

ЗАПИТ
на проведення наукової (науково-технічної) роботи

1. Назва роботи

Роль іонів металів у патогенезі синуклеїнопатій людини: аналіз токсичних ефектів та нові підходи до терапії

2. Вид тематики

II. Програмно-цільова та конкурсна тематика НАН України

3. Назва цільової програми або цільового проєкту

Цільова програма наукових досліджень НАН України «Геномні, молекулярні та клітинні основи розвитку інноваційних біотехнологій» на 2020–2024 рр.

4. Назва розділу програми або напрям цільового проєкту

н е м а є

5. Строки виконання роботи

01 квітня 2020 р. - 31 грудня 2024 р.

6. Код програмної класифікації видатків

6541030 (фундаментальні дослідження)

7. Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки

Фундаментальні наукові дослідження з найбільш важливих проблем розвитку науково-технічного, соціально-економічного, суспільно-політичного, людського потенціалу для забезпечення конкурентоспроможності України у світі та сталого розвитку суспільства і держави

8. Пріоритетний тематичний напрям наукових досліджень і науково-технічних розробок

Фундаментальні проблеми наук про життя та розвиток біотехнологій


9. Код та назва наукового напрямку (проблеми) з Основних наукових напрямів та найважливіших проблем фундаментальних досліджень у галузі природничих, технічних і гуманітарних наук

2.2.4.1. Вивчення механізмів регуляції функціональних систем організму за умов норми і патології

10. Науковий керівник роботи

Вовк Олена Іванівна, к.б.н., молодший науковий співробітник, Інститут біології клітини НАН України
телефон: (032)2612146; факс: +38 032 261 2148; e-mail: vovkoliv@gmail.com

11. Відповідальні виконавці

Прізвище, ім'я та по батькові	Науковий ступінь, посада, місце роботи, телефон, електронна адреса	Підпис
Стасик Олег Володимирович	д.б.н., с.д., завідувач відділу, ІБК НАН України, тел.: +38 032 261 2146, e-mail: StasykOV@nas.gov.ua	
Бобак Ярослав Петрович	к.б.н., старший науковий співробітник, ІБК НАН України, тел.: (032)2612146, e-mail: bobak@cellbiol.lviv.ua	
Шувасва Галина Юрївна	к.б.н., молодший науковий співробітник, ІБК НАН України, тел.: (032) 2612146, e-mail: shuvayeva77@gmail.com	
Чернишук Світлана Василівна	інженер, ІБК НАН України, тел.: (032) 2612146, e-mail: chernushyk@nas.gov.ua	

12. Установи - співвиконавці

н е м а є

13. Ключові слова

хвороба Паркінсона, α -синуклеїн, іони металів, оксидативний стрес, рекомбінантні модельні організми

14. Резюме

Сьогодні питання про нейропротекцію у разі ХП є чи не найголовнішим, адже порівняно з досягненнями у симптоматичній корекції рухових розладів, впливу на природний перебіг захворювання практично не існує. Розробка методів терапії, спрямованих на пом'якшення або відтермінування захворювань, пов'язаних із віком, є головним пріоритетом для біомедичної спільноти. Невтішні результати десятків клінічних випробувань фази III лікування хвороби Альцгеймера та хвороби Паркінсона вказують на необхідність нових підходів до виявлення нових мішеней, які керують процесами, що спричиняють нейропатології. В останні роки біогенні поліаміни, похідні амінокислоти L-аргініну (агматин, путресцин, спермідин і спермін) привертають до себе особливий інтерес науковців. Експерименти *in vitro* продемонстрували, що спермідин подовжує хронологічний період життя дріжджів, водночас затримуючи некротичну загибель цих клітин, сприяє збільшенню раундів реплікації ДНК та індукує автофагію не лише у клітинах дріжджів, але й тварин, нематод і комах. Клітини постійно зазнають стресу, спровокованого продуктами власного метаболізму, змінами навколишнього середовища, коливаннями рівнів активних форм кисню, рН, осмотичного тиску та температури. З літературних джерел відомо, що поліаміни пов'язані з реагуванням клітини на стрес та її захистом від негативних внутрішньо- та позаклітинних чинників. Зниження внутрішньоклітинних рівнів цих сполук асоціюють із старінням і хворобами, зокрема нейродегенеративними, до яких належать ХП. Модуляція концентрації поліамінів шляхом екзогенного додавання або хімічними чи генетичними методами може підвищувати стійкість клітин до стресу, зумовленого зростанням рівнів АФО, чи накопиченням аномальних форм білків (окисно модифікованих, або агрегованих), як це трапляється у разі нейродегенеративних захворювань. Оксидативний стрес викликається незбалансованим окислювально-відновним станом, що передбачає або надмірне генерування АФО, або дисфункцію антиоксидантної системи. Мозок є одним із органів особливо чутливих до впливу АФО внаслідок високої потреби у кисні та наявності великої кількості сприйнятливих до перекисного окислення ліпідів. Попередні дослідження виявили, що оксидативний стрес відіграє центральну роль у загальній патофізіології таких нейродегенеративних захворювань, як хвороба Альцгеймера та хвороба Паркінсона. Теорія вільних радикалів старіння надихнула багатьох дослідників використовувати скавенджери АФО для пригнічення індукції оксидативного стресу, який є чи не головною причиною змін у протеостазі нейронів, спричиняючи окисні модифікації білків, що, у свою чергу перешкоджає їхній ефективній деградації. Нейрони належать до пост-мітотичних клітин і не здатні позбуватися клітинного шлаку в процесі поділу, як це відбувається в інших клітинах. Тому, створення в організмі умов за допомогою низькомолекулярних сполук природного походження, необхідних для ефективного функціонування автофагійної деградації пошкоджених білків і органел, є одним із очевидних перспективних підходів до супресії розвитку нейродегенеративних захворювань.

Головна мета цього проекту полягає у використанні моделей синуклеїнопатій людини на основі термотолерантних дріжджів *O. polymorpha* (які експресують мутовані форми людського білка альфа-синуклеїну, головного маркера хвороби Паркінсона) та клітинної лінії нейробластоми людини SH-SY5Y та її субліній (з експресією мутованих форм альфа-синуклеїну) для скринінгу терапевтичних чинників нових і вже існуючих, які б забезпечували ефективну нейропротекцію (антиоксидантний і антиапоптичний вплив) та деградацію аномальних форм альфа-синуклеїну на тлі впливу іонів металів (таких як манган, ферум, купрум і ін.).

Для реалізації завдань запропонованого проекту буде сконструйовано генетично модифіковані штами дріжджів *O. polymorpha* та сублінії клітин нейробластоми людини SH-SY5Y з експресією мутованих форм альфа-синуклеїну, схильних до швидкої агрегації. Такі моделі дадуть змогу встановити вплив іонів феруму, мангану та купруму на окисні процеси в клітинах штамів дріжджів і нейробластоми людини SH-SY5Y з експресією мутованих форм альфа-синуклеїну людини; з'ясувати як саме ці метали впливають на властивості альфа-синуклеїну - його здатність до агрегації та деградації шляхом автофагії. Агентами, які планується використовувати як скавенджери АФО та індуктори автофагійної деградації білків і пошкоджених органел, будуть поліаміни - агматин, спермідин, спермін і путресцин, протектора дія яких вже була встановлена для інших біологічних об'єктів.

У роботі будуть використані молекулярно-біологічні, біохімічні та мікробіологічні методи досліджень. Зокрема, для встановлення локалізації альфа-синуклеїну та виявлення його агрегатів у клітинах модельних штамів дріжджів і субліній нейробластоми людини SH-SY5Y буде сконструйовано вектори для експресії химерного альфа-синуклеїну, кон'югованого зі зеленим флуоресцентним білком, та застосовано флуоресцентну мікроскопію. Для дослідження властивостей людського альфа-синуклеїну за впливу іонів металів і поліамінів, зокрема виявлення його олігомерних форм, протофібрил і фібрил, буде використано електрофорез в поліакриламідному гелі із модифікаціями за неденатуруючих умов. За допомогою біохімічних та імуноцитохімічних методів буде проаналізовано якісні та кількісні зміни в активності ензиматичної ланки антиоксидантного захисту, коливання пулів продуктів окисної модифікації білків і ліпідів за впливу іонів металів і поліамінів у модельних біосистемах. Методом Вестерн-блот аналізу та кількісної полімеразної реакції (ПЛР) буде оцінено рівень експресії ключових *ATG* генів і відповідних білкових продуктів (*Atg1*, *Atg6*, *Atg7*, *Atg7*, *Bcl-2*, *PARP* та ін.), задіяних в процесах автофагії. Вплив іонів металів і поліамінів на процеси апоптозу в клітинах модельних біосистем буде контролюватися на рівні транскрипційної активності генів, продукти яких беруть участь у процесах запрограмованої клітинної загибелі, на рівні експресії проапоптичних і антиапоптичних білків та імуноцитохімічними методами.

Заключний етап проекту буде полягати у пошуку найоптимальнішої комбінації поліамінів та їхніх нетоксичних концентрацій для коригувального впливу на антиоксидантну систему захисту, ефективної індукції автофагійної деградації та пригнічення апоптозу, з метою корекції фізіологічного стану клітин при індукції оксидативного стресу чи експресії мутованих форм білка альфа-синуклеїну.

15. Обґрунтування доцільності виконання роботи

15.1. Цілі та завдання роботи, її актуальність, соціальна та економічна значимість.

Нейродегенеративні розлади набувають все більшого поширення у всьому світі і стають все більшим тягарем для старіючого населення. Згідно з доповіддю ООН про старіння населення за 2015 рік, кількість людей у віці 60 років і старше зростає у всьому світі більш ніж удвічі за наступні 35 років, досягнувши майже 2,1 мільярда людей. Зі збільшенням тривалості життя людини кількість пацієнтів з нейродегенеративними розладами стрімко зростає. Хоча багато вчених присвячують свою роботу дослідженню патогенезу та розвