

**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.В37.21.0219 от 23.07.2012.

Тема: «Исследование нарушения кальциевого сигналинга при полиглутаминовых нейродегенеративных заболеваниях с использованием методов оптогенетики.»

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

Ключевые слова: оптогенетика, синапс, электрофизиология, нейродегенерация, болезнь Хантингтона.

1. Цель проекта

1. Разработка и внедрение новейшего метода исследования – оптогенетики – для изучения механизмов развития нейродегенеративных заболеваний. Применение метода для исследования причин развития нейродегенеративных заболеваний – болезни Хантингтона (БХ) и спинно-мозжечковой атаксии 2 (СМА2).
2. Метод на данном этапе работы налажен и применяется на двух основных стадиях:
 - 1) Исследование нейронных сетей в культуре. Оптогенетика предоставляет новые возможности для анализа нейронных сетей. Таким образом, возможно контролировать активность отдельных нейронов с недостижимой до настоящего времени пространственно-временной точностью; 2) Исследование активности работы определенных отделов мозга после активации светом в живом организме. В данном случае, достигается возможность исследовать изменения в поведении и симптомах заболевания после воздействия светом определенной длины волны на какой-либо отдел мозга, а также возможность определить активность нейронов.

2. Основные результаты проекта (этапа проекта)

- 1) Как известно из многочисленного количества исследований, проведенных на срезах мозга мышей моделей болезни Хантингтона, нейроны как коры, так и стриатума характеризуются нарушенной спонтанной активностью. Однако, для детального изучения молекулярных механизмов нарушения синаптической передачи более релевантными

являются модели, основанные на культуре клеток. Такие модели, как правило, используются для изучения действия целевых препаратов для лечения.

2) Таким образом, разработанная в данном проекте смешанная культура нейронов коры и стриатума использовалась для определения спонтанной и индуцированной активности нейронов коры и стриатума, а также выяснения механизмов нарушенной синаптической передачи при болезни Хантингтона. Была исследована морфология дендритных шипиков. Кортиковые и стриатные нейроны характеризуются разным распределением шипиков по морфологическим критериям. В культуре YAC128 (мышь-модель БХ) в кортикальных нейронах наблюдается повышенное количество тонких дендритных шипиков по сравнению с WT. Аналогично, в стриатных нейронах YAC128 отмечено повышенное количество пеньковых дендритных шипиков.

3) Таким образом, было показано, что нейроны в культуре YAC-128 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 YAC128.

4) Коллективом исследователей были проведены ряд экспериментов по изучению функциональных нарушений при СМА2. В рамках исследований нашей лаборатории была проверена гипотеза о том, что активаторы ионных Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов малой проводимости (SK2 каналов) могут принести терапевтическую пользу при СМА2. В мозгу экспрессируются три подтипа SK каналов, в нейронах Пуркиньи преобладающей изоформой являются SK2 каналы, которые играют ключевую роль в контроле нормальной тонической активности клеток Пуркиньи. Таким образом, подтип SK2 каналов является наиболее привлекательной фармакологической мишенью для лечения СМА2. Однако, имеющиеся потенциальные модуляторы активности SK2 каналов, используемые ранее в исследованиях СМА3, являются недостаточно селективными и не проявляют должного терапевтического эффекта. В нашей работе [1], впервые для случая заболевания СМА2, были протестированы такие селективные активаторы SK каналов, как СуРРА, NS309 и NS13001, любезно предоставленные в наше распоряжение коллективом дружественной датской фармакологической компании Neurosearch A/S для проведения соответствующих тестов.

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

1) На данный момент болезнь Хантингтона и СМА2 считаются неизлечимыми. Существуют только методы лечения, позволяющие облегчить некоторые симптомы на непродолжительное время.

2) Полученные результаты помогут лучше понять патогенез социально значимых нейродегенеративных заболеваний. Результаты, полученные в ходе проекта, будут использованы в экспериментальной и клинической медицине для создания современных методов диагностики и таргетного лечения болезней Хантингтона и СМА2, что в свою очередь послужит основой для разработки конкурентно способных инновационных продуктов биомедицинского профиля.

3) Полученные в ходе выполнения работы данные позволят начать проведение клинических испытаний, которые планируются проводить совместно с биотехнологическими и фармацевтическими компаниями Санкт-Петербурга. Потенциальные лекарства для лечения нейродегенеративных заболеваний, разработанные в результате, могут быть перенесены на стадию клинических испытаний в клиниках Санкт-Петербурга.

4) Данный проект направлен на исследование инновационных методов лечения нейродегенеративных заболеваний. Исследования, проведенные на лабораторных животных показывают отсутствие каких-либо побочных эффектов оптогенетических методов на организм. Таким образом, возможное внедрение данного метода в клиническую практику будет характеризоваться минимальным воздействием.

5) В настоящее время социальные затраты на поддержание больных нейродегенеративными патологиями огромны. И продолжают возрастать с увеличением среднего возраста продолжительности жизни. Данные расходы связаны, прежде всего, с утратой работоспособности пациента. Это особенно актуально при болезни Хантингтона, так как данная патология развивается, как правило, до достижения 40-летнего возраста. А также возможной частичной потерей работоспособности человека, ухаживающего за ним. Затраты возрастают на более поздних стадиях заболевания в связи с необходимостью уделять больше времени на уход за больным. Также в эти расходы входят средства на поддержание домов престарелых. Любое новое средство терапии при данных заболеваниях несомненно будет полезно при оценке с экономической стороны.

На данный момент при заболеваниях Хантингтона и СМА2 не существует терапии, обеспечивающей полного выздоровления. Данные заболевания остаются неизлечимыми. Таким образом, новый метод, позволяющий исследовать механизмы развития заболевания и приблизиться к созданию новых средств терапии, безусловно востребован во всем мире.

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

При непосредственном участии н.с., к.б.н. Д.Артамонова были налажены и внедрены методы оптогенетики для исследования развития механизмов нейродегенеративных заболеваний *in vitro* и *in vivo*. Была разработана физиологичная модель синаптических связей между нейронами коры и стриатума с применением оптогенетических подходов. Им было показано, что в смешанной культуре образуются функциональные синаптические связи между нейронами коры и стриатума. При помощи оптогенетических методов можно осуществлять контроль над отдельными популяциями клеток в культуре. В серии экспериментов была также продемонстрирована возможность изменения синаптических связей между нейронами – синапсов – при воздействии светом определенной длины волны. Морфология спайнов (дендритных шипиков), где и локализована большая часть синапсов изучалась на конфокальном микроскопе после трансфекции нейронов красным флуоресцентным протеином – dsTomato. Средние шипиковые нейроны стриатума характеризовались большим размером шипиков после активации светом нейронов коры.

Студентка Виктория Коржова сконструировала вектор для создания лентивируса. Данная плазида содержит первый экзон гена мутантного хантингтина. При заражении клеток полученным вирусом, нейроны начинают экспрессировать мутантный белок. Таким образом, создается возможность моделировать болезнь Хантингтона в культуре нейронов полученных из мышей дикого типа.

В экспериментах лаборатории при участии аспирантки П. Егоровой было показано, что применение 5 мкМ растворов селективных активаторов SK каналов NS309 и СуPPA преобразовывает “взрывную” активность сигнала клеток Пуркинью церебеллярных срезов мышей СМА2 в возрасте 24 недель в тоническую, что соответствует активности здоровых клеток. Также исследования показали, что пероральный приём нового селективного активатора SK2/3 каналов NS13001 улучшает поведенческий и нейропатологический

фенотип мышей-моделей СМА2 старшего возраста. Основываясь на полученных результатах, было предположено, что SK2 каналы представляют собой новую мишень для лечения заболевания СМА2, а разрабатываемый селективный активатор SK2/3 каналов NS13001 имеет неплохой терапевтический потенциал для лечения СМА2 и, возможно, других cerebellarных атаксий.

При участии аспирантки П.А. Егоровой была также опубликована работа в *Journal of Neuroscience* [2]. В работе коллективом исследователей было показано, что частичное подавление инозитол 1,4,5-трифосфатрецепторопосредованного высвобождения кальция из эндоплазматического ретикулума у мутантных мышей с моделью спинномозжечковой атаксии второго типа (СМА2) предотвращает дисфункцию клеток Пуркинье мозжечка, снижает нарушение координации движений и уменьшает дегенерацию клеток Пуркинье, развивающуюся с возрастом. Для этого мышам в мозжечок был введен трансгенный аденоассоциированный вирус с геном инозитол 1,4,5-трифосфат 5-фосфатазы с точечной мутацией в активном центре, снижающей активность данного фермента, либо, в качестве отрицательного контроля, инозитол 1,4,5-трифосфат 5-фосфатазы с 2 мутациями, блокирующими активность фермента. В результате проведенных экспериментов было показано, что сверхэксперессия инозитол 1,4,5-трифосфат 5-фосфатазы с точечной мутацией в мозжечке мутантных мышей, приближала характеристики спаек на записях, полученных со срезов мозга мутантных мышей в электрофизиологических экспериментах (методом loose-patch) к характеристикам мышей дикого типа. Также наблюдались улучшения при проведении поведенческих тестов и иммуногистохимического анализа срезов мозжечка.

1. Kasumu A.W., Hougaard C., Rode F., Jacobsen T.A., Sabatier J.M., Eriksen B.L., Liang X., Egorova P., Vorontsova D., Christophersen P., Rønn L.C.B., Bezprozvanny I. Novel selective positive modulator of calcium-activated potassium channels exerts beneficial effects in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 2. *Chemistry & Biology* (2012).

2. Adebimpe Kasumu, Xia Liang, Polina Egorova, Ilya Bezprozvanny, Vorontsova D.N. Chronic suppression of inositol 1,4,5-triphosphate receptor-mediated calcium signaling in cerebellar Purkinje cells alleviates pathological phenotype in spinocerebellar ataxia 2 mice *Journal of Neuroscience* (2012).

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

Все участники данного проекта - молодые исследователи, средний возраст участников – 25.8 года. Студентки Рыбальченко П.Д., Дрожжина Т.А. проходят обучение в магистратуре 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. Абушик П.А. проходит обучение в аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН). На первом этапе данного проекта Егорова П.А. была зачислена в очную аспирантуру СПбГПУ. Все участники проекта являются сотрудниками Лаборатории Молекулярной Нейродегенерации СПбГПУ.

Обеспечение возможности молодым исследователям осуществлять свою научно-исследовательскую деятельность приводит к повышению эффективности учебно-научного процесса на факультете медицинской физики и биоинженерии (ФМедФ) СПбГПУ, что также поддерживается созданным научно-образовательным центром «Фундаментальные основы медицинских и биомедицинских технологий» СПбГПУ. Дальнейшее совершенствование подготовки выпускных работ бакалавров, магистерских диссертаций студентов, кандидатских диссертаций сотрудников, повышение эффективности интеграции научной деятельности с образовательным процессом, организация проведения совместных фундаментальных и прикладных исследований с институтами Российской Академии Наук. Закрепление молодых исследователей не сопровождалось никакими проблемами.

6. Перспективы развития исследований.

Сотрудники лаборатории Егорова П.А., Большакова А.В. и Попугаева Е.А. в процессе выполнения первого этапа работы, в рамках ФЦП, 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.

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 сотрудников лаборатории Артамонов Д.Н. и Коржова В.В. 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.

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 спинозжечковой атаксии. Результаты конкурса будут известны во втором квартале 2013 г.

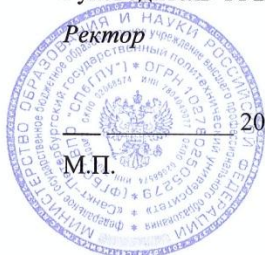
Руководитель работ по проекту:

Н.с, к.б.н.



_____ Д.Н.Артамонов

Руководитель ФГБОУ ВПО «СПбГПУ»:

Ректор



_____ 20 г.


_____ А.И. Рудской