ye, K., Song, W., Masters, C. L., Wang, J., Wang, Y.-J. Antiageing strategy for neurodegenerative diseases: from mechanisms to clinical advances // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2025. – Т. 10, № 1.

104 Skaria, A. P. The economic and societal burden of Alzheimer disease: managed care considerations // Am J Manag Care. – 2022. – Т. 28, № 10 Suppl. – С. S188–S196.

105 Petrov, D., Mansfield, C., Moussy, A., Hermine, O. ALS Clinical Trials Review: 20 Years of Failure. Are We Any Closer to Registering a New Treatment? // Frontiers in Aging Neuroscience. – 2017. – Т. 9.

106 DeMattos, R. B., Lu, J., Tang, Y., Racke, M. M., DeLong, C. A., Tzaferis, J. A., Hole, J. T., Forster, B. M., McDonnell, P. C., Liu, F., Kinley, R. D., Jordan, W. H., Hutton, M. L. A Plaque-Specific Antibody Clears Existing β-amyloid Plaques in Alzheimer's Disease Mice // Neuron. – 2012. – Т. 76, № 5. – С. 908–920.

107 Van Dyck, C. H., Swanson, C. J., Aisen, P., Bateman, R. J., Chen, C., Gee, M., Kanekiyo, M., Li, D., Reyderman, L., Cohen, S., Froelich, L., Katayama, S., Sabbagh, M., Vellas, B., Watson, D., Dhadda, S., Irizarry, M., Kramer, L. D., Iwatsubo, T. Lecanemab in Early Alzheimer's Disease // New England Journal of Medicine. – 2023. – Т. 388, № 1. – С. 9–21.

108 Yao, W., Yang, H., Yang, J. Small-molecule drugs development for Alzheimer's disease // Frontiers in Aging Neuroscience. – 2022. – Т. 14.

109 Zhang, J., Zhang, Y., Wang, J., Xia, Y., Zhang, J., Chen, L. Recent advances in Alzheimer's disease: mechanisms, clinical trials and new drug development strategies // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2024. – Т. 9, № 1.

110 Stocchi, F., Bravi, D., Emmi, A., Antonini, A. Parkinson disease therapy: current strategies and future research priorities // Nature Reviews Neurology. – 2024. – Т. 20, № 12. – С. 695–707.

111 Murakami, H., Shiraishi, T., Umehara, T., Omoto, S., Iguchi, Y. Recent Advances in Drug Therapy for Parkinson's Disease // Internal Medicine. – 2023. – Т. 62, № 1. – С. 33–42.

112 Lang, A. E., Siderowf, A. D., Macklin, E. A., Poewe, W., Brooks, D. J., Fernandez, H. H., Rascol, O., Giladi, N., Stocchi, F., Tanner, C. M., Postuma, R. B., Simon, D. K., Tolosa, E., Mollenhauer, B., Cedarbaum, J. M., Fraser, K., Xiao, J., Evans, K. C., Graham, D. L., Sapir, I., Inra, J., Hutchison, R. M., Yang, M., Fox, T., Budd Haeberlein, S., Dam, T. Trial of Cinpanemab in Early Parkinson's Disease // New England Journal of Medicine. – 2022. – Т. 387, № 5. – С. 408–420.

113 Pagano, G., Taylor, K. I., Anzures-Cabrera, J., Marchesi, M., Simuni, T., Marek, K., Postuma, R. B., Pavese, N., Stocchi, F., Azulay, J.-P., Mollenhauer, B., López-Manzanares, L., Russell, D. S., Boyd, J. T., Nicholas, A. P., Luquin, M. R., Hauser, R. A., Gasser, T., Poewe, W., Ricci, B., Boulay, A., Vogt, A., Boess, F. G., Dukart, J., D'Urso, G., Finch, R., Zanigni, S., Monnet, A., Pross, N.,

Hahn, A., Svoboda, H., Britschgi, M., Lipsmeier, F., Volkova-Volkmar, E., Lindemann, M., Dziadek, S., Holiga, Š., Rukina, D., Kustermann, T., Kerchner, G. A., Fontoura, P., Umbricht, D., Doody, R., Nikolcheva, T., Bonni, A. Trial of Prasinezumab in Early-Stage Parkinson's Disease // New England Journal of Medicine. – 2022. – Т. 387, № 5. – С. 421–432.

114 Athauda, D., Foltynie, T. The glucagon-like peptide 1 (GLP) receptor as a therapeutic target in Parkinson's disease: mechanisms of action // Drug Discovery Today. – 2016. – Т. 21, № 5. – С. 802–818.

115 Claassen, D. O., Carroll, B., De Boer, L. M., Wu, E., Ayyagari, R., Gandhi, S., Stamler, D. Indirect tolerability comparison of Deutetrabenazine and Tetrabenazine for Huntington disease // Journal of Clinical Movement Disorders. – 2017. – Т. 4, № 1.

116 Ferguson, M. W., Kennedy, C. J., Palpagama, T. H., Waldvogel, H. J., Faull, R. L. M., Kwakowsky, A. Current and Possible Future Therapeutic Options for Huntington's Disease // Journal of Central Nervous System Disease. – 2022. – Т. 14.

117 Jarosińska, O. D., Rüdiger, S. G. D. Molecular Strategies to Target Protein Aggregation in Huntington's Disease // Frontiers in Molecular Biosciences. – 2021. – Т. 8.

118 Hoffmann-La Roche. A Phase II, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Dose-finding Study to Evaluate the Safety, Biomarkers, and Efficacy of Tominersen in Individuals With Prodromal and Early Manifest Huntington Disease [Электронный ресурс]: Clinical trial registration // clinicaltrials.gov. – clinicaltrials.gov, 2025. – URL: https://clinicaltrials.gov/study/NCT05686551 (дата обращения: 27.07.2025).

119 Pérez-Arancibia, R., Cisternas-Olmedo, M., Sepúlveda, D., Troncoso-Escudero, P., Vidal, R. L. Small molecules to perform big roles: The search for Parkinson's and Huntington's disease therapeutics // Frontiers in Neuroscience. – 2023. – Т. 16.

120 Neylan, K. D., Miller, B. L. New Approaches to the Treatment of Frontotemporal Dementia // Neurotherapeutics. – 2023. – Т. 20, № 4. – С. 1055–1065.

121 Wolfson, C., Gauvin, D. E., Ishola, F., Oskoui, M. Global Prevalence and Incidence of Amyotrophic Lateral Sclerosis // Neurology. – 2023. – Т. 101, № 6.

122 Sanghai, N., Vuong, B., Burak Berk, A., Afridi, M. S. K., Tranmer, G. K. Current Small Molecule–Based Medicinal Chemistry Approaches for Neurodegeneration Therapeutics // ChemMedChem. – 2024. – Т. 19, № 9. – С. e202300705.

123 Mead, R. J., Shan, N., Reiser, H. J., Marshall, F., Shaw, P. J. Amyotrophic lateral sclerosis: a neurodegenerative disorder poised for successful therapeutic translation // Nature Reviews Drug Discovery. – 2023. – Т. 22, № 3. – С. 185–212.

124 Tzeplaeff, L., Wilfling, S., Requardt, M. V., Herdick, M. Current State and Future Directions in the Therapy of ALS // Cells. – 2023. – Т. 12, № 11. – С. 1523.

125 Fang, T., Al Khleifat, A., Meurgey, J.-H., Jones, A., Leigh, P. N., Bensimon, G., Al-Chalabi, A. Stage at which riluzole treatment prolongs survival in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a retrospective analysis of data from a dose-ranging study // The Lancet Neurology. – 2018. – Т. 17, № 5. – С. 416–422.

126 Watanabe, K., Tanaka, M., Yuki, S., Hirai, M., Yamamoto, Y. How is edaravone effective against acute ischemic stroke and amyotrophic lateral sclerosis? // Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition. – 2018. – Т. 62, № 1. – С. 20–38.

127 Chen, J. J. Overview of current and emerging therapies for amytrophic lateral sclerosis // Am J Manag Care. – 2020. – Т. 26, № 9 Suppl. – С. S191–S197.

128 Kusaczuk, M. Tauroursodeoxycholate—Bile Acid with Chaperoning Activity: Molecular and Cellular Effects and Therapeutic Perspectives // Cells. – 2019. – Т. 8, № 12. – С. 1471.

129 Ryu, H., Smith, K., Camelo, S. I., Carreras, I., Lee, J., Iglesias, A. H., Dangond, F., Cormier, K. A., Cudkowicz, M. E., H. Brown, R., Ferrante, R. J. Sodium phenylbutyrate prolongs survival and regulates expression of anti-apoptotic genes in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice // Journal of Neurochemistry. – 2005. – Т. 93, № 5. – С. 1087–1098.

130 Elmansy, M. F., Reidl, C. T., Rahaman, M., Özdinler, P. H., Silverman, R. B. Small molecules targeting different cellular pathologies for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis // Medicinal Research Reviews. – 2023. – Т. 43, № 6. – С. 2260–2302.

131 Paganoni, S., Hendrix, S., Dickson, S. P., Knowlton, N., Berry, J. D., Elliott, M. A., Maiser, S., Karam, C., Caress, J. B., Owegi, M. A., Quick, A., Wymer, J., Goutman, S. A., Heitzman, D., Heiman-Patterson, T. D., Jackson, C., Quinn, C., Rothstein, J. D., Kasarskis, E. J., Katz, J., Jenkins, L., Ladha, S. S., Miller, T. M., Scelsa, S. N., Vu, T. H., Fournier, C., Johnson, K. M., Swenson, A., Goyal, N., Pattee, G. L., Babu, S., Chase, M., Dagostino, D., Hall, M., Kittle, G., Eydinov, M., Ostrow, J., Pothier, L., Randall, R., Shefner, J. M., Sherman, A. V., Tustison, E., Vigneswaran, P., Yu, H., Cohen, J., Klee, J., Tanzi, R., Gilbert, W., Yeramian, P., Cudkowicz, M. Effect of sodium phenylbutyrate/taurursodiol on tracheostomy/ventilation-free survival and hospitalisation in amyotrophic lateral sclerosis: long-term results from the CENTAUR trial // Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry. – 2022. – Т. 93, № 8. – С. 871–875.

132 Ketabforoush, A., Faghihi, F., Azedi, F., Ariaei, A., Habibi, M. A., Khalili, M., Ashtiani, B. H., Joghataei, M. T., Arnold, W. D. Sodium Phenylbutyrate and Tauroursodeoxycholic Acid: A Story of Hope Turned to Disappointment in Amyotrophic Lateral Sclerosis Treatment // Clinical Drug Investigation. – 2024. – Т. 44, № 7. – С. 495–512.

133 Mansour, H. M., El-Khatib, A. S. Oligonucleotide-based therapeutics for neurodegenerative disorders: Focus on antisense oligonucleotides // European Journal of Pharmacology. – 2025. – Т. 998. – С. 177529.

134 Bennett, C. F., Swayze, E. E. RNA Targeting Therapeutics: Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides as a Therapeutic Platform // Annual Review of Pharmacology and Toxicology. – 2010. – Т. 50, № 1. – С. 259–293.

135 Dhuri, K., Bechtold, C., Quijano, E., Pham, H., Gupta, A., Vikram, A., Bahal, R. Antisense Oligonucleotides: An Emerging Area in Drug Discovery and Development // Journal of Clinical Medicine. – 2020. – Т. 9, № 6. – С. 2004.

136 Zamecnik, P. C., Stephenson, M. L. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1978. – Т. 75, № 1. – С. 280–284.

137 McCampbell, A., Cole, T., Wegener, A. J., Tomassy, G. S., Setnicka, A., Farley, B. J., Schoch, K. M., Hoye, M. L., Shabsovich, M., Sun, L., Luo, Y., Zhang, M., Thankamony, S., Salzman, D. W., Cudkowicz, M., Graham, D. L., Bennett, C. F., Kordasiewicz, H. B., Swayze, E. E., Miller, T. M. Antisense oligonucleotides extend survival and reverse decrement in muscle response in ALS models // Journal of Clinical Investigation. – 2018. – Т. 128, № 8. – С. 3558–3567.

138 McGuigan, A., Blair, H. A. Tofersen: A Review in Amyotrophic Lateral Sclerosis Associated with SOD1 Mutations // CNS Drugs. – 2025.

139 Simonini, C., Zucchi, E., Martinelli, I., Gianferrari, G., Lunetta, C., Sorarù, G., Trojsi, F., Pepe, R., Piras, R., Giacchino, M., Banchelli, F., Mandrioli, J. Neurodegenerative and neuroinflammatory changes in SOD1-ALS patients receiving tofersen // Scientific Reports. – 2025. – Т. 15, № 1. – С. 11034.

140 Korobeynikov, V. A., Lyashchenko, A. K., Blanco-Redondo, B., Jafar-Nejad, P., Shneider, N. A. Antisense oligonucleotide silencing of FUS expression as a therapeutic approach in amyotrophic lateral sclerosis // Nature medicine. – 2022. – Т. 28, № 1. – С. 104–116.

141 McEachin, Z. T., Parameswaran, J., Raj, N., Bassell, G. J., Jiang, J. RNA-mediated toxicity in C9orf72 ALS and FTD // Neurobiology of Disease. – 2020. – Т. 145. – С. 105055.

142 Shi, Y., Lin, S., Staats, K. A., Li, Y., Chang, W.-H., Hung, S.-T., Hendricks, E., Linares, G. R., Wang, Y., Son, E. Y., Wen, X., Kisler, K., Wilkinson, B., Menendez, L., Sugawara, T., Woolwine, P., Huang, M., Cowan, M. J., Ge, B., Koutsodendris, N., Sandor, K. P., Komberg, J., Vangoor, V. R., Senthilkumar, K., Hennes, V., Seah, C., Nelson, A. R., Cheng, T.-Y., Lee, S.-J. J., August, P. R., Chen, J. A., Wisniewski, N., Hanson-Smith, V., Belgard, T. G., Zhang, A., Coba, M., Grunseich, C., Ward, M. E., Van Den Berg, L. H., Pasterkamp, R. J., Trotti, D., Zlokovic, B. V., Ichida, J. K. Haploinsufficiency leads to neurodegeneration in C9ORF72 ALS/FTD human induced motor neurons // Nature Medicine. – 2018. – Т. 24, № 3. – С. 313–325.

143 Jiang, J., Zhu, Q., Gendron, T. F., Saberi, S., McAlonis-Downes, M., Seelman, A., Stauffer, J. E., Jafar-nejad, P., Drenner, K., Schulte, D., Chun, S., Sun, S., Ling, S.-C., Myers, B.,

Engelhardt, J., Katz, M., Baughn, M., Platoshyn, O., Marsala, M., Watt, A., Heyser, C. J., Ard, M. C., De Muynck, L., Daughrity, L. M., Swing, D. A., Tessarollo, L., Jung, C. J., Delpoux, A., Utzschneider, D. T., Hedrick, S. M., de Jong, P. J., Edbauer, D., Van Damme, P., Petrucelli, L., Shaw, C. E., Bennett, C. F., Da Cruz, S., Ravits, J., Rigo, F., Cleveland, D. W., Lagier-Tourenne, C. Gain of Toxicity from ALS/FTD-Linked Repeat Expansions in C9ORF72 Is Alleviated by Antisense Oligonucleotides Targeting GGGGCC-Containing RNAs // Neuron. – 2016. – Т. 90, № 3. – С. 535–550.

144 Martin, V. Biogen and Ionis Announce Topline Phase 1/2 Study Results [Электронный ресурс] // ALS Network. – 2024. – URL: https://alsnetwork.org/biogen-and-ionis-announce-topline-phase-1-2-study-results/ (дата обращения: 26.06.2026).

145 García-González, N., Gonçalves-Sánchez, J., Gómez-Nieto, R., Gonçalves-Estella, J. M., López, D. E. Advances and Challenges in Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases: A Systematic Review // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Т. 25, № 23. – С. 12485.

146 Xie, Q., Li, K., Chen, Y., Li, Y., Jiang, W., Cao, W., Yu, H., Fan, D., Deng, B. Gene therapy breakthroughs in ALS: a beacon of hope for 20% of ALS patients // Translational Neurodegeneration. – 2025. – Т. 14, № 1. – С. 19.

147 Darras, B. T., Masson, R., Mazurkiewicz-Bełdzińska, M., Rose, K., Xiong, H., Zanoteli, E., Baranello, G., Bruno, C., Vlodavets, D., Wang, Y., El-Khairi, M., Gerber, M., Gorni, K., Khwaja, O., Kletzl, H., Scalco, R. S., Fontoura, P., Servais, L. Risdiplam-Treated Infants with Type 1 Spinal Muscular Atrophy versus Historical Controls // New England Journal of Medicine. – 2021. – Т. 385, № 5. – С. 427–435.

148 Neil, E. E., Bisaccia, E. K. Nusinersen: A Novel Antisense Oligonucleotide for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy // The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics. – 2019. – Т. 24, № 3. – С. 194–203.

149 Ogbonmide, T., Rathore, R., Rangrej, S. B., Hutchinson, S., Lewis, M., Ojilere, S., Carvalho, V., Kelly, I. Gene Therapy for Spinal Muscular Atrophy (SMA): A Review of Current Challenges and Safety Considerations for Onasemnogene Abeparvovec (Zolgensma) // Cureus. – 2023.

150 Crisafulli, S., Boccanegra, B., Vitturi, G., Trifirò, G., De Luca, A. Pharmacological Therapies of Spinal Muscular Atrophy: A Narrative Review of Preclinical, Clinical–Experimental, and Real-World Evidence // Brain Sciences. – 2023. – Т. 13, № 10. – С. 1446.

151 René, C. A., Parks, R. J. Expanding the Availability of Onasemnogene Abeparvovec to Older Patients: The Evolving Treatment Landscape for Spinal Muscular Atrophy // Pharmaceutics. – 2023. – Т. 15, № 6. – С. 1764.

152 Bagga, P., Singh, S., Ram, G., Kapil, S., Singh, A. Diving into progress: a review on current therapeutic advancements in spinal muscular atrophy // Frontiers in Neurology. – 2024. – Т. 15. – С. 1368658.

153 Garrison, L. P., Jiao, B., Dabbous, O. Gene therapy may not be as expensive as people think: challenges in assessing the value of single and short-term therapies // Journal of Managed Care & Specialty Pharmacy. – 2021. – Т. 27, № 5. – С. 674–681.

154 Mendell, J. R., Al-Zaidy, S., Shell, R., Arnold, W. D., Rodino-Klapac, L. R., Prior, T. W., Lowes, L., Alfano, L., Berry, K., Church, K., Kissel, J. T., Nagendran, S., L'Italien, J., Sproule, D. M., Wells, C., Cardenas, J. A., Heitzer, M. D., Kaspar, A., Corcoran, S., Braun, L., Likhite, S., Miranda, C., Meyer, K., Foust, K. D., Burghes, A. H. M., Kaspar, B. K. Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy // New England Journal of Medicine. – 2017. – Т. 377, № 18. – С. 1713–1722.

155 Wong, C. H., Li, D., Wang, N., Gruber, J., Lo, A. W., Conti, R. M. The estimated annual financial impact of gene therapy in the United States // Gene Therapy. – 2023. – Т. 30, № 10–11. – С. 761–773.

156 Komarov, I. A., Malakhova, A. R., Vasilyeva, T. P., Shukan, E. Yu., Aleksandrova, O. Yu., Zinchenko, R. A., Polyakov, A. V., Nikitin, S. S., Sapego, E. Yu., Kutsev, S. I. Socioeconomic efficiency of neonatal screening for spinal muscular atrophy in the Russian Federation // Neuromuscular Diseases. – 2023. – Т. 13, № 3. – С. 25–32.

157 Lim, C. K. W., Gapinske, M., Brooks, A. K., Woods, W. S., Powell, J. E., Zeballos C., M. A., Winter, J., Perez-Pinera, P., Gaj, T. Treatment of a Mouse Model of ALS by In Vivo Base Editing // Molecular Therapy. – 2020. – Т. 28, № 4. – С. 1177–1189.

158 Nizzardo, M., Taiana, M., Rizzo, F., Aguila Benitez, J., Nijssen, J., Allodi, I., Melzi, V., Bresolin, N., Comi, G. P., Hedlund, E., Corti, S. Synaptotagmin 13 is neuroprotective across motor neuron diseases // Acta Neuropathologica. – 2020. – Т. 139, № 5. – С. 837–853.

159 Mueller, C., Berry, J. D., McKenna-Yasek, D. M., Gernoux, G., Owegi, M. A., Pothier, L. M., Douthwright, C. L., Gelevski, D., Luppino, S. D., Blackwood, M., Wightman, N. S., Oakley, D. H., Frosch, M. P., Flotte, T. R., Cudkowicz, M. E., Brown, R. H. SOD1 Suppression with Adeno-Associated Virus and MicroRNA in Familial ALS // New England Journal of Medicine. – 2020. – Т. 383, № 2. – С. 151–158.

160 Dongsheng, F. A Multicenter, Single-Arm, Open-Label, IIT Clinical Study to Evaluate the Safety, Tolerability, and Preliminary Efficacy of a Single Intrathecal Injection of SNUG01 in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) [Электронный ресурс]: Clinical trial registration // clinicaltrials.gov. – clinicaltrials.gov, 2024. – URL: https://clinicaltrials.gov/study/NCT06645197 (дата обращения: 28.08.2025).

161 Harris, H., Rubinsztein, D. C. Control of autophagy as a therapy for neurodegenerative disease // Nature Reviews Neurology. – 2012. – Т. 8, № 2. – С. 108–117.

162 Fernandes, S. M., Mayer, J., Nilsson, P., Shimozawa, M. How close is autophagy-targeting therapy for Alzheimer's disease to clinical use? A summary of autophagy modulators in clinical studies // Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2025. – Т. 12. – С. 1520949.

163 Nechushtai, L., Frenkel, D., Pinkas-Kramarski, R. Autophagy in Parkinson's Disease // Biomolecules. – 2023. – Т. 13, № 10. – С. 1435.

164 Chen, Y., Zhao, S., Fan, Z., Li, Z., Zhu, Y., Shen, T., Li, K., Yan, Y., Tian, J., Liu, Z., Zhang, B. Metformin attenuates plaque-associated tau pathology and reduces amyloid-β burden in APP/PS1 mice // Alzheimer's Research & Therapy. – 2021. – Т. 13, № 1. – С. 40.

165 Zhao, S., Fan, Z., Zhang, X., Li, Z., Shen, T., Li, K., Yan, Y., Yuan, Y., Pu, J., Tian, J., Liu, Z., Chen, Y., Zhang, B. Metformin Attenuates Tau Pathology in Tau-Seeded PS19 Mice // Neurotherapeutics. – 2023. – Т. 20, № 2. – С. 452–463.

166 Barbera, M., Lehtisalo, J., Perera, D., Aspö, M., Cross, M., De Jager Loots, C. A., Falaschetti, E., Friel, N., Luchsinger, J. A., Gavelin, H. M., Peltonen, M., Price, G., Neely, A. S., Thunborg, C., Tuomilehto, J., Mangialasche, F., Middleton, L., Ngandu, T., Solomon, A., Kivipelto, M., on behalf of the MET-FINGER study team, Adeleke, S. A., Arvidsson, C., Barton, I., Bas, M., Cosby, K., Crispin, J., Dunn, L., Durkina, M., Elebring, O., Ford, J., Giannakopoulou, P., Gilkes, H., Graham, H., Hagman, G., Hall, R., Hallinder, H., Haqqee, A., Hartmanis, M., Hemiö, K., Istvánfyová, Z., Kafetsouli, D., Lakey, K., Lehtimäki, S., Lindström, L., MacDonald, P., Mäkelä, A., McGinn-Summers, S., Meius, C., Mirza, A., Oesterling, C., Ojala, J., Olawale, A., Ramanath, I., Roitto, H.-M., Sahib, B., Singh, S., Sundell, M., Taylor, S., Tharumaratnam, D., Uusimäki, K., Vaarala, J., Voutilainen, H., Åsander, J. A multimodal precision-prevention approach combining lifestyle intervention with metformin repurposing to prevent cognitive impairment and disability: the MET-FINGER randomised controlled trial protocol // Alzheimer's Research & Therapy. – 2024. – Т. 16, № 1. – С. 23.

167 Beretta, G., Shala, A. L. Impact of Heat Shock Proteins in Neurodegeneration: Possible Therapeutical Targets // Annals of Neurosciences. – SAGE Publications, 2022. – Т. 29, № 1. – С. 71.

168 Comaduran, M. F., Minotti, S., Jacob-Tomas, S., Rizwan, J., Larochelle, N., Robitaille, R., Sephton, C. F., Vera, M., Nalbantoglu, J. N., Durham, H. D. Impact of histone deacetylase inhibition and arimoclomol on heat shock protein expression and disease biomarkers in primary culture models of familial ALS // Cell Stress and Chaperones. – 2024. – Т. 29, № 3. – С. 359–380.

169 Díaz-Villanueva, J., Díaz-Molina, R., García-González, V. Protein Folding and Mechanisms of Proteostasis // International Journal of Molecular Sciences. – 2015. – Т. 16, № 8. – С. 17193–17230.

170 Turturici, G., Sconzo, G., Geraci, F. Hsp70 and Its Molecular Role in Nervous System Diseases // Biochemistry Research International. – 2011. – Т. 2011. – С. 1–18.

171 Rutledge, B. S., Choy, W.-Y., Duennwald, M. L. Folding or holding?-Hsp70 and Hsp90 chaperoning of misfolded proteins in neurodegenerative disease // The Journal of biological chemistry. – 2022. – Т. 298, № 5. – С. 101905.

172 Kityk, R., Kopp, J., Sinning, I., Mayer, M. P. Structure and Dynamics of the ATP-Bound Open Conformation of Hsp70 Chaperones // Molecular Cell. – 2012. – Т. 48, № 6. – С. 863–874.

173 Dukay, B., Csoboz, B., Tóth, M. E. Heat-Shock Proteins in Neuroinflammation // Frontiers in Pharmacology. – 2019. – Т. 10. – С. 920.

174 Baughman, H. E. R., Clouser, A. F., Klevit, R. E., Nath, A. HspB1 and Hsc70 chaperones engage distinct tau species and have different inhibitory effects on amyloid formation // Journal of Biological Chemistry. – 2018. – Т. 293, № 8. – С. 2687–2700.

175 Sun, Y., Zhang, J., Chen, S. Suppression of Alzheimer's disease-related phenotypes by the heat shock protein 70 inducer, geranylgeranylacetone, in APP/PS1 transgenic mice via the ERK/p38 MAPK signaling pathway // Experimental and Therapeutic Medicine. – 2017.

176 Tóth, M. E., Szegedi, V., Varga, E., Juhász, G., Horváth, J., Borbély, E., Csibrány, B., Alföldi, R., Lénárt, N., Penke, B., Sántha, M. Overexpression of Hsp27 ameliorates symptoms of Alzheimer's disease in APP/PS1 mice // Cell Stress and Chaperones. – 2013. – Т. 18, № 6. – С. 759–771.

177 Wang, H.-Q., Xu, Y.-X., Zhao, X.-Y., Zhao, H., Yan, J., Sun, X.-B., Guo, J.-C., Zhu, C.-Q. Overexpression of F0F1-ATP synthase α suppresses mutant huntingtin aggregation and toxicity in vitro // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2009. – Т. 390, № 4. – С. 1294–1298.

178 Barbieri, E. M., Linsenmeier, M., Whiteman, K. R., Cheng, Y., Braganza, S., Copley, K. E., Miranda-Castrodad, P., Lewis, B., Villafañe, K., Amado, D. A., Davidson, B. L., Shorter, J. Scouring the human Hsp70 network uncovers diverse chaperone safeguards buffering TDP-43 toxicity. – 2025.

179 Dubrez, L., Causse, S., Borges Bonan, N., Dumétier, B., Garrido, C. Heat-shock proteins: chaperoning DNA repair // Oncogene. – 2020. – Т. 39, № 3. – С. 516–529.

180 Falsone, S. F., Kungl, A. J., Rek, A., Cappai, R., Zangger, K. The Molecular Chaperone Hsp90 Modulates Intermediate Steps of Amyloid Assembly of the Parkinson-related Protein α-Synuclein // Journal of Biological Chemistry. – 2009. – Т. 284, № 45. – С. 31190–31199.

181 Weickert, S., Wawrzyniuk, M., John, L. H., Rüdiger, S. G. D., Drescher, M. The mechanism of Hsp90-induced oligomerizaton of Tau // Science Advances. – 2020. – Т. 6, № 11. – С. eaax6999.

182 Ali, Y. O., Allen, H. M., Yu, L., Li-Kroeger, D., Bakhshizadehmahmoudi, D., Hatcher, A., McCabe, C., Xu, J., Bjorklund, N., Taglialatela, G., Bennett, D. A., De Jager, P. L., Shulman, J. M.,

Bellen, H. J., Lu, H.-C., Barres, B. A. NMNAT2:HSP90 Complex Mediates Proteostasis in Proteinopathies // PLOS Biology. – 2016. – Т. 14, № 6. – С. e1002472.

183 Toader, C., Tataru, C. P., Munteanu, O., Serban, M., Covache-Busuioc, R.-A., Ciurea, A. V., Enyedi, M. Decoding Neurodegeneration: A Review of Molecular Mechanisms and Therapeutic Advances in Alzheimer's, Parkinson's, and ALS // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Т. 25, № 23. – С. 12613.

184 Saxena, S. K., Sharma, D., Kumar, S., Maurya, V. K., Ansari, S., Malhotra, H. S., Singh, A. Decoding the role of large heat shock proteins in the progression of neuroinflammation-mediated neurodegenerative disorders // Neuroprotection. – 2025. – Т. 3, № 1. – С. 48–62.

185 Tiwari, S., Fauvet, B., Assenza, S., De Los Rios, P., Goloubinoff, P. A fluorescent multi-domain protein reveals the unfolding mechanism of Hsp70 // Nat Chem Biol. – 2023. – Т. 19, № 2. – С. 198–205.

186 Gu, J., Wang, C., Hu, R., Li, Y., Zhang, S., Sun, Y., Wang, Q., Li, D., Fang, Y., Liu, C. Hsp70 chaperones TDP-43 in dynamic, liquid-like phase and prevents it from amyloid aggregation // Cell research. – 2021. – Т. 31, № 9. – С. 1024–1027.

187 Bentmann, E., Haass, C., Dormann, D. Stress granules in neurodegeneration-lessons learnt from TAR DNA binding protein of 43 kDa and fused in sarcoma // FEBS J. – 2013. – Т. 280, № 18. – С. 4348–4370.

188 Hu, L., Mao, S., Lin, L., Bai, G., Liu, B., Mao, J. Stress granules in the spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis: The correlation and promising therapy // Neurobiology of Disease. – 2022. – Т. 170. – С. 105749.

189 Carey, J. L., Guo, L. Liquid-Liquid Phase Separation of TDP-43 and FUS in Physiology and Pathology of Neurodegenerative Diseases // Front. Mol. Biosci. – Frontiers, 2022. – Т. 9.

190 Yu, H., Lu, S., Gasior, K., Singh, D., Vazquez-Sanchez, S., Tapia, O., Toprani, D., Beccari, M. S., Yates, J. R., Da Cruz, S., Newby, J. M., Lafarga, M., Gladfelter, A. S., Villa, E., Cleveland, D. W. HSP70 chaperones RNA-free TDP-43 into anisotropic intranuclear liquid spherical shells // Science. – New York, N.Y., 2021. – Т. 371, № 6529.

191 Babinchak, W. M., Haider, R., Dumm, B. K., Sarkar, P., Surewicz, K., Choi, J.-K., Surewicz, W. K. The role of liquid-liquid phase separation in aggregation of the TDP-43 low-complexity domain // J Biol Chem. – 2019. – Т. 294, № 16. – С. 6306–6317.

192 Wang, C., Duan, Y., Duan, G., Wang, Q., Zhang, K., Deng, X., Qian, B., Gu, J., Ma, Z., Zhang, S., Guo, L., Liu, C., Fang, Y. Stress Induces Dynamic, Cytotoxicity-Antagonizing TDP-43 Nuclear Bodies via Paraspeckle LncRNA NEAT1-Mediated Liquid-Liquid Phase Separation // Mol Cell. – 2020. – Т. 79, № 3. – С. 443-458.e7.

193 Agnihotri, D., Lee, C.-C., Lu, P.-C., He, R.-Y., Huang, Y.-A., Kuo, H.-C., Huang, J. J.-T. C9ORF72 poly-PR induces TDP-43 nuclear condensation via NEAT1 and is modulated by HSP70 activity // Cell Rep. – 2025. – Т. 44, № 1. – С. 115173.

194 Fonda, B. D., Jami, K. M., Boulos, N. R., Murray, D. T. Identification of the Rigid Core for Aged Liquid Droplets of an RNA-Binding Protein Low Complexity Domain // J Am Chem Soc. – 2021. – Т. 143, № 17. – С. 6657–6668.

195 Kitamura, A., Iwasaki, N., Kinjo, M. Molecular chaperone HSP70 prevents formation of inclusion bodies of the 25-kDa C-terminal fragment of TDP-43 by preventing aggregate accumulation // Cell Stress Chaperones. – 2018. – Т. 23, № 6. – С. 1177–1183.

196 Kinger, S., Dubey, A. R., Kumar, P., Jagtap, Y. A., Choudhary, A., Kumar, A., Prajapati, V. K., Dhiman, R., Mishra, A. Molecular Chaperones' Potential against Defective Proteostasis of Amyotrophic Lateral Sclerosis // Cells. – 2023. – Т. 12, № 9. – С. 1302.

197 Kalmar, B., Lu, C.-H., Greensmith, L. The role of heat shock proteins in Amyotrophic Lateral Sclerosis: The therapeutic potential of Arimoclomol // Pharmacology & Therapeutics. – 2014. – Т. 141, № 1. – С. 40–54.

198 Piavchenko, G. A., Pokidova, K. S., Kuzmin, E. A., Venediktov, A. A., Kuznetsov, S. L. Overexpression of HSP70 in mice with mutant FUS protein is accompanied by a mitigated neurodegeneration in limbic system // Sechenov Medical Journal. – 2025. – Т. 16, № 1. – С. 4–19.

199 Venediktov, A. A., Bushueva, O. Y., Kudryavtseva, V. A., Kuzmin, E. A., Moiseeva, A. V., Baldycheva, A., Meglinski, I., Piavchenko, G. A. Closest horizons of Hsp70 engagement to manage neurodegeneration // Frontiers in Molecular Neuroscience. – 2023. – Т. 16. – С. 1230436.

200 Yang, Y., Rye, H. S. How does protein aggregate structure affect mechanisms of disaggregation? // Biochem Soc Trans. – 2025. – Т. 53, № 04. – С. 881–895.

201 Penke, B., Bogár, F., Crul, T., Sántha, M., Tóth, M. E., Vígh, L. Heat Shock Proteins and Autophagy Pathways in Neuroprotection: From Molecular Bases to Pharmacological Interventions // International Journal of Molecular Sciences. – Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2018. – Т. 19, № 1. – С. 325.

202 Vilar, J. M. G., Rubi, J. M., Saiz, L. Chaperone-Driven Entropic Separation of Amyloid Nanofilament Bundles // Phys. Rev. X. – 2025. – Т. 15, № 1. – С. 011041.

203 Rukes, V., Rebeaud, M. E., Perrin, L. W., De Los Rios, P., Cao, C. Single-molecule evidence of Entropic Pulling by Hsp70 chaperones // Nat Commun. – 2024. – Т. 15, № 1. – С. 8604.

204 Beton, J. G., Monistrol, J., Wentink, A., Johnston, E. C., Roberts, A. J., Bukau, B. G., Hoogenboom, B. W., Saibil, H. R. Cooperative amyloid fibre binding and disassembly by the Hsp70 disaggregase // EMBO J. – 2022. – Т. 41, № 16. – С. e110410.

205 Mas, G., Hiller, S. Mechanism of ATP hydrolysis in the Hsp70 BiP nucleotide-binding domain // Nat Commun. – 2025. – Т. 16, № 1. – С. 5086.

206 Xu, L., Nitika, Hasin, N., Cuskelly, D. D., Wolfgeher, D., Doyle, S., Moynagh, P., Perrett, S., Jones, G. W., Truman, A. W. Rapid deacetylation of yeast Hsp70 mediates the cellular response to heat stress // Sci Rep. – Nature Publishing Group, 2019. – Т. 9, № 1. – С. 16260.

207 Griffith, A. A., Holmes, W. Fine Tuning: Effects of Post-Translational Modification on Hsp70 Chaperones // International Journal of Molecular Sciences. – Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2019. – Т. 20, № 17. – С. 4207.

208 Nitika, Porter, C. M., Truman, A. W., Truttmann, M. C. Post-translational modifications of Hsp70 family proteins: Expanding the chaperone code // J Biol Chem. – 2020. – Т. 295, № 31. – С. 10689–10708.

209 San Gil, R., Pascovici, D., Venturato, J., Brown-Wright, H., Mehta, P., Madrid San Martin, L., Wu, J., Luan, W., Chui, Y. K., Bademosi, A. T., Swaminathan, S., Naidoo, S., Berning, B. A., Wright, A. L., Keating, S. S., Curtis, M. A., Faull, R. L. M., Lee, J. D., Ngo, S. T., Lee, A., Morsch, M., Chung, R. S., Scotter, E., Lisowski, L., Mirzaei, M., Walker, A. K. A transient protein folding response targets aggregation in the early phase of TDP-43-mediated neurodegeneration // Nat Commun. – 2024. – Т. 15, № 1. – С. 1508.

210 Tedesco, B., Vendredy, L., Timmerman, V., Poletti, A. The chaperone-assisted selective autophagy complex dynamics and dysfunctions // Autophagy. – 2023. – Т. 19, № 6. – С. 1619–1641.

211 Gamerdinger, M., Kaya, A. M., Wolfrum, U., Clement, A. M., Behl, C. BAG3 mediates chaperone-based aggresome-targeting and selective autophagy of misfolded proteins // EMBO reports. – John Wiley & Sons, Ltd, 2011. – Т. 12, № 2. – С. 149–156.

212 Klimek, C., Kathage, B., Wördehoff, J., Höhfeld, J. BAG3-mediated proteostasis at a glance // J Cell Sci. – 2017. – Т. 130, № 17. – С. 2781–2788.

213 Stürner, E., Behl, C. The Role of the Multifunctional BAG3 Protein in Cellular Protein Quality Control and in Disease // Front Mol Neurosci. – 2017. – Т. 10. – С. 177.

214 Zhang, K., Wang, A., Zhong, K., Qi, S., Wei, C., Shu, X., Tu, W.-Y., Xu, W., Xia, C., Xiao, Y., Chen, A., Bai, L., Zhang, J., Luo, B., Wang, W., Shen, C. UBQLN2-HSP70 axis reduces poly-Gly-Ala aggregates and alleviates behavioral defects in the C9ORF72 animal model // Neuron. – 2021. – Т. 109, № 12. – С. 1949-1962.e6.

215 Babazadeh, A., Rayner, S. L., Lee, A., Chung, R. S. TDP-43 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases: Focusing on motor neuron disease and frontotemporal dementia // Ageing Research Reviews. – 2023. – Т. 92. – С. 102085.

216 Gu, J., He, Y., He, C., Zhang, Q., Huang, Q., Bai, S., Wang, R., You, Q., Wang, L. Advances in the structures, mechanisms and targeting of molecular chaperones // Signal Transduct Target Ther. – 2025. – Т. 10, № 1. – С. 84.

217 Velasco-Carneros, L., Bernardo-Seisdedos, G., Maréchal, J.-D., Millet, O., Moro, F., Muga, A. Pseudophosphorylation of single residues of the J-domain of DNAJA2 regulates the holding/folding balance of the Hsc70 system // Protein Sci. – 2024. – Т. 33, № 8. – С. e5105.

218 Piavchenko, G. A., Pokidova, K. S., Kuzmin, E. A., Venediktov, A. A., Izmailov, I. Y., Meglinski, I. V., Kuznetsov, S. L. Quantitative Immunofluorescence Mapping of HSP70's Neuroprotective Effects in FUS-ALS Mouse Models // Applied Sciences. – 2024. – Т. 14, № 24. – С. 11614.

219 Patury, S., Miyata, Y., Gestwicki, J. E. Pharmacological targeting of the Hsp70 chaperone // Curr Top Med Chem. – 2009. – Т. 9, № 15. – С. 1337–1351.

220 Merjane, J., Chung, R., Patani, R., Lisowski, L. Molecular mechanisms of amyotrophic lateral sclerosis as broad therapeutic targets for gene therapy applications utilizing adeno-associated viral vectors // Medicinal Research Reviews. – 2023. – Т. 43, № 4. – С. 829–854.

221 Verdés, S., Navarro, X., Bosch, A. Targeting Amyotrophic Lateral Sclerosis with Gene Therapy: From Silencing Genes to Enhancing Neuroprotection // Human Gene Therapy. – 2025. – Т. 36, № 17–18. – С. 1173–1198.

222 Choudhary, A., Kumar, P., Jagtap, Y. A., Kinger, S., Chandra Jha, H., Gutti, R. K., Sharma, V., Prajapati, V. K., Mishra, A. Mechanistic insights of molecular chaperone Hsp70: Pathogenesis of neurodegenerative diseases // Brain Network Disorders. – 2025. – Т. 1, № 4. – С. 195–206.

223 Pelaez, M. C., Fiore, F., Larochelle, N., Dabbaghizadeh, A., Comaduran, M. F., Arbour, D., Minotti, S., Marcadet, L., Semaan, M., Robitaille, R., Nalbantoglu, J. N., Sephton, C. F., Durham, H. D. Reversal of cognitive deficits in FUSR521G amyotrophic lateral sclerosis mice by arimoclomol and a class I histone deacetylase inhibitor independent of heat shock protein induction // Neurotherapeutics. – 2024. – Т. 21, № 5. – С. e00388.

224 Perni, M., Mannini, B. Targeting Protein Aggregation in ALS // Biomolecules. – 2024. – Т. 14, № 10. – С. 1324.

225 Scozzari, S., Columbro, S. F., Favagrossa, M., Tortarolo, M., Cagnotto, A., Salmona, M., Marco, G. D., Bendotti, C., Calvo, A., Pasetto, L., Bonetto, V. Effects of Lysine Deacetylation Inhibition Alone or in Combination With Arimoclomol on TDP-43 Proteinopathy // Journal of Neurochemistry. – 2026. – Т. 170(6). – С. e70493.

226 Meglio, M. Arimoclomol Granted Fast Track Designation for Amyotrophic Lateral Sclerosis [Электронный ресурс] // Neurology live. – 2020. – URL:

https://www.neurologylive.com/view/arimoclomol-granted-fast-track-designation-for-amyotrophic-lateral-sclerosis (дата обращения: 25.11.2024).

227 Benatar, M., Hansen, T., Rom, D., Geist, M. A., Blaettler, T., Camu, W., Kuzma-Kozakiewicz, M., Berg, L. H. van den, Morales, R. J., Chio, A., Andersen, P. M., Pradat, P.-F., Lange, D., Damme, P. V., Mora, G., Grudniak, M., Elliott, M., Petri, S., Olney, N., Ladha, S., Goyal, N. A., Meyer, T., Hanna, M. G., Quinn, C., Genge, A., Zinman, L., Jabari, D., Shoesmith, C., Ludolph, A. C., Neuwirth, C., Nations, S., Shefner, J. M., Turner, M. R., Wuu, J., Bennett, R., Dang, H., Sundgreen, C., Granit, V., Steele, J., Levy, W., Paredes, M. E., Hernandez, J., Bilsker, M., Szacka, K., Ronert, A., Jablońska, D., Łuczak, A. Z., Chaverri, D., Mantgem, M. R. J. van, Bunte, T. M., Broere, B., Fockert, A. de, Sanchez-Tejerina, D., Landabaso, C., Calvo, A., Moglia, C., Manera, U., Canosa, A., Vasta, R., Salamone, P., Fuda, G., DeMarco, G., Casale, F., Forsberg, K. M., Winroth, I., Stenberg, E. A., Holmgren, M., Amador, M. del M., Lenglet, T., Querin, G., Coudoin, S., Pavlakis, P., Holzberg, S., Sideri, R., Marinou, K., Czarnecki, M., Ługiewicz, R., Biel-Czarnecka, M., Boczkowska, M., Schotte, C., Vynckier, J., Daele, S. V., Claeys, T., Delmotte, K., Swinnen, B., Serrien, A., D'Hondt, A., Lamaire, N., Debien, E., Jones, S., Vachon, C., Grogan, J., Solorzano, G., Crowell, A., Rakocevic, G., Wagoner, M., Alma, O., Flavia, W., Sonja, K., и др. Safety and efficacy of arimoclomol in patients with early amyotrophic lateral sclerosis (ORARIALS-01): a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre, phase 3 trial // The Lancet Neurology. – 2024. – Т. 23, № 7. – С. 687–699.

228 Coyne, A. N., Lorenzini, I., Chou, C. C., Torvund, M., Rogers, R. S., Starr, A., Zaepfel, B. L., Levy, J., Johannesmeyer, J., Schwartz, J. C., Nishimune, H., Zinsmaier, K., Rossoll, W., Sattler, R., Zarnescu, D. C. Post-transcriptional Inhibition of Hsc70-4/HSPA8 Expression Leads to Synaptic Vesicle Cycling Defects in Multiple Models of ALS // Cell reports. – Cell Rep, 2017. – Т. 21, № 1. – С. 110–125.

229 Gregory, J. M., Barros, T. P., Meehan, S., Dobson, C. M., Luheshi, L. M. The Aggregation and Neurotoxicity of TDP-43 and Its ALS-Associated 25 kDa Fragment Are Differentially Affected by Molecular Chaperones in Drosophila // PLoS One. – 2012. – Т. 7, № 2. – С. e31899.

230 Evgen'ev, M., Bobkova, N., Krasnov, G., Garbuz, D., Funikov, S., Kudryavtseva, A., Kulikov, A., Samokhin, A., Maltsev, A., Nesterova, I. The Effect of Human HSP70 Administration on a Mouse Model of Alzheimer's Disease Strongly Depends on Transgenicity and Age // Journal of Alzheimer's Disease. – IOS Press, 2019. – Т. 67, № 4. – С. 1391–1404.

231 Gifondorwa, D. J., Jimenz-Moreno, R., Hayes, C. D., Rouhani, H., Robinson, M. B., Strupe, J. L., Caress, J., Milligan, C. Administration of Recombinant Heat Shock Protein 70 Delays Peripheral Muscle Denervation in the SOD1(G93A) Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis // Neurology research international. – 2012. – Т. 2012. – С. 170426.

232 Gifondorwa, D. J., Robinson, M. B., Hayes, C. D., Taylor, A. R., Prevette, D. M., Oppenheim, R. W., Caress, J., Milligan, C. E. Exogenous delivery of heat shock protein 70 increases lifespan in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis // The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. – 2007. – Т. 27, № 48. – С. 13173–13180.

233 Vinokurov, A. Y., Palalov, A. A., Kritskaya, K. A., Demyanenko, S. V., Garbuz, D. G., Evgen'ev, M. B., Esteras, N., Abramov, A. Y. Cell-Permeable HSP70 Protects Neurons and Astrocytes Against Cell Death in the Rotenone-Induced and Familial Models of Parkinson's Disease // Mol Neurobiol. – 2024. – Т. 61, № 10. – С. 7785–7795.

234 Ogbodo, E., Michelangeli, F., Williams, J. H. H. Exogenous heat shock proteins HSPA1A and HSPB1 regulate TNF-α, IL-1β and IL-10 secretion from monocytic cells // FEBS Open Bio. – 2023. – Т. 13, № 10. – С. 1922–1940.

235 Wieten, L., van der Zee, R., Goedemans, R., Sijtsma, J., Serafini, M., Lubsen, N. H., van Eden, W., Broere, F. Hsp70 expression and induction as a readout for detection of immune modulatory components in food // Cell Stress Chaperones. – 2010. – Т. 15, № 1. – С. 25–37.

236 Seminary, E. R., Sison, S. L., Ebert, A. D. Modeling Protein Aggregation and the Heat Shock Response in ALS iPSC-Derived Motor Neurons // Front. Neurosci. – Frontiers, 2018. – Т. 12.

237 Alekseeva, L. G., Ovsyanikova, O. V., Schulga, A. A., Grechikhina, M. V., Shustova, O. A., Kovalenko, E. I., Svirshchevskaya, E. V., Deyev, S. M., Sapozhnikov, A. M. Targeted Delivery of HSP70 to Tumor Cells via Supramolecular Complex Based on HER2-Specific DARPin9_29 and the Barnase:Barstar Pair // Cells. – 2024. – Т. 13, № 4. – С. 317.

238 Hulina, A., Grdić Rajković, M., Jakšić Despot, D., Jelić, D., Dojder, A., Čepelak, I., Rumora, L. Extracellular Hsp70 induces inflammation and modulates LPS/LTA-stimulated inflammatory response in THP-1 cells // Cell Stress Chaperones. – 2018. – Т. 23, № 3. – С. 373–384.

239 Sapozhnikov, A. M., Klinkova, A. V., Shustova, O. A., Grechikhina, M. V., Kilyachus, M. S., Stremovskiy, O. A., Kovalenko, E. I., Deyev, S. M. A Novel Approach to Anticancer Therapy: Molecular Modules Based on the Barnase:Barstar Pair for Targeted Delivery of HSP70 to Tumor Cells // Acta Naturae. – 2018. – Т. 10, № 3. – С. 85–91.

240 Jagaraj, C. J., Shadfar, S., Kashani, S. A., Saravanabavan, S., Farzana, F., Atkin, J. D. Molecular hallmarks of ageing in amyotrophic lateral sclerosis // Cell. Mol. Life Sci. – 2024. – Т. 81, № 1. – С. 111.

241 Amissah, H. A., Antwi, M. H., Amissah, T. A., Combs, S. E., Shevtsov, M. More than Just Protein Folding: The Epichaperome, Mastermind of the Cancer Cell // Cells. – Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2025. – Т. 14, № 3. – С. 204.

242 Keeler, A. M., Zhan, W., Ram, S., Fitzgerald, K. A., Gao, G. The curious case of AAV immunology // Mol Ther. – 2025. – Т. 33, № 5. – С. 1946–1965.

243 Harkins, A. L., Ambegaokar, P. P., Keeler, A. M. Immune responses to central nervous system directed adeno-associated virus gene therapy: Does direct CNS delivery make a difference? // Neurotherapeutics. – 2024. – Т. 21, № 4. – С. e00435.

244 Kang, L., Jin, S., Wang, J., Lv, Z., Xin, C., Tan, C., Zhao, M., Wang, L., Liu, J. AAV vectors applied to the treatment of CNS disorders: Clinical status and challenges // J Control Release. – 2023. – Т. 355. – С. 458–473.

245 Giannelli, S. G., Luoni, M., Iannielli, A., Middeldorp, J., Philippens, I., Bido, S., Körbelin, J., Broccoli, V. New AAV9 engineered variants with enhanced neurotropism and reduced liver off-targeting in mice and marmosets // iScience. – 2024. – Т. 27, № 5. – С. 109777.

246 Reynaud-Dulaurier, R., Decressac, M. PHP.B/eB Vectors Bring New Successes to Gene Therapy for Brain Diseases // Front Bioeng Biotechnol. – 2020. – Т. 8. – С. 582979.

247 Покровский, В. М., Патраханов, Е. А., Анциферов, О. В., Колесник, И. М., Белашова, А. В., Солдатова, В. А., Покопейко, О. Н., Карагодина, А. Ю., Архипов, И. С., Воронина, Д. Г., Сушкова, Д. Н. Белок теплового шока HSP70 – предпосылки использования в качестве лекарственного средства // Фармация и фармакология. – 2021. – Т. 9, № 5. – С. 346–355.

248 Radhiyanti, P. T., Konno, A., Matsuzaki, Y., Hirai, H. Comparative study of neuron-specific promoters in mouse brain transduced by intravenously administered AAV-PHP.eB // Neurosci Lett. – 2021. – Т. 756. – С. 135956.

249 Hordeaux, J., Yuan, Y., Clark, P. M., Wang, Q., Martino, R. A., Sims, J. J., Bell, P., Raymond, A., Stanford, W. L., Wilson, J. M. The GPI-Linked Protein LY6A Drives AAV-PHP.B Transport across the Blood-Brain Barrier // Mol Ther. – 2019. – Т. 27, № 5. – С. 912–921.

250 Mathiesen, S. N., Lock, J. L., Schoderboeck, L., Abraham, W. C., Hughes, S. M. CNS Transduction Benefits of AAV-PHP.eB over AAV9 Are Dependent on Administration Route and Mouse Strain // Mol Ther Methods Clin Dev. – 2020. – Т. 19. – С. 447–458.

251 Shu, Y., Yao, J., Qu, Y., Zheng, J., Ding, J., Zhang, L., Wang, Y., Zhao, L., Zhang, J., Tang, S. Intravenous injection of AAV-PHP.eB across the blood-brain barrier in the adult mouse for central nervous system gene therapy* // Oncology and Translational Medicine. – 2019. – Т. 5, № 1. – С. 1–5.

252 Deverman, B. E., Pravdo, P. L., Simpson, B. P., Kumar, S. R., Chan, K. Y., Banerjee, A., Wu, W.-L., Yang, B., Huber, N., Pasca, S. P., Gradinaru, V. Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain // Nat Biotechnol. – 2016. – Т. 34, № 2. – С. 204–209.

253 Chan, K. Y., Jang, M. J., Yoo, B. B., Greenbaum, A., Ravi, N., Wu, W.-L., Sánchez-Guardado, L., Lois, C., Mazmanian, S. K., Deverman, B. E., Gradinaru, V. Engineered AAVs for

efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems // Nat Neurosci. – 2017. – Т. 20, № 8. – С. 1172–1179.

254 Chen, X., Wolfe, D. A., Bindu, D. S., Zhang, M., Taskin, N., Goertsen, D., Shay, T. F., Sullivan, E. E., Huang, S.-F., Ravindra Kumar, S., Arokiaraj, C. M., Plattner, V. M., Campos, L. J., Mich, J. K., Monet, D., Ngo, V., Ding, X., Omstead, V., Weed, N., Bishaw, Y., Gore, B. B., Lein, E. S., Akrami, A., Miller, C., Levi, B. P., Keller, A., Ting, J. T., Fox, A. S., Eroglu, C., Gradinaru, V. Functional gene delivery to and across brain vasculature of systemic AAVs with endothelial-specific tropism in rodents and broad tropism in primates // Nat Commun. – 2023. – Т. 14, № 1. – С. 3345.

255 Chang, A. Y., Chau, V., Landas, J. A., Pang, Y. Preparation of calcium competent Escherichia coli and heatshock transformation // JEMI methods. – 2017. – Т. 1. – С. 22–25.

256 Маликова, А. Д., Жанатаев, А. К., Есмагамбетов, И. Б., Анисина, Е. А., Плигина, К. Л., Чайка, З. В., Рябова, Е. И., Довгий, М. А., Хоссаин, Р. М., Дурнев, А. Д., Дорофеев, В. Л. Оценка риска вертикального переноса аденоассоциированного вектора химерного серотипа PHP.eB в ооциты мышей // Бюллетень сибирской медицины. – 2026. – Т. 25, № 1. – С. 86–95.

257 Ryabova, E. I., Derkaev, A. A., Esmagambetov, I. B., Dovgiy, M. A., Blinov, A. A., Hossain, R. M., Dmitriev, O. E., Polyansky, D. S., Noskov, A. N., Shcheblyakov, D. V., Logunov, D. Y., Gintsburg, A. L. Comparative analysis of three genetic constructs for delivery and expression of a modified single-domain antibody gene in rAAV // Fine Chem. Technol. – 2026. – Т. 20, № 6. – С. 582–593.

258 Дейкин, А. В., Ковражкина, Е. К., Ермолкевич, Т. Г., Еляков, А. Б., Попов, А. Н., Тарасова, Т. В., Гольдман, И. Л., Садчикова, Е. Р., Овчинников, Р. К., Броновицкий, Е. В., Федоров, Е. Н., Лыткина, О. А., Кухарский, М. С., Шелковникова, Т. А., Устюгов, А. А., Нинкина, Н. Н., Бачурин, С. О., Ковражкина, Е. А., Разинская, О. D., Смирнов, А. П., Скворцова, В. И. Модель бокового амиотрофического склероза на основе линии трансгенных мышей, экспрессирующих мутантную форму FUS белка человека // Журнал Неврологии и Психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2014. – Т. 114, № 8. – С. 62–69.

259 Bronovitsky, E., Chaprov, K., Khizeva, A., Ivanova, T., Pravdivceva, E., Bobkov, T., Morozova, O., Krayushkina, A., Nebogatikov, V., Ninkina, N., Ustyugov, A. Retrospective Study of the Physiological and Molecular Features of the S-FUS (1-359) Mouse Transgenic Model with an ALS-like Phenotype: Lifespan, Body Weight Dynamics, Movement Disorders, and Dysregulation of the Dopaminergic System // J Mol Neurosci. – 2026. – Т. 76, № 1. – С. 8.

260 Audouard, E., Khefif, N., Mansat, C., Nelcha, O., Banchi, E.-G., Lupiet, C., Farabos, D., Lamaziere, A., Sevin, C., Piguet, F. Dose-response evaluation of intravenous gene therapy in a symptomatic mouse model of metachromatic leukodystrophy // Mol Ther Methods Clin Dev. – 2024. – Т. 32, № 2. – С. 101248.

261 Krayushkina, A. M., Morozova, O., Khizeva, A., Ivanova, T. A., Ninkina, N., Chaprov, K. Synaptic Changes in Mice Lacking Alpha- and Gamma-Synucleins // Biomedicines. – 2025. – Т. 13, № 12. – С. 2866.

262 Vorobyov, V., Deev, A., Morozova, O., Oganesyan, Z., Krayushkina, A. M., Ivanova, T. A., Chaprov, K. Early Effects of Alpha-Synuclein Depletion by Pan-Neuronal Inactivation of Encoding Gene on Electroencephalogram Coherence between Different Brain Regions in Mice: 12 // Biomedicines. – Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2023. – Т. 11, № 12. – С. 3282.

263 Funikov, S. Y., Rezvykh, A. P., Mazin, P. V., Morozov, A. V., Maltsev, A. V., Chicheva, M. M., Vikhareva, E. A., Evgen'ev, M. B., Ustyugov, A. A. FUS(1-359) transgenic mice as a model of ALS: pathophysiological and molecular aspects of the proteinopathy // Neurogenetics. – Neurogenetics, 2018. – Т. 19, № 3. – С. 189–204.

264 Krasnov, G. S., Dmitriev, A. A., Kudryavtseva, A. V., Shargunov, A. V., Karpov, D. S., Uroshlev, L. A., Melnikova, N. V., Blinov, V. M., Poverennaya, E. V., Archakov, A. I., Lisitsa, A. V., Ponomarenko, E. A. PPLine: An Automated Pipeline for SNP, SAP, and Splice Variant Detection in the Context of Proteogenomics // J Proteome Res. – 2015. – Т. 14, № 9. – С. 3729–3737.

265 Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., Gingeras, T. R. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner // Bioinformatics. – Oxford, England, 2013. – Т. 29, № 1. – С. 15–21.

266 Bolger, A. M., Lohse, M., Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // Bioinformatics. – Oxford, England, 2014. – Т. 30, № 15. – С. 2114–2120.

267 Anders, S., Pyl, P. T., Huber, W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data // Bioinformatics. – Oxford, England, 2015. – Т. 31, № 2. – С. 166–169.

268 Robinson, M. D., McCarthy, D. J., Smyth, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data // Bioinformatics. – Oxford, England, 2010. – Т. 26, № 1. – С. 139–140.

269 Robinson, M. D., Oshlack, A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data // Genome Biol. – 2010. – Т. 11, № 3. – С. R25.

270 Bachurin, S. O., Shevtsova, E. F., Makhaeva, G. F., Grigoriev, V. V., Boltneva, N. P., Kovaleva, N. V., Lushchekina, S. V., Shevtsov, P. N., Neganova, M. E., Redkozubova, O. M., Bovina, E. V., Gabrelyan, A. V., Fisenko, V. P., Sokolov, V. B., Aksinenko, A. Y., Echeverria, V., Barreto, G. E., Aliev, G. Novel conjugates of aminoadamantanes with carbazole derivatives as potential multitarget agents for AD treatment // Sci Rep. – Nature Publishing Group, 2017. – Т. 7, № 1. – С. 45627.

271 Bronovitsky, E. V., Deikin, A. V., Ermolkevich, T. G., Elyakov, A. B., Fedorov, E. N., Sadchikova, E. R., Goldman, I. L., Ovchinnikov, R. K., Roman, A. Y., Khritankova, I. V., Kukharsky, M. S., Buchman, V. L., Bachurin, S. O., Ustyugov, A. A. Gamma-carboline inhibits neurodegenerative

processes in a transgenic model of amyotrophic lateral sclerosis // Doklady Biochemistry and Biophysics. – 2015. – T. 462, № 1.

272 Chaprov, K., Rezvykh, A., Funikov, S., Ivanova, T. A., Lysikova, E. A., Deykin, A. V., Kukharsky, M. S., Aksinenko, A. Y., Bachurin, S. O., Ninkina, N., Buchman, V. L. A bioisostere of Dimebon/Latrepirdine delays the onset and slows the progression of pathology in FUS transgenic mice // CNS Neuroscience & Therapeutics. – 2021. – T. 27, № 7. – C. 765.

273 Ustyugov, A. A., Shelkovnikova, T. A., Kokhan, V. S., Khritankova, I. V., Peters, O., Buchman, V. L., Bachurin, S. O., Ninkina, N. N. Dimebon reduces the levels of aggregated amyloidogenic protein forms in detergent-insoluble fractions in vivo // Bulletin of experimental biology and medicine. – 2012. – T. 152, № 6. – C. 731–733.

274 Rezvykh, A., Shteinberg, D., Bronovitsky, E., Ustyugov, A., Funikov, S. Animal Models of FUS-Proteinopathy: A Systematic Review // Biochemistry (Mosc). – 2024. – T. 89, № Suppl 1. – C. S34–S56.

275 Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y., Dal Canto, M. C., Polchow, C. Y., Alexander, D. D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y. W., Deng, H. X. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation // Science. – 1994. – T. 264, № 5166. – C. 1772–1775.

276 McGoldrick, P., Joyce, P. I., Fisher, E. M. C., Greensmith, L. Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis // Biochim Biophys Acta. – 2013. – T. 1832, № 9. – C. 1421–1436.

277 Richardson, K., Allen, S. P., Mortiboys, H., Grierson, A. J., Wharton, S. B., Ince, P. G., Shaw, P. J., Heath, P. R. The effect of SOD1 mutation on cellular bioenergetic profile and viability in response to oxidative stress and influence of mutation-type // PLoS One. – 2013. – T. 8, № 6. – C. e68256.

278 Mejzini, R., Flynn, L. L., Pitout, I. L., Fletcher, S., Wilton, S. D., Akkari, P. A. ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now? // Frontiers in Neuroscience. – 2019. – T. 13.

279 Devoy, A., Kalmar, B., Stewart, M., Park, H., Burke, B., Noy, S. J., Redhead, Y., Humphrey, J., Lo, K., Jaeger, J., Mejia Maza, A., Sivakumar, P., Bertolin, C., Soraru, G., Plagnol, V., Greensmith, L., Acevedo Arozena, A., Isaacs, A. M., Davies, B., Fratta, P., Fisher, E. M. C. Humanized mutant FUS drives progressive motor neuron degeneration without aggregation in «FUSDelta14» knockin mice // Brain. – 2017. – T. 140, № 11. – C. 2797–2805.

280 Armas, J. M. B., Taoro-González, L., Fisher, E. M. C., Acevedo-Arozena, A. Challenges of modelling TDP-43 pathology in mice // Mamm Genome. – 2025. – T. 36, № 2. – C. 465–481.

281 Chew, J., Gendron, T. F., Prudencio, M., Sasaguri, H., Zhang, Y.-J., Castanedes-Casey, M., Lee, C. W., Jansen-West, K., Kurti, A., Murray, M. E., Bieniek, K. F., Bauer, P. O., Whitelaw, E. C., Rousseau, L., Stankowski, J. N., Stetler, C., Daughrity, L. M., Perkerson, E. A., Desaro, P., Johnston,

A., Overstreet, K., Edbauer, D., Rademakers, R., Boylan, K. B., Dickson, D. W., Fryer, J. D., Petrucelli, L. Neurodegeneration. C9ORF72 repeat expansions in mice cause TDP-43 pathology, neuronal loss, and behavioral deficits // Science. – 2015. – Т. 348, № 6239. – С. 1151–1154.

282 Lee, I., Kazamel, M., King, P. Fat mass loss correlates with survival in amyotrophic lateral sclerosis patients: prospective cohort study (P4.4-013) // Neurology. – Wolters Kluwer, 2019. – Т. 92, № 15_supplement. – С. P4.4-013.

283 Peter, R. S., Rosenbohm, A., Dupuis, L., Brehme, T., Kassubek, J., Rothenbacher, D., Nagel, G., Ludolph, A. C. Life course body mass index and risk and prognosis of amyotrophic lateral sclerosis: results from the ALS registry Swabia // Eur J Epidemiol. – 2017. – Т. 32, № 10. – С. 901–908.

284 Hartmann, H., Ho, W. Y., Chang, J.-C., Ling, S.-C. Cholesterol dyshomeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: cause, consequence, or epiphenomenon? // FEBS J. – 2022. – Т. 289, № 24. – С. 7688–7709.

285 Zhou, B., Zheng, Y., Li, X., Dong, H., Yu, J., Zou, Y., Zhu, M., Yu, Y., Fang, X., Zhou, M., Zhang, W., Yuan, Y., Wang, Z., Deng, J., Hong, D. FUS Mutation Causes Disordered Lipid Metabolism in Skeletal Muscle Associated with ALS // Mol Neurobiol. – 2022. – Т. 59, № 12. – С. 7265–7277.

286 Stoklund Dittlau, K., Terrie, L., Baatsen, P., Kerstens, A., De Swert, L., Janky, R., Corthout, N., Masrori, P., Van Damme, P., Hyttel, P., Meyer, M., Thorrez, L., Freude, K., Van Den Bosch, L. FUS-ALS hiPSC-derived astrocytes impair human motor units through both gain-of-toxicity and loss-of-support mechanisms // Mol Neurodegener. – 2023. – Т. 18, № 1. – С. 5.

287 Ajmone-Cat, M. A., Onori, A., Toselli, C., Stronati, E., Morlando, M., Bozzoni, I., Monni, E., Kokaia, Z., Lupo, G., Minghetti, L., Biagioni, S., Cacci, E. Increased FUS levels in astrocytes leads to astrocyte and microglia activation and neuronal death // Sci Rep. – 2019. – Т. 9, № 1. – С. 4572.

288 Kia, A., McAvoy, K., Krishnamurthy, K., Trotti, D., Pasinelli, P. Astrocytes expressing ALS-linked mutant FUS induce motor neuron death through release of tumor necrosis factor-alpha // Glia. – 2018. – Т. 66, № 5. – С. 1016–1033.

289 Vorobyov, V., Deev, A., Sengpiel, F., Nebogatikov, V., Ustyugov, A. A. Cortical and Striatal Electroencephalograms and Apomorphine Effects in the FUS Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis // J Alzheimers Dis. – 2021. – Т. 81, № 4. – С. 1429–1443.

290 Jericó, I., Vicuña-Urriza, J., Blanco-Luquin, I., Macias, M., Martinez-Merino, L., Roldán, M., Rojas-Garcia, R., Pagola-Lorz, I., Carbayo, A., De Luna, N., Zelaya, V., Mendioroz, M. Profiling TREM2 expression in amyotrophic lateral sclerosis // Brain, Behavior, and Immunity. – 2023. – Т. 109. – С. 117–126.

291 Ma, J. F., Sanchez, B. J., Hall, D. T., Tremblay, A.-M. K., Di Marco, S., Gallouzi, I.-E. STAT3 promotes IFNγ/TNFα-induced muscle wasting in an NF-κB-dependent and IL-6-independent manner // EMBO Mol Med. – 2017. – Т. 9, № 5. – С. 622–637.

292 Richardson, P. J., Smith, D. P., de Giorgio, A., Snetkov, X., Almond-Thynne, J., Cronin, S., Mead, R. J., McDermott, C. J., Shaw, P. J. Janus kinase inhibitors are potential therapeutics for amyotrophic lateral sclerosis // Transl Neurodegener. – 2023. – Т. 12, № 1. – С. 47.

293 Mariani, D., Setti, A., Castagnetti, F., Vitiello, E., Stufera Mecarelli, L., Di Timoteo, G., Giuliani, A., D'Angelo, A., Santini, T., Perego, E., Zappone, S., Liessi, N., Armirotti, A., Vicidomini, G., Bozzoni, I. ALS-associated FUS mutation reshapes the RNA and protein composition of stress granules // Nucleic Acids Research. – 2024. – Т. 52, № 21. – С. 13269–13289.

294 Tsai, Y.-L., Coady, T. H., Lu, L., Zheng, D., Alland, I., Tian, B., Shneider, N. A., Manley, J. L. ALS/FTD-associated protein FUS induces mitochondrial dysfunction by preferentially sequestering respiratory chain complex mRNAs // Genes Dev. – 2020. – Т. 34, № 11–12. – С. 785–805.

295 Cho, H.-U., Kim, S., Sim, J., Yang, S., An, H., Nam, M.-H., Jang, D.-P., Lee, C. J. Redefining differential roles of MAO-A in dopamine degradation and MAO-B in tonic GABA synthesis // Exp Mol Med. – 2021. – Т. 53, № 7. – С. 1148–1158.

296 Nam, M.-H., Sa, M., Ju, Y. H., Park, M. G., Lee, C. J. Revisiting the Role of Astrocytic MAOB in Parkinson's Disease // Int J Mol Sci. – 2022. – Т. 23, № 8. – С. 4453.

297 Rasool, A., Manzoor, R., Ullah, K., Afzal, R., Ul-Haq, A., Imran, H., Kaleem, I., Akhtar, T., Farrukh, A., Hameed, S., Bashir, S. Oxidative Stress and Dopaminergic Metabolism: A Major PD Pathogenic Mechanism and Basis of Potential Antioxidant Therapies // CNS Neurol Disord Drug Targets. – 2024. – Т. 23, № 7. – С. 852–864.

298 Zhang, S., Wang, R., Wang, G. Impact of Dopamine Oxidation on Dopaminergic Neurodegeneration // ACS Chem. Neurosci. – 2019. – Т. 10, № 2. – С. 945–953.

299 Aebischer, M. K., Gizardin-Fredon, H., Lardeux, H., Kochardt, D., Elger, C., Haindl, M., Ruppert, R., Guillarme, D., D'Atri, V. Anion-Exchange Chromatography at the Service of Gene Therapy: Baseline Separation of Full/Empty Adeno-Associated Virus Capsids by Screening of Conditions and Step Gradient Elution Mode // Int J Mol Sci. – 2022. – Т. 23, № 20. – С. 12332.

300 Malikova, A. D., Zhanataev, A. K., Esmagambetov, I. B., Anisina, E. A., Anisina, K. L., Chaika, Z. B., Ryabova, E. I., Dovgiy, M. A., Hossain, R. M., Durnev, A. D., Dorofeev, V. L. Risk assessment of germline transmission of adeno-associated virul vector of chimeric serotype PHP.eB into mouse oocytes // Bûll. sib. med. – 2026. – Т. 25, № 1. – С. 86–95.

301 Liu, Z., Song, S. Reprogramming innate immunity through viral interference: A double-edged strategy for enhancing and containing gene therapies // Molecular Therapy Nucleic Acids. – Elsevier, 2026. – Т. 37, № 2.

302 Perez, B. A., Shutterly, A., Chan, Y. K., Byrne, B. J., Corti, M. Management of Neuroinflammatory Responses to AAV-Mediated Gene Therapies for Neurodegenerative Diseases // Brain Sci. – 2020. – Т. 10, № 2. – С. 119.

303 Cartmell, T., Southgate, T., Rees, G. S., Castro, M. G., Lowenstein, P. R., Luheshi, G. N. Interleukin-1 mediates a rapid inflammatory response after injection of adenoviral vectors into the brain // J Neurosci. – 1999. – Т. 19, № 4. – С. 1517–1523.

304 Thomas, C. E., Birkett, D., Anozie, I., Castro, M. G., Lowenstein, P. R. Acute direct adenoviral vector cytotoxicity and chronic, but not acute, inflammatory responses correlate with decreased vector-mediated transgene expression in the brain // Mol Ther. – 2001. – Т. 3, № 1. – С. 36–46.

305 Bido, S., Nannoni, M., Muggeo, S., Gambarè, D., Ruffini, G., Bellini, E., Passeri, L., Iaia, S., Luoni, M., Provinciali, M., Giannelli, S. G., Giannese, F., Lazarevic, D., Gregori, S., Broccoli, V. Microglia-specific IL-10 gene delivery inhibits neuroinflammation and neurodegeneration in a mouse model of Parkinson’s disease // Sci Transl Med. – 2024. – Т. 16, № 761. – С. eadm8563.

306 Detrez, J. R., Eykens, C., Gillet, G., Padmakumar, M., Cabré, S., Stanley, P., Gasser, J., Healy, L. M., Kadiu, I. Immune response to adeno-associated viral vectors in a human iPSC-derived microglia chimeric mouse model // Cell Rep Methods. – 2026. – Т. 6, № 4. – С. 101362.

307 Савинова, О. А., Новикова, И. И., Плотникова, О. В., Савченко, О. А., Чуенко, Н. Ф. Возрастная динамика биохимических показателей крови лабораторных мышей линии ICR, участвовавших в качестве контрольной группы в исследованиях по влиянию факторов окружающей среды // Научный вестник Омского государственного медицинского университета. – 2021. – Т. 4, № 3(15).

308 Patel, S., Patel, S., Kotadiya, A., Patel, S., Shrimali, B., Trivedi, H., Patel, V., Mahapatra, J., Jain, M. Establishment of reference intervals of haematology and biochemistry analytes in ICR mice of different ages // Laboratory Animals. – 2024. – Т. 58, № 6. – С. 565–578.

309 Akaree, N., Secco, V., Levy-Adam, F., Younis, A., Carra, S., Shalgi, R. Regulation of physiological and pathological condensates by molecular chaperones // The FEBS Journal. – 2025. – Т. 292, № 13. – С. 3271–3297.

310 Qiang, E., Gorenberg, E., Chuang, E., Braun, G., Shorter, J. Optimization of a Chaperone Protein Disaggregase Complex for Neurodegenerative Disease // The FASEB Journal. – 2022. – Т. 36, № S1. – С. fasebj.2022.36.S1.R3204.

311 Andrews, J. A., Jackson, C. E., Heiman-Patterson, T. D., Bettica, P., Brooks, B. R., Pioro, E. P. Real-world evidence of riluzole effectiveness in treating amyotrophic lateral sclerosis // Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration. – 2020. – Т. 21, № 7–8. – С. 509–518.

312 Elliott, E., Bailey, O., Waldron, F. M., Hardingham, G. E., Chandran, S., Gregory, J. M. Therapeutic Targeting of Proteostasis in Amyotrophic Lateral Sclerosis—a Systematic Review and Meta-Analysis of Preclinical Research // Front. Neurosci. – 2020. – Т. 14. – С. 511.

313 Mora, J. S., Bradley, W. G., Chaverri, D., Hernández-Barral, M., Mascias, J., Gamez, J., Gargiulo-Monachelli, G. M., Moussy, A., Mansfield, C. D., Hermine, O., Ludolph, A. C. Long-term survival analysis of masitinib in amyotrophic lateral sclerosis // Ther Adv Neurol Disord. – 2021. – Т. 14. – С. 17562864211030365.

314 Rosenzweig, R., Nillegoda, N. B., Mayer, M. P., Bukau, B. The Hsp70 chaperone network // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2019. – Т. 20, № 11. – С. 665–680.

315 Shelkovnikova, T. A., Peters, O. M., Deykin, A. V., Connor-Robson, N., Robinson, H., Ustyugov, A. A., Bachurin, S. O., Ermolkevich, T. G., Goldman, I. L., Sadchikova, E. R., Kovrazhkina, E. A., Skvortsova, V. I., Ling, S.-C., Da Cruz, S., Parone, P. A., Buchman, V. L., Ninkina, N. N. Fused in sarcoma (FUS) protein lacking nuclear localization signal (NLS) and major RNA binding motifs triggers proteinopathy and severe motor phenotype in transgenic mice // J Biol Chem. – 2013. – Т. 288, № 35. – С. 25266–25274.

316 Cozzi, M., Ferrari, V. Autophagy Dysfunction in ALS: from Transport to Protein Degradation // J Mol Neurosci. – 2022. – Т. 72, № 7. – С. 1456–1481.

317 Zhu, H., Geerling, J. C. AAV-PHP.eB Peripheral Delivery and Central Expression in Cre Mice // J Comp Neurol. – 2026. – Т. 534, № 1. – С. e70125.

318 Ovsepian, S. V., O'Leary, V. B., Martinez, S. Selective vulnerability of motor neuron types and functional groups to degeneration in amyotrophic lateral sclerosis: review of the neurobiological mechanisms and functional correlates // Brain Struct Funct. – 2024. – Т. 229, № 1. – С. 1–14.

319 Brooks, S. P., Dunnett, S. B. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide // Nat Rev Neurosci. – 2009. – Т. 10, № 7. – С. 519–529.

320 Oliván, S., Calvo, A. C., Rando, A., Muñoz, M. J., Zaragoza, P., Osta, R. Comparative study of behavioural tests in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis // Exp Anim. – 2015. – Т. 64, № 2. – С. 147–153.

321 Fortuna, M. G., Nyberg, L. H., Taskin, N., Hunker, A., Weed, N., Gudsnuk, K., Berg, M., Levi, B. P., Lein, E., Ting, J. T. AAV-PHP.eB achieves superior neuronal transduction over AAV9 in pigtail macaques following intracerebroventricular administration // Mol Ther Methods Clin Dev. – 2025. – Т. 33, № 4. – С. 101636.

322 Krakora, D., Macrander, C., Suzuki, M. Neuromuscular junction protection for the potential treatment of amyotrophic lateral sclerosis // Neurol Res Int. – 2012. – Т. 2012. – С. 379657.

323 Mukhamedyarov, M. A., Khabibrakhmanov, A. N., Khuzakhmetova, V. F., Giniatullin, A. R., Zakirjanova, G. F., Zhilyakov, N. V., Mukhutdinova, K. A., Samigullin, D. V., Grigoryev, P. N., Zakharov, A. V., Zefirov, A. L., Petrov, A. M. Early Alterations in Structural and Functional Properties in the Neuromuscular Junctions of Mutant FUS Mice // Int J Mol Sci. – 2023. – Т. 24, № 10. – С. 9022.