

Молодые ученые Политеха о перспективах персонализированной медицины нейродегенеративных заболеваний



Нейродегенеративные заболевания, такие как болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона, представляют огромную медицинскую, социальную и научную проблему. Их изучением занимаются в Лаборатории молекулярной нейродегенерации Института биомедицинских систем и технологий СПбПУ. Большой повод для оптимизма дают молодые ученые - исследования некоторых поддержаны стипендиями Президента РФ. Это значит, во-первых, то, что молодежь делает сильную и интересную науку, а во-вторых, дает реальные, готовые или почти готовые к внедрению результаты.

Постулат, согласно которому клетка того или иного типа, например, клетка кожи, остается таковой до самой своей гибели, долгое время являлся основой основ биологии развития. В природе этот постулат по-прежнему непоколебим, а вот в исследовательских лабораториях сегодня он уже не действует. Медики всего мира надеются научиться лечить нейродегенеративные заболевания, которые возникают в связи с расстройствами функций нейронов, повреждениями нейронной сети, а также связанные с генетическими или возрастными изменениями, благодаря как раз-таки клеткам, способным трансформироваться в клетки различных тканей и органов. Наиболее перспективны в этом отношении эмбриональные стволовые клетки. Однако эксперименты на эмбриональных, то есть зародышевых стволовых клетках, сомнительны с этической точки зрения. Поэтому огромное значение приобрели научные работы по перепрограммированию клеток.

Цель этих исследований в том, чтобы научиться из обычных соматических клеток, имеющихся в любом взрослом организме, получать клетки, практически идентичные эмбриональным стволовым. Иными словами, речь о том, чтобы искусственно повернуть вспять развитие взрослых клеток, вновь придать им былую способность дифференцироваться в клетки разных органов и тканей. Такие модифицированные клетки называются индуцированными плюрипотентными (многофункциональными) стволовыми клетками (иПСК). А название – induced pluripotent stem (iPS) cells – предложил японский ученый, профессор Университета Киото Синъя Яманака. В 2007 году после долгих экспериментов на мышах он первый смог осуществить такое перепрограммирование клеток организма человека. Активации всего лишь четырех транскрипционных факторов (репрограммирующих факторов) оказалось достаточно для того, чтобы превратить взрослые, уже дифференцированные клетки, называемые фибробластами (взятые из мышиной кожи), обратно в плюрипотентные стволовые клетки. Из таких индуцированных плюрипотентных стволовых клеток можно получать разные типы зрелых клеток, включая клетки кожи, нейроны головного мозга и клетки сердечной мышцы. В 2012 году ученый получил за эти работы Нобелевскую премию по физиологии и медицине, а в 2014-м профессор Яманака выступил в Политехе с лекцией и рассказал о революционных достижениях клеточной инженерии.

Лаборант-исследователь Нина Красковская изучает молекулярные механизмы патогенеза болезни Хантингтона, занимается репрограммированием нейронов человека – проще говоря, превращает клетки кожи в нейроны. Сначала такая трансформация

удалась с клетками мыши, позже – и с клетками человека. А ведь если репрограммирование клеток удастся осуществить в живом организме, это откроет прямой путь к разработке новых лекарственных препаратов и даже новых терапевтических методик.

- Нина, вы получили стипендию Президента РФ за разработку новой тест-системы на основе прямого репрограммирования фибробластов пациентов в нейроны для подбора персонализированной терапии и оценки эффективности потенциальных лекарственных препаратов при болезни Хантингтона. Можете простыми словами объяснить суть этой работы?

- Я изучаю молекулярные механизмы патогенеза болезни Хантингтона с уклоном на персонализированную медицину. Налаживаю работу с нейронами человека, репрограммированными из клеток кожи. Другим способом получить нейроны человека практически невозможно, ведь для этого потребовалась бы краниотомия и извлечение определенной части мозга пациентов, поэтому большинство исследований проводится на трансгенных животных. Из новорожденных особей выделяются первичные культуры, дальше клетка культивируется, проводятся различные эксперименты, морфологические исследования и таким образом мы пытаемся установить какие-то молекулярные механизмы, которые лежат в основе патогенеза нейродегенеративных заболеваний. Дальше идет поиск мишеней, на которые можно воздействовать, чтобы заболевание вылечить или, по крайней мере, существенно остановить его развитие и прогрессирование.

- Когда говорите о трансгенных животных, вы мышей имеете в виду?

- Да. Когда мы говорим о изучении патогенеза нейродегенеративных заболеваниях человека, мышинные модели полезны. Но когда доходит до стратегий трансляционной медицины, то есть благодаря знаниям, которые мы получили на мышинных моделях и нашли какие-то молекулярные мишени или пути воздействия, и пытаемся это применить уже к лечению пациентов, в подавляющем большинстве случаев попытки, к сожалению, оказываются неудачными. Поэтому все больше исследователей сходятся во мнении, что нужно проводить исследования непосредственно на нейронах человека. Единственный способ получить их – это репрограммирование соматических клеток, таких как, например, клетки кожи.

Как известно, человек формируется из одной клетки, и есть некоторое количество плюрипотентных (многофункциональных) клеток, которые дальше делятся во все ткани организма. У взрослого человека клетки находятся в конечной стадии дифференцировки, то есть клетки кожи никогда не станут клетками мозга. Но при помощи специальных генетических манипуляций можно перепрограммировать их другой в другой тип. Первая методика прямого репрограммирования, которым я занимаюсь, была предложена только 10 лет назад. Из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, которые уже довольно широко применяются в исследовательской и клинической практике, поскольку их можно перепрограммировать из соматических клеток, и они сохраняют способность к пролиферации (делению), можно получить довольно большое количество нейрональных клеток. Однако при данном подходе теряется, скажем так, «возраст» клеток. Поскольку при прохождении через плюрипотентную стадию клетки становятся снова молодыми, то есть это, по сути, клетки с возрастом зародышевого состояния.

- В чем состоит большое научное открытие явления индуцированной плюрипотентности?

- В том, что были открыты транскрипционные факторы, которые отвечают за поддержание плюрипотентного состояния в эмбриональных клетках. И ученые предположили, что, возможно, если привнести эти факторы во взрослые соматические клетки, то получится вернуть это плюрипотентное состояние, когда клетка способна дифференцироваться в любой другой тип. Например, вы берете какой-то фрагмент ткани пациента, чаще всего это клетки кожи, из них выделяются обычные культуры фибробластов и при помощи генетических манипуляций, при помощи экспрессии определенных транскрипционных факторов, можно стимулировать дифференцировку этих клеток из фибробластов в нейроны. По сути, в чашке Петри мы получаем культуру нейронов человека непосредственно от каждого пациента. В перспективе это индивидуальный подбор лекарственных препаратов, и возможность видеть, восстанавливается ли функциональная активность нейронов.

Особая ценность подхода прямого репрограммирования, в отличие от индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, состоит в том, что он позволяет сохранить возраст клеток. То есть в плюрипотентной стадии клетки возвращаются в свое молодое состояние, а при прямом репрограммировании возраст репрограммированных нейронов у пациента будет поддерживаться. Условно говоря, взяли вы фибробласты пациента 60 лет – и репрограммированные нейроны тоже примерно будут соответствовать возрасту 60 лет.

- Нина, почему выбрали именно это направление?

- Первое высшее образование я получала в Политехническом университете на радиофизическом факультете. Но очень хотелось заниматься чем-то более прикладным. Во время обучения один из моих близких родственников заболел нейродегенеративным заболеванием, поэтому я стала много об этом читать, думать и узнала, что в Политехе есть факультет медицинской физики с направленностью в биомедицину. Пошла на день открытых дверей, изучила программу и поняла, что в магистратуру без глубоких знаний биологии, физиологии, анатомии, химии будет сложно поступить, поэтому решила заново поступить и получить второе высшее образование. К моменту, когда заканчивала бакалавриат, открылась лаборатория Ильи Борисовича Безprozванного как раз по нейродегенеративным заболеваниям. Сюда я и попала, а Илья Борисович стал моим научным руководителем. В прошлом году я закончила аспирантуру по направлению биофизики, планировала защиту кандидатской, но мы с научным руководителем решили, что больше подходит по специальности молекулярная биология, поэтому кандидатскую я защитила в новом совете Политехнического университета по молекулярной биологии.

- Нина, вы ведь тоже были на лекции профессора Яманака – его тогда пришли послушать около 600 человек, и она стала важным научным событием в Санкт-Петербурге. Ваша жизнь насыщена международными и российскими

конференциями, другими научными событиями?

- С методикой прямого репрограммирования я познакомилась в 2017 году на своей первой зарубежной конференции, посвященной болезни Альцгеймера и Паркинсона. Она проходила в Австрии. Ученые из Медицинской школы Университета Вашингтона в Сент-Луисе впервые представили там методику прямого репрограммирования. Они предложили данный метод для средних шипиковых нейронов стриатума, которые больше всего поражаются при болезни Хантингтона, которую я изучаю. Я поняла – это как раз то, что нужно, чтобы продвинуться дальше в моих исследованиях.

Сложность метода прямого репрограммирования состоит в том, что в отличие от индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, сохраняющих способность к пролиферации (делению), полученные с помощью прямого репрограммирования нейроны ограничены первоначальным количеством соматических клеток. То есть сама эффективность процесса получения нейронов из фибробластов очень низкая. Но для индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, например вы взяли, условно говоря, 100 тысяч соматических клеток, а на выходе получили 100 плюрипотентных клеток, и за счет того, что они продолжают делиться, это не является ограничением. То есть они дальше поделаются, и вы получите столько нейронов после дифференцировки, сколько вам нужно. А при прямом репрограммировании соматические клетки перестают делиться, как и нейроны, потому что клетки в нашем головном мозге не делятся – так задумано природой. Они формируют синаптические связи, нейронные сети и никогда не делятся – человек рождается, и сколько у него есть нейронов, столько их будет до конца. При прямом репрограммировании сколько вы клеток взяли в самом начале, больше нейронов вы не получите. Взяли 100 тысяч клеток, а у вас на выходе получилось всего 100 нейронов, и только с этими ста нейронами вы сможете провести эксперимент. Учитывая, что сам процесс довольно продолжительный, около 50 дней занимает, это крайне низкая эффективность. Я придумала, как можно ситуацию улучшить, чтобы метод вошел в обиход. Потому что нейроны, полученные через индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, сейчас уже широко применяются, много исследований, несмотря на их «молодой» возраст. В то время как статей по прямому репрограммированию очень мало, протоколы получения нейронов предложены, но в широкую исследовательскую практику они до сих пор не вошли.

- И эти исследования настолько перспективны, что вы оказались в числе тех, кто получил президентскую стипендию для их продолжения.

- Мы переживали, потому что конкуренция с каждым годом растет, и только 18% заявок были одобрены, поэтому да, наши исследования оценены, и считаются перспективными. Это уже вторая моя стипендия президента, первую получила в 2018 году. Тот проект закончился, но было желание его продолжить уже с применением новой методики. Выиграла еще одну стипендию президента для обучения за рубежом, поехала туда, наладила методику, стало получаться и возникла идея эту методику далее приложить к моим научным задачам, поскольку мне она кажется очень перспективной.

В 2018 году я начала эти исследования, пошагово отработывала протокол, что нужно сделать, чтобы вот такие нейроны получить, а потом на сайте Политеха увидела объявление, что есть стипендия президента для обучения за рубежом. Выиграла ее и поехала в США, в лабораторию Ильи Борисовича Безprozванного в Далласе, с твердым намерением эту методику наладить. В плане удобства там лучше – вся инфраструктура заточена на то, чтобы человек сидел и делал научную работу, большое количество вспомогательного персонала, реактивы быстро приходят, инфраструктура у них огромная и сервис оборудования лучше. Наш Политех – большой университет, а там только один научно-исследовательский институт при медицинском центре раза в два больше.

Сама по себе методика, как я уже сказала, продолжительная – в среднем где-то 50 дней занимает весь процесс. Стажировка должна была продолжаться восемь месяцев. Я проработала в Америке около двух месяцев, и, поскольку там более мощная ультрацентрифуга, стало лучше получаться, как грянула пандемия. На два месяца нас закрыли, сидела на самоизоляции, но за это время придумала, как эту методику можно улучшить по сравнению с тем, что было предложено в оригинальном протоколе. Стала свои идеи воплощать в жизнь, и сейчас у меня даже лучше получается, чем у авторов. Я очень приободрилась, поняла, что будет публикация и возможность для исследователей нейродегенеративных заболеваний по всему миру использовать эту методику.

- Медицинские технологии – это дорогостоящие исследования?

- Да, реактивы очень дорогие, и 80% успеха зависит от того, насколько они качественные. Ты можешь делать все правильно, но если реактивы изначально будут плохие, то ничего не получится. Когда уезжала в Америку, мы с научным руководителем составляли смету для стажировки и получалось около 8 000 долларов на реактивы мой небольшой проект.

- Получается, если самому методу прямого репрограммирования всего около 10 лет, то вы, можно сказать, у его истоков. А какие еще научные группы им занимаются, кого можно назвать вашими конкурентами?

- Здоровая конкуренция – это здорово. Но мы все равно в хороших отношениях с учеными, которые тоже работают в этой области. В Институте цитологии РАН в Санкт-Петербурге группа Елены Казначеевой тоже занимается похожими вещами, схожими биохимическими методами они идут к поиску молекулярной мишени для терапии болезни Хантингтона. Они как раз работают с нейронами, полученными через индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, а я – с нейронами, полученными методом прямого репрограммирования. Глобально если посмотреть на картину, то получается, что наши исследования взаимно дополняют друг друга, и это очень хорошо, когда одна группа показала результаты, а вы подтвердили эти результаты на другой модели.

За рубежом оригинальный протокол был предложен группой под руководством Эндрю Ю, он был постдоком в Гарварде. Сейчас у него своя лаборатория в Сент-Луисе, но они, скажем, делают больше упор на изучение механизмов прямого репрограммирования, то есть американские ученые сделали протокол, как эти нейроны можно получить, и на этом остановились, в глубину молекулярных механизмов, патогенез не идут. А у меня более практическая задача – разработать модель и применить ее для исследования молекулярных механизмов патогенеза болезни Хантингтона, проверить терапевтические агенты уже на нейронах, полученных от реальных пациентов. Надеюсь, что мой проект принесет глобальную пользу людям и станет важным этапом доклинических испытаний. Потому что обычно на мышиных моделях все получается, а дальше уже непосредственно на пациентах

с нейродегенеративными заболеваниями проводят клинические испытания, и больше 95% разработок проваливаются. Разрабатываемая мною модель может стать важным доклиническим этапом. То есть сначала проверили на мышиных моделях, а дальше хорошо бы посмотреть, как нейрональные клетки человека будут реагировать на то или иное соединение или терапевтический подход, прежде чем начинать масштабные исследования на пациентах.

Когда публикуется протокол, не всегда в нем указываются все тонкие моменты, потому что авторы каждый день что-то делают, и им это кажется очевидным. Мне хочется другим исследователям, которые тоже интересуются этим методом, предложить что-то, поскольку я сама каждую стадию проделала, поняла каждый тонкий нюанс, и кому-то мой протокол, возможно, будет полезен. Я сосредоточена на изучении молекулярных механизмов болезни Хантингтона, но этот протокол можно использовать для дифференцировки другого типа нейронов, например моторных нейронов, которые поражаются при боковом амиотрофическом склерозе. Гипотетически можно также это сделать для дофаминергических нейронов, которые поражаются при болезни Паркинсона, то есть перспективы очень широкие.

- Нина, какие у вас планы?

- Я ни разу не пожалела, что ушла в научно-исследовательскую область. Мне нравится, что здесь такой простор для творчества, самореализации, столько разных интересных направлений и проектов, коллабораций. Мы с коллегами из нашей Лаборатории молекулярной нейродегенерации сейчас выполняем еще один грант с бельгийскими учеными из Католического университета Лёвена. Группа Герта Бутанка тоже изучает молекулярные механизмы болезни Альцгеймера. Долгое время они на клеточном уровне изучали молекулярные механизмы и поняли, что есть какой-то эффект, и нужно двигаться уже дальше на уровень организмов. Мы выводим их на трансгенных моделях, дальше их разработки продолжаем – интересно получается. Хотелось бы дальше заниматься этим проектом.

Сейчас молодых ученых довольно серьезно поддерживают в рамках грантов РФФИ, стипендий президента, поэтому есть возможность себя реализовать, сосредоточиться на своих научных задачах и полностью этому себя посвятить. До этого у меня был свой небольшой аспирантский грант, следующая цель – получить грант Российского научного фонда, там как раз есть для молодых исследователей. Буду дальше продвигать методику прямого репрограммирования, чтобы оказать реальную помощь в борьбе с нейродегенеративными заболеваниями.

Лаборатория молекулярной нейродегенерации (ЛМН) открылась в СПбПУ в 2012 году благодаря программе мегагрантов, главная цель которой – привлечь в российские вузы ведущих исследователей со всего мира. ЛМН была открыта с учетом мировых тенденций и научных достижений, она прививает в российской среде лучшие образцы культуры организации научной деятельности, выводит работы наших исследователей в русло мировых научных трендов. Вести исследования в лаборатории имеют возможность магистранты, преподаватели и аспиранты, перед которыми открываются большие перспективы научной карьеры – у них есть возможность работать на уникальном современном оборудовании, заниматься исследованиями в прорывных направлениях науки.

Возглавляет лабораторию ученый с мировым именем, признанный специалист в области исследования механизмов возникновения и патогенеза болезни Альцгеймера профессор Юго-Западного медицинского центра Университета Техаса (США), доктор биологических наук Илья Борисович Безprozванный.