

НАНОБИОМЕДИЦИНА  
И НАНОФАРМАЦЕВТИКА

УДК 616-092.9:616.8-00

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ  
ФУЛЛЕРЕНОЛА C<sub>60</sub>(OH)<sub>30</sub> НА МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

© 2020 г. А. Д. Слободина<sup>1</sup>, О. И. Большакова<sup>1</sup>, А. Е. Комиссаров<sup>1</sup>,  
Н. В. Сурина<sup>1</sup>, С. Б. Ланда<sup>1</sup>, П. А. Мелентьев<sup>1</sup>, С. В. Саранцева<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Петербургский институт ядерной физики Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”,  
Гатчина, Россия

\*E-mail: Sarantseva\_SV@pnpi.nrcki.ru

Поступила в редакцию 18.06.2020 г.

После доработки 30.06.2020 г.

Принята к публикации 30.06.2020 г.

Актуальной задачей современной медицины является поиск препаратов, способных остановить или замедлить течение нейродегенеративных заболеваний, в частности болезни Альцгеймера. Целью работы являлось определение эффекта фуллеренола C<sub>60</sub>(OH)<sub>30</sub> на патогенез болезни Альцгеймера на модели *Drosophila melanogaster*. Исследовано влияние фуллеренола на продолжительность жизни, уровень геотаксиса, обучаемость и память, уровень нейродегенерации и активных форм кислорода в мозге животных. На основе полученных результатов можно предположить, что фуллеренол C<sub>60</sub>(OH)<sub>30</sub> является перспективным агентом для разработки комплексной терапии болезни Альцгеймера.

DOI: 10.1134/S1992722320020181

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространенной формой нейродегенеративных заболеваний. Она характеризуется прогрессирующим расстройством памяти и речи, нарушением когнитивных функций, распадом интеллекта [1]. Установлено, что риск развития БА значительно увеличивается с возрастом [2]. Несмотря на значительные усилия, направленные на поиск препаратов, способных остановить или замедлить течение БА, до сих пор не удалось разработать эффективные методы лечения этого заболевания. Успехи современной медицины и повышение качества жизни привели к значительному увеличению средней продолжительности жизни населения в большинстве развитых стран. Это, в свою очередь, повлекло за собой рост числа случаев заболеваний у лиц пожилого возраста, в том числе увеличение заболеваемости БА. Для лечения и ухода за людьми, страдающими БА, требуются большие экономические затраты. Согласно прогнозам в ближайшие несколько десятилетий ожидаются существенное старение населения и рост числа больных БА. Таким образом, БА является не только нерешенной медико-биологической, но и важной социально-экономической проблемой современного общества [3].

Значительная часть исследований показывает, что накопление в мозге токсических интермедиа-

тов амилоидных фибрилл является центральным звеном в патогенезе БА. Согласно современным представлениям наибольшей токсичностью обладают олигомеры амилоидного пептида β (Aβ) [4, 5]. В связи с этим перспективным подходом в терапии БА может служить поиск биологических молекул и химических соединений, взаимодействующих *in vivo* с Aβ и блокирующих его агрегацию [6].

Одним из факторов риска развития БА является Aβ-индуцированный окислительный стресс. Для предотвращения его негативных последствий в мозге при разработке терапии можно использовать различные антиоксиданты, к которым относятся фуллерены. Благодаря многочисленным исследованиям свойств фуллеренов и их производных в последнее время был обнаружен широкий спектр биологической активности этих веществ, которая обусловлена совокупностью физико-химических свойств этих молекул – липофильностью, электронодефицитностью и способностью генерировать синглетный кислород после облучения. Благодаря этим свойствам фуллерены могут найти применение в биологии и медицине [7]. Основная проблема изучения биологических свойств фуллеренов связана с их нерастворимостью в воде и других полярных растворителях, низкой биосовместимостью и склонностью к образованию агрегатов. Одним из

способов преодоления указанных недостатков может служить функционализация молекул фуллеренов за счет присоединения химических групп ( $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{COOH}$  и др.) или других молекул. Наиболее простым и освоенным методом является присоединение гидроксильных групп — гидроксирование фуллеренов, при этом образуются фуллеренолы [7–9].

