

**АННОТИРОВАННЫЙ ОТЧЕТ,
О РЕЗУЛЬТАТАХ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ РАБОТ, ВЫПОЛНЕННЫХ
НА ЭТАПЕ № 1**

«Разработка программы исследований полиглутаминовых
нейродегенеративных заболеваний на клеточных культурах и модельных
животных, проведение предварительных экспериментальных исследований»

Соглашение № 14.В37.21.0121 от 23 июля 2012 г

Тема: «Биофизическое исследование роли кальциевой сигнализации при полиглутаминовых нейродегенеративных заболеваниях»

Исполнитель: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Санкт-Петербургский государственный политехнический университет"

Ключевые слова: кальциевый сигналинг, нейродегенеративные заболевания, болезнь Хантингтона, спиналомозжечковая атаксия

1. Цель проекта

1. Нейродегенеративные заболевания относятся к группе патологий, возникающих преимущественно у людей пожилого возраста, общая частота этих заболеваний имеет четкую тенденцию к увеличению. Лечение, а точнее временное улучшение симптомов нейродегенеративных заболеваний является весьма дорогостоящим, что составляет финансовую проблему для многих людей. Нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Хантингтона (БХ) и спиналомозжечковая атаксия (СМА), представляют собой огромную медицинскую и научную проблему [1]. В последнее время появляется все большее количество данных, демонстрирующих, что нарушение кальциевого сигналинга может играть ключевую роль в развитии патологии. Несмотря на интенсивный поиск причин этих заболеваний, они до сих пор остаются неизлечимыми.

2. Основной целью настоящего проекта является выяснение роли цитоплазматического кальция в развитии нейрональных патологий и экспериментальная проверка кальциевой гипотезы на клеточных и животных моделях БХ и СМА. Кроме того, одной из основных задач данного проекта является внедрение в России оптогенетических методов изучения механизмов нейродегенеративных заболеваний. Оптогенетика позволяет исследовать работу клеток, путем внедрения в их структуру светочувствительных мембранных каналов – опсинов, которые могут в ответ на освещение световым пучком с определенной

длиной волны, изменять свойства клетки-носителя, и являются флуоресцентными метками этой клетки [2]. Основное преимущество данного метода заключается в возможности специфически включать или выключать работу исследуемого гена либо даже целой клетки.

2. Основные результаты проекта (этапа проекта)

1) Для изучения болезни Хантингтона, характеризующейся нарушенными синаптическими связями между нейронами коры и стриатума, была разработана физиологичная модель БХ. Модель основана на использовании смешанных клеточных культур кортекса и стриатума. Было показано, что в условиях смешанной культуры средние шипиковые нейроны стриатума правильно развиваются и образуют функциональные дендритные отростки.

2) Большое внимание уделялось изучению синаптической активности с использованием электрофизиологических методов. Были проведены предварительные эксперименты с использованием двухфотонного и конфокального микроскопов для исследования синаптических связей и синаптической пластичности на культуре нейронов и живых срезах мозга мышей моделей нейродегенеративных заболеваний.

3) Впервые для изучения патологии БХ были применены оптогенетические методы. Было показано, что нейроны в физиологичной модели БХ характеризуются повышенной активностью. Эти данные согласуются с экспериментами, проведенными на срезах мозга. Повышенная активность обоих типов нейронов (коры и стриатума) приводит к изменениям в морфологии дендритных шипиков. Что в свою очередь ведет к ускоренному изменению и нарушению синаптической передачи между нейронами в модели БХ. Другое заболевание, исследуемое в рамках данного проекта, спиналомозжечковая атаксия 2-го типа (СМА-2) относится к группе заболеваний, вызванных экспансией полиглутаминового тракта в гене, кодирующем белок атаксин-2. При СМА-2 наблюдаются нарушения активности и в конечном итоге деграция клеток Пуркинье– крупных эфферентных нейронов, находящихся в коре мозжечка, играющих роль пейсмейкеров, что критично для осуществления моторных функций и координации движения. Активность клеток Пуркинье в норме должна быть исключительно тонической, при нарушениях работы клеток активность иногда становится взрывной, различия определяются частотой регистрируемого сигнала. Для изучения активности клеток Пуркинье проводится запись локального изменения потенциала клетки церебеллярных срезов мышей методом луп-патч. Данная методика была впервые применена Смитом и Отисом [3], и адаптирована к

условиям нашей лаборатории. Были получены данные о том, что процент клеток имеющих взрывную активность является выше у мышей-моделей СМА-2.

4) Таким образом, в результате выполнения работ по данному этапу проекта были разработаны стандартные операционные процедуры по мониторингу изменений внутриклеточной концентрации кальция, разработана физиологическая модель БХ. Была разработана методическая часть научно-исследовательской работы, протоколы исследований нейродегенеративных патологий на срезах мозжечка подопытных животных с применением электрофизиологических технологий. Также в рамках первого этапа настоящего проекта был отработан протокол проведения билатеральных хирургических инъекций адено-ассоциированных вирусов (ААВ) в ядро мозжечка подопытных мышей. Использование данного протокола было адаптировано из экспериментальной работы Доджа [4], в которой ранее была показана высокая эффективность трансфекции клеток Пуркинье рекомбинантным ААВ *in vivo*.

3. Назначение и область применения результатов проекта (этапа проекта)

1) Нейродегенеративные заболевания остаются неизлечимыми. Гипотеза возникновения данной группы патологий, набирающая популярность последние годы, говорит о том, что нарушение кальциевого сигналинга может играть ключевую роль в развитии патологии. Таким образом, данный проект направлен на выяснение роли цитоплазматического кальция в развитии нейрональных патологий и проверки кальциевой гипотезы на клеточных и животных моделях БХ и СМА.

2) Для детального изучения молекулярных механизмов нарушения синаптической передачи при БХ более релевантными являются модели, основанные на со-культивировании клеток коры и стриатума. Так, например, в подобной культуре клеток формируются синаптические связи между нейронами разных типов, которые трудно определить в срезах или целом мозге подопытного животного из-за сложности структуры мозга. Известно, что подобные клеточные модели используются для изучения действия таргетных лекарственных препаратов.

3) Таким образом, разработанная на данном этапе проекта модель будет использоваться для определения спонтанной и индуцированной активности нейронов коры и стриатума, выяснения механизмов нарушенной синаптической передачи при БХ, а также проверки способности лекарственных препаратов устранить наблюдаемые при БХ нарушения.

4) В результате работы планируется идентифицировать механизмы, ответственные за патологические изменения кальциевой сигнализации в нейронах Пуркинье коры мозжечка на модели СМА-2, а также выяснить механизмы нарушения синаптической передачи при

БХ. Это даст возможность определить специфические мишени для создания новых лекарственных препаратов.

Данный научный проект выполняется в Лаборатории молекулярной нейродегенерации, организованной в Санкт-Петербургском государственном политехническом университете. Таким образом, лаборатория будет служить базой для организации спецкурсов для студентов старших курсов по темам: молекулярные основы нейродегенерации, механизмы кальциевой сигнализации в норме и при патологии, методы и подходы к исследованию нейродегенеративных патологий, нанотехнологии в биомедицине. В плане совершенствования образовательного процесса данные, полученные в ходе выполнения проекта, возможно, будут добавлены в лекционный материал. К окончанию данного проекта планируется ввести дополнительные главы к таким курсам подготовки магистров и бакалавров, как: «Лазерные и криогенные технологии в медицине», «Экспериментальные методы исследования», «Механизмы кальциевой сигнализации в норме и при патологии», «Новые оптические методы в биомедицине». Дополненные таким образом спецкурсы могут быть использованы в программе междисциплинарного образования.

5) После проведения начальных экспериментов, дальнейшей оптимизации и проведения фармакокинетических и токсикологических исследований, возможно проведение клинических испытаний, которые планируется проводить совместно с биотехнологическими и фармацевтическими компаниями Санкт-Петербурга (Санкт-Петербургская коммерческая группа Green Point, LLC) и зарубежных стран (датская коммерческая компания NeuroSearch A/S).

Результаты научных исследований планируется опубликовать в российских и зарубежных реферируемых журналах. В рамках темы настоящего проекта планируется подготовка кандидатской, докторской и магистерских диссертаций.

4. Достижения молодых исследователей – участников Проекта (этапа проекта)

На данном этапе в проекте принимали участие четыре молодых кандидата наук, четыре аспиранта, пять студентов.

При непосредственном участии молодых кандидатов наук Артамонова Д.Н., Плотниковой П.В., Хотина М.Г., студенток Дрожжиной Т.А. и Коржовой В.В. была разработана методическая база для осуществления оптогенетических исследований. Молодые кандидаты наук и сотрудники Попугаева Е.А., Большакова А.В., аспиранты Абушик П.А., Зайкова Ю.Я., Куранова М. Л., студентка Рыбальченко П. Д. отработывали методики получения и культивирования первичных нейрональных клеток, регистрацию

кальциевой динамики при использовании мультифотонной микроскопии, а также ряд молекулярно-биологических методов. Кроме того, аспирант Ю.Я. Зайкова проводила основную работу по контролю апоптотических процессов и выживаемости клеток в культуре. Егорова П.А и Воронцова Д.Н. активно разрабатывали и адаптировали к условиям лаборатории электрофизиологические методы, также осваивали методику билатеральных хирургических инъекций вирусного вектора в ядро мозжечка подопытных мышей.

Полученные на первом этапе настоящего проекта предварительные данные свидетельствуют о том, что молодыми сотрудниками были освоены методики, необходимые для проведения второго этапа настоящего проекта, для окончания выполнения данной научно-исследовательской работы. Используемые методики соответствуют мировому уровню в области нейробиологических исследований.

Таким образом, нами будут продолжены исследования в области проверки и доказательства кальциевой гипотезы возникновения нейродегенеративных заболеваний, на примере болезней Хантингтона и спинозжечковой атаксии -2.

5. Опыт закрепления молодых исследователей – участников Проекта (этапа проекта) в области науки, образования и высоких технологий

Молодые исследователи - участники настоящего проекта, являются сотрудниками Лаборатории Молекулярной Нейродегенерации, некоторые из них проходят обучение в магистратуре и аспирантуре федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования "Санкт-Петербургский государственный политехнический университет" (СПбГПУ). Коржова В.В. является студенткой биолого-почвенного факультета Санкт-Петербургского государственного университета. На первом этапе данного проекта Егорова П.А. была зачислена в аспирантуру СПбГПУ (выписка из приказа о зачислении прилагается), Зайкова Ю.Я. прошла предзащиту и представила диссертационную работу к защите, которая состоится 30 ноября 2012 г. (скан автореферата прилагается).

Созданный научно-образовательный центр «Фундаментальные основы медицинских и биомедицинских технологий» СПбГПУ дает возможность молодым исследователям осуществлять свою научно-исследовательскую деятельность, что приводит к повышению эффективности учебно-научного процесса на факультете медицинской физики и биоинженерии (ФМедФ) СПбГПУ. Совершенствование подготовки выпускных работ бакалавров, магистерских диссертаций студентов, кандидатских и докторских диссертаций сотрудников, повышение эффективности интеграции научной деятельности с

образовательным процессом, организация проведения совместных фундаментальных и прикладных исследований с институтами Российской Академии Наук. Долгосрочная цель создания НОЦ состоит в сохранении и развитии научно-технического потенциала Северо-Западного региона России в области фундаментальных и прикладных исследований в области медицинских и биомедицинских технологий. Закрепление молодых исследователей не сопровождалось никакими проблемами.

6. Перспективы развития исследований

1) В процессе выполнения первого этапа работы, в рамках ФЦП, сотрудники лаборатории Попугаева Е.А., Большакова А.В., Егорова П.А., Воронцова Д.Н. были направлены на научную стажировку в Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова для выполнения части научно-исследовательских работ, освоения новых методик, осуществления совместной научной работы, что, несомненно, расширяет экспериментальные возможности настоящего проекта..

2) Получен совместный грант с сотрудниками научно-образовательного центра Санкт-Петербургского университета «Молекулярно-биологические основы здоровья человека и окружающей среды Северо-западного региона России» для выполнения работ по скринингу амилоидов и структурного анализа амилоидогенных последовательностей у высших и низших эукариот.

3) Данный научно-исследовательский проект выполняется при сотрудничестве с лабораторией Безпрозванного И.Б., находящейся на кафедре Физиологии при Медицинском Центре Техасского Юго-Западного Университета, г. Даллас, США, где двое молодых сотрудников лаборатории на данном этапе проходят стажировку. Научно-исследовательская работа, проводимая совместно с американской лабораторией, обуславливает использование новейших технологий и современных методов работы в области исследования нейрональных основ патологии нервной системы. Данные, полученные в процессе совместной работы, возможно, будут использованы в будущем для получения продукции биомедицинского профиля с возможностью реализации данной продукции на региональных и глобальных рынках.

В рамках выполнения работ было выиграно три конкурса ФЦП:

ФЦП лот №2012-1.2.2-12-000-1014 тема: Поддержка научных исследований, проводимых научными группами под руководством кандидатов наук по научному направлению «Биология, медицина» в области: Фундаментальная медицина и физиология.

ФЦП лот №2012-1.3.2-12-000-1002-3204 тема: Поддержка научных исследований,

проводимых целевыми аспирантами по научному направлению «Биология, медицина» в области: Фундаментальная медицина и физиология.

ФЦП лот №2012-1.5-12-000-1001-7466 тема: "Проведение научных исследований коллективами под руководством приглашенных исследователей".

Также в рамках темы настоящего проекта заключено сотрудничество с киевским Национальным медицинским университетом имени А.А.Богомольца. Коллективами сотрудничающих лабораторий был написан инициативный проект с целью соискания совместного гранта на тему: функциональные исследования внутриклеточных ионных каналов при спинальной атрофии. Результаты конкурса будут известны во втором квартале 2013 г.

Руководитель работ по проекту

Заведующий лабораторией молекулярной нейродегенерации  И.Б. Безprozванный

Руководитель организации-исполнителя:

Ректор

30 сентября 2013г.

М.П.




А.И. Рудской