В экспериментах *in vitro* не всегда удается воспроизвести условия целого организма, поэтому нейродегенеративные заболевания изучаются на клеточных культурах и трансгенных животных. Одним из наиболее удобных модельных объектов для исследования механизмов, лежащих в основе развития таких заболеваний, является плодовая мушка *Drosophila melanogaster*. Это многоклеточный организм, представляющий промежуточную модельную систему между культурами клеток различного происхождения, одноклеточными организмами и млекопитающими. На сегодняшний день *Drosophila melanogaster* является наиболее изученным во всех биологических аспектах модельным объектом [10–12].

В настоящей работе исследовано влияние фуллеренола  $\text{C}_{60}(\text{OH})_{30}$  на патогенез БА при моделировании его у *Drosophila melanogaster*.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез фуллеренола  $\text{C}_{60}(\text{OH})_{30}$  провели в лаборатории нейтронных физико-химических исследований НИЦ “Курчатовский институт” — ПИЯФ, новым оригинальным двухстадийным способом [13].

Для приготовления препаратов амилоидный пептид  $\beta$ , состоящий из 42 аминокислот (A $\beta$ 42), был разведен в натрий-фосфатном буфере (PBS), pH 7.5, в концентрации 5 мкМ. К готовому раствору добавляли фуллеренол  $\text{C}_{60}(\text{OH})_{30}$  в концентрации 10 мг/мл. Препараты инкубировали в течение 24 ч при температуре 37°C.

Для проведения атомно-силовой микроскопии (АСМ) на поверхность свежесколотой слюды наносили по 2 мкл образца. Образцы промывали деионизированной водой и высушивали на воздухе. Изображения получены на атомно-силовом микроскопе Solver Bio (NT-MDT) в режиме прерывистого контакта с использованием зонда NSG03 при частоте сканирования 1 Гц. В трех идентичных образцах было изучено не менее пяти областей на поверхности слюды, чтобы подтвердить однородность их структуры и определить морфологию [14].

Исследование свойств фуллеренола *in vivo* проводили на трансгенной линии *Drosophila melanogaster*, которая хорошо воспроизводит основные патологические и клинические черты БА [15]. Линия *UAS-APP.Abeta42.B (Ab)* содержит в ге-

номе последовательность, кодирующую пептид A $\beta$ 42. Экспрессию трансгена проводили в нервных и фоторецепторных клетках мух в системе *UAS-GAL4* с помощью активаторов транскрипции *elav-GAL4* и *GMR-GAL4* соответственно [16]. Далее в тексте потомки от скрещивания особей этих линий и линии *Ab* обозначены как *elav;Ab* и *GMR;Ab* соответственно. Все линии получены из Bloomington *Drosophila* Stock Center, (США). Мухи содержались при температуре 25°C и 12-часовом световом дне.

Оценку продолжительности жизни осуществляли у одновозрастных имаго. Мух содержали в пробирках с агаром по 30 особей. На агар наносили 80 мкл корма (1 г дрожжей, разведенных в 6 мл воды). В контрольных группах мух кормили дрожжами, инактивированными нагреванием до 65°C, в опытных группах в корм добавляли фуллеренол  $\text{C}_{60}(\text{OH})_{30}$  в различных концентрациях (0.05, 0.5, 2.5 мг/мл). Каждые трое суток живых мух пересаживали на свежую среду с кормом и проводили подсчет умерших особей в контрольных и опытных группах. Наблюдение проводили до обнаружения последней погибшей мухи. По окончании эксперимента подсчитывали всех учетных особей и принимали сумму за 100%. Далее строили график зависимости количества живых особей от их возраста, фиксировали показатели максимальной продолжительности жизни и 50%-ной выживаемости. В каждом эксперименте было учтено не менее 300 мух. Каждый из вариантов эксперимента повторяли трижды.

Анализ поведения *Drosophila* заключался в оценке уровня отрицательного геотаксиса (движения организмов, обусловленного силой земного притяжения) на 30-й день жизни мух. На высоком пластиковом флаконе делали отметку на расстоянии 4 см от дна. Мух (примерно 20 особей) помещали во флакон, осторожным постукиванием по флакону опускали мух на дно. Через 5 с фотографировали флакон и подсчитывали количество мух в верхней и нижней части флакона на фотографии. В каждом эксперименте тестировали по 300 мух. Эксперимент проводили в трех и более повторностях.

Уровень нейродегенерации оценивали на 30-й день жизни мух, анализируя парафиновые срезы глазных долей мозга мух. Оценивали дегенерацию фоторецепторных клеток. Для получения препаратов мозга мух фиксировали в 4%-ном параформальдегиде в течение 24 ч при температуре 4°C. Затем проводили обезвоживание в этаноле и метилом эфире бензойной кислоты и заливали парафином. Полученные парафиновые срезы толщиной 6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Препараты заключали в монтирующую среду и анализировали с помощью светового микроскопа Leica DM 2500. В каждом экспери-

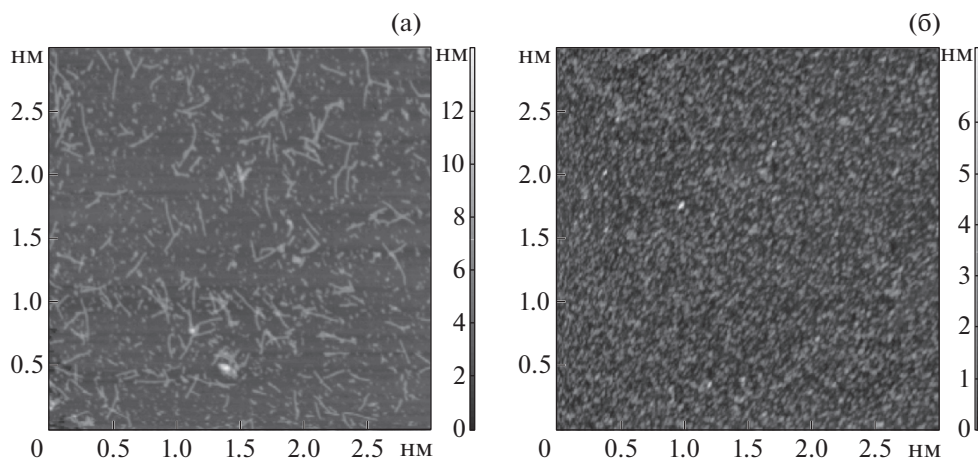


Рис. 1. АСМ-изображения агрегатов, образующихся при инкубации Аβ42 (а) и при совместной инкубации Аβ42 и фуллеренола C<sub>60</sub>(OH)<sub>30</sub> (б).

менте анализировали по шесть препаратов мозга мух. Степень нейродегенерации оценивали по соотношению площади вакуолей ко всей площади глаза в программе ImageJ.

Анализ обучаемости и среднесрочной памяти проводили классическим методом [17].

Для анализа уровня активных форм кислорода в мозге мух использовали флуоресцентный маркер H2DCF-DA (MolecularProbes/Invitrogen, Carlsbad, USA) согласно инструкции производителя.

Достоверность различий между контролем и вариантами эксперимента определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента в программе Kurplot. Полученные данные сначала были проверены на нормальность распределения критерием Шапиро–Уилка. Далее анализ проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента. Ошибкой обозначен 95%-ный доверительный интервал. Статистические решения принимали на уровне значимости:  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*). При анализе обучаемости и памяти статистический анализ данных проводили в программе Statistica10, используя методы: критерий Колмогорова–Смирнова для оценки нормальности распределения; непараметрические критерии Краскела–Уоллиса, Колмогорова–Смирнова и Манна–Уитни для попарных сравнений независимых выборок; непараметрический медианный тест для попарных сравнений независимых выборок.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы методом АСМ было проведено исследование морфологических характеристик препарата Аβ42. В инкубированных образцах наблюдался плотный слой агрегатов разного типа (рис. 1а), что отражает разные ста-

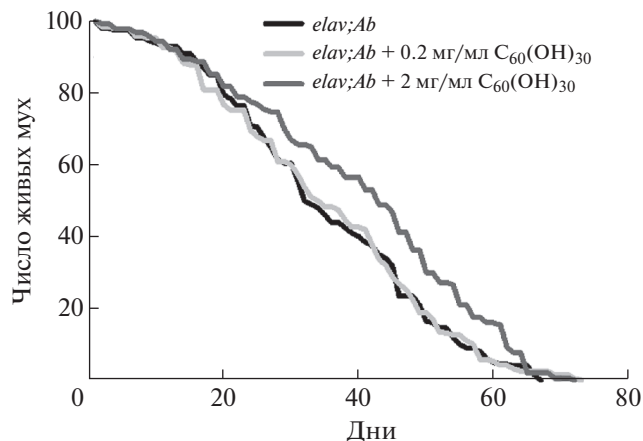
дии фибриллогенеза: асимметричные гранулярные частицы диаметром до 50–60 нм, короткие неразветвленные структуры длиной до 100 нм, стабильные высокоупорядоченные неразветвленные нити длиной до 300 нм и диаметром 40–50 нм (амилоидные фибриллы). В образцах также присутствовали пучки линейных фибрилл (около трех-четырех нитей), короткие фибриллярные структуры, возможно, протофибриллы,

При инкубации Аβ42 с фуллеренолом агрегация Аβ42 снижалась относительно контроля (рис. 1б). В образцах присутствовали только гранулярные частицы, а фибриллярные образования отсутствовали. По-видимому, наблюдаемые структуры являются комплексами мономеров или олигомеров Аβ42 и фуллеренола, что предотвращает образование зрелых амилоидных фибрилл и останавливает амилоидогенез. Действительно, показано, что фуллерены ингибируют агрегацию Аβ на ранней стадии, специфически связываясь с его центральным гидрофобным мотивом, KLVFF [18].

Исследование нейропротекторных свойств C<sub>60</sub>(OH)<sub>30</sub> *in vivo* проводили на модели БА *Drosophila melanogaster*. На первом этапе работы оценивали продолжительность жизни животных (рис. 2).

Из графиков на рис. 2 видно, что фуллеренол C<sub>60</sub>(OH)<sub>30</sub> не оказывает токсического воздействия на мух линии *Ab*. Напротив, при использовании дозы 2.0 мг/мл наблюдается достоверное увеличение 50%-ной выживаемости мух (32 дня в контроле и 43 дня при добавлении в корм фуллеренола), что говорит об улучшении качества жизни животных.

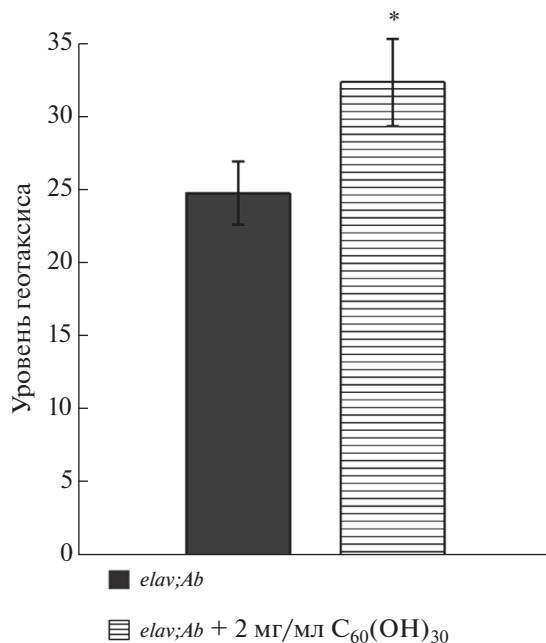
Был проведен анализ влияния C<sub>60</sub>(OH)<sub>30</sub> на нарушение поведенческих функций, наблюдаемых у мух *elav;Ab*. Анализ поведения заключался в



**Рис. 2.** Кривые выживаемости *Drosophila melanogaster* линии *elav;Ab* при добавлении фуллеренола  $C_{60}(OH)_{30}$  в корм.

оценке доли 30-дневных мух, преодолевающих условную черту в тесте на отрицательный геотаксис (рис. 3). Из представленных данных видно, что при добавлении в корм фуллеренола  $C_{60}(OH)_{30}$  наблюдается улучшение этого показателя у мух.

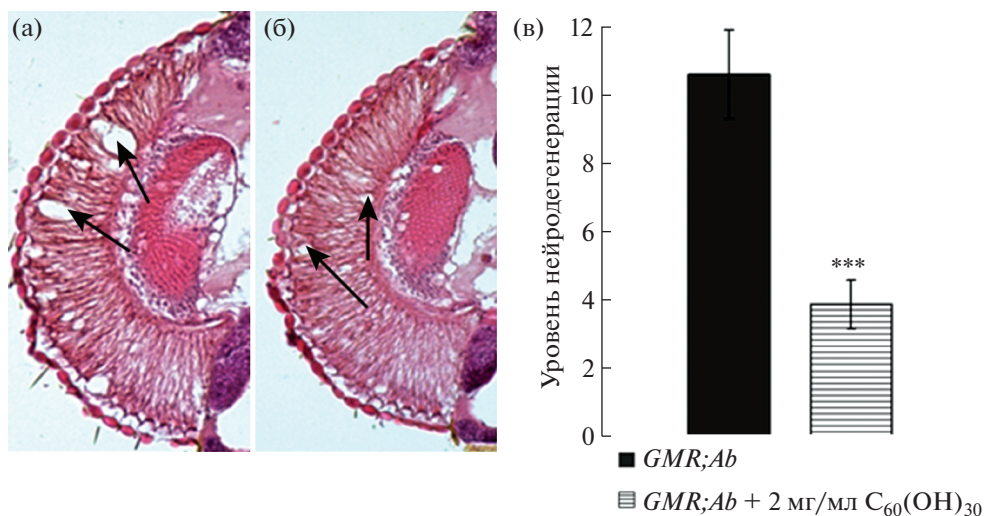
В мозге мух с экспрессией последовательности  $A\beta_{42}$  развивается прогрессирующая с возрастом нейродегенерация, которая захватывает также фоторецепторные клетки. Нейродегенерация проявляется в виде полостей, наблюдаемых на парафиновых срезах мозга мух (рис. 4а). В то же время добавление в корм фуллеренола  $C_{60}(OH)_{30}$  статистически значимо снижало уровень дегене-



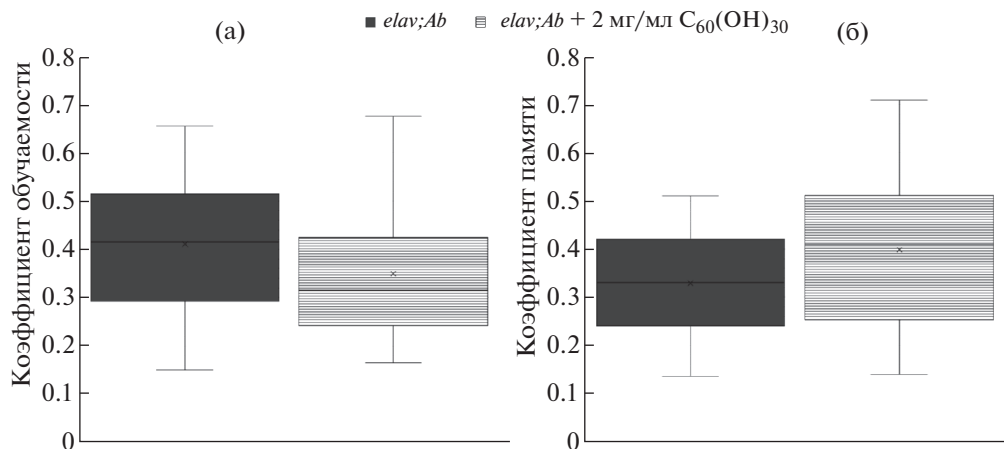
**Рис. 3.** Уровень отрицательного геотаксиса *Drosophila melanogaster* линии *elav;Ab* на 30-й день жизни при добавлении фуллеренола  $C_{60}(OH)_{30}$  в корм. Статистически значимые результаты отмечены звездочками (\* $p < 0.05$ ).

рации фоторецепторных клеток у мух *GMR;Ab* (рис. 4б, 4в).

Основным клиническим признаком БА является снижение когнитивных функций, таких как способность к обучению и память. *Drosophila* имеет хорошо развитую центральную нервную систе-



**Рис. 4.** Парафиновые срезы глазных долей мух линии *GMR;Ab* на 30-й день жизни: а – контрольный мозг мухи; б – мозг мухи, в корм которой добавляли фуллеренол  $C_{60}(OH)_{30}$  в концентрации 2 мг/мл. Стрелками показаны вакуоли; в – уровень дегенерации фоторецепторных клеток мух линии *GMR;Ab* на 30-й день жизни при добавлении фуллеренола  $C_{60}(OH)_{30}$  в корм (\*\* $p < 0.01$ ).



**Рис. 5.** Квартильная диаграмма: коэффициенты обучаемости и среднесрочной памяти особей *Drosophila melanogaster* на 30-й день жизни при добавлении фуллеренола  $C_{60}(OH)_{30}$  в корм: а – коэффициенты обучаемости; б – коэффициенты среднесрочной памяти.

му и поведенческие реакции, которые делают возможным исследовать нарушение памяти и когнитивных функций на этом модельном объекте. Анализ влияния фуллеренола  $C_{60}(OH)_{30}$  на показатели обучаемости (измеренные сразу после обучения) и среднесрочной памяти (измеренные через 30–60 мин после обучения) проводили на 30-й день жизни животных (рис. 5).

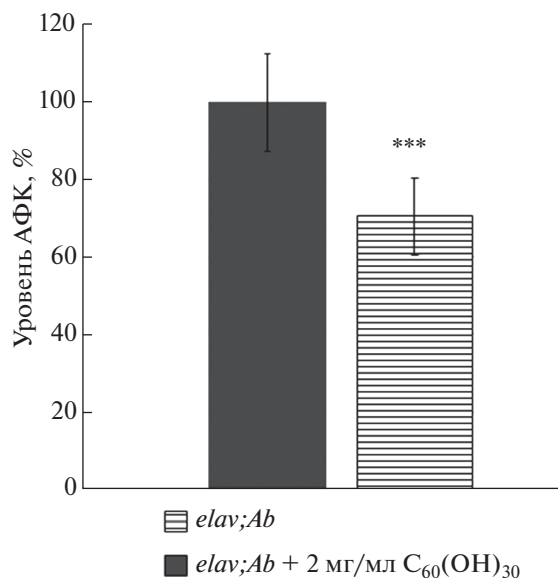
У мух, в корм которых добавляли фуллеренол  $C_{60}(OH)_{30}$ , статистически значимых различий коэффициентов обучаемости и среднесрочной памяти не было обнаружено. Для этих мух значение

медианы коэффициента обучаемости составило 0.35, а коэффициента памяти – 0.40.

Как было отмечено ранее, окислительный стресс является одним из маркеров БА. Многочисленные работы показывают увеличение уровня свободных радикалов в мозге больных БА [19–21]. В настоящей работе также наблюдали повышение уровня активных форм кислорода в мозге 30-дневных мух с генотипом *elav;Ab*, который был измерен с помощью флуоресцентного зонда H2DCF-DA. Добавление в корм фуллеренола  $C_{60}(OH)_{30}$  снижало уровень активных форм кислорода (рис. 6).

В последнее время появился ряд работ, посвященных изучению антиамилоидных свойств фуллеренов и их производных. Так, в [22] методом электронной микроскопии показано, что гидратированный фуллерен  $C_{60}$  связывается с растущими амилоидными фибриллами пептида  $A\beta_{25-35}$  и препятствует их дальнейшему росту. В [23] методом АСМ обнаружено, что фуллерены  $C_{60}$  и  $C_{180}$  ингибируют рост фибрилл, образованных пептидом  $A\beta_{16-22}$ , причем фуллерен  $C_{180}$  обладает более сильным антиамилоидным потенциалом. В [9] с помощью методов флуоресцентного анализа, АСМ и компьютерного моделирования показано, что фуллеренол  $C_{60}(OH)_{16}$  является эффективным ингибитором образования амилоидных фибрилл пептида  $A\beta_{40}$ .

Наблюдаемые в проведенном исследовании эффекты у мух, воспроизводящих признаки БА, вероятно, связаны как с подавлением агрегации  $A\beta$  фуллеренолом  $C_{60}(OH)_{30}$ , так и снижением интенсивности окислительного стресса. В то же время не обнаружено влияния  $C_{60}(OH)_{30}$  на основные клинические проявления БА – обучаемость и память животных. В литературе представлены



**Рис. 6.** Уровень активных форм кислорода (АФК) у линии *elav;Ab*.

данные о положительных эффектах фуллеренов и их производных на эти показатели. Так, в [24] одновременное введение пептида Аβ<sub>25–35</sub> и фуллерена C<sub>60</sub> в мозг крыс предотвращало нейродегенерацию, вызываемую введением одного Аβ<sub>25–35</sub>, и улучшало их способность к обучению и память. Наблюдаемые различия могут быть обусловлены методом введения наночастиц в организм. Так, фуллерен C<sub>60</sub> вводился непосредственно внутрь гиппокампа. В проведенном эксперименте C<sub>60</sub>(ОН)<sub>30</sub> добавлялся в корм животным.

Таким образом, фуллерены и их производные могут рассматриваться в качестве лекарственных препаратов для терапии БА благодаря их основным свойствам: эти молекулы обладают антиоксидантной активностью и, взаимодействуя с Аβ, препятствуют его агрегации.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом атомно-силовой микроскопии установлено, что инкубация Аβ<sub>42</sub> с фуллеренолом C<sub>60</sub>ОН<sub>30</sub> в течение 24 ч при температуре 37°C снижает агрегацию Аβ<sub>42</sub>, что указывает на его антиамилоидогенную активность.

Эксперименты *in vivo* показали, что добавление данного фуллеренола в концентрации 2.0 мг/мл в корм мух, в нервных клетках которых синтезировался Аβ<sub>42</sub>, приводит к достоверному увеличению 50%-ной выживаемости животных и снижению уровня дегенерации фоторецепторных клеток и активных форм кислорода. В то же время не было обнаружено влияния применения данного вещества на такие параметры, как обучение и память животных. Следовательно, фуллеренол C<sub>60</sub>(ОН)<sub>30</sub> является перспективным агентом для разработки комплексной терапии БА.

Авторы выражают благодарность Алине Борисенковой за предоставленные образцы фуллеренола.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 15-29-01350).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tiwari S., Atluri V., Kaushik A. et al.* // Int. J. Nanomedicine. 2019. V. 14. P. 5541.
2. *Lane C.A., Hardy J., Schott J.M.* // Eur. J. Neurol. 2018. V. 25. P. 59.
3. *Marešová P., Mohelská H., Dolejš J., Kuča K.* // Curr. Alzheimer Res. 2015. V. 12. P. 903.
4. *Selkoe D.J.* // Behav Brain Res. 2008. V. 192. P. 106.
5. *Chen X.Q., Mobley W.C.* // Front Neurosci. 2019 V. 13. P. 659.
6. *Koseoglu E.* //World J. Clin. Cases. 2019. V. 7. P. 1764.
7. *Бобылёв А.Г., Марсагишвили Л.Г., Шпагина М.Д. и др.* // Биофизика. 2010. Т. 55. № 3. С. 394.
8. *Бобылёв А.Г., Шаталин Ю.В., Выхлянцева И.М. и др.* // Биофизика. 2014. Т. 59. № 5. С. 843.
9. *Bednarikova Z., Huy P.D.Q., Mocanu M.M. et al.* // Phys. Chem. Chem. Phys. 2016. V. 18. P. 18855.
10. *Pandey U.B., Nichols C.D.* // Pharmacol. Rev. 2011. V. 63. P. 411.
11. *McGurk L., Berson A., Bonini N.M.* // Genetics. 2015. V. 201. P. 377.
12. *Tsuda L., Lim Y.M.* // Adv. Exp. Med. Biol. 2018. V. 1076. P. 25.
13. *Bolshakova O., Borisenkova A., Suyasova M. et al.* // Mater. Sci. Eng. C. 2019. V. 104. P. 109945.
14. *Hirohata M., Ono K., Takasaki J. et al.* // Biochim. Biophys. Acta. 2012. V. 1822. P. 1316.
15. *Iijima K., Liu H.P., Chiang A.S. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2004. V. 101. P. 6623.
16. *Brand A.H., Perrimon N.* // Development. 1993. V. 118. № 2. P. 401.
17. *Tully T., Quinn W.G.* // J. Comp. Physiol. 1985. V. 157. № 2. P. 263.
18. *Kim J.E., Lee M.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003. V. 303. P. 576.
19. *Chen Z., Zhong C.* // Neurosci Bull. 2014. V. 30. P. 271.
20. *Tönnies E., Trushina E.* // J. Alzheimers Dis. 2017. V. 57. P. 1105.
21. *Cassidy L., Fernandez F., Johnson J.B. et al.* // Theor Med. 2020. V. 49. P. 102294.
22. *Подлубная З.А., Подольский И.Я., Шпагина М.Д., Марсагишвили Л.Г.* // Биофизика. 2006. Т. 51. № 5. С. 795.
23. *Марусенко И.М., Авдеева Я.А., Польская И.И.* // Современная ревматология. 2009. № 3. С. 50.
24. *Gordon R., Podolski I., Makarova E. et al.* // J. Alzheimers Dis. 2017. V. 58. P. 711.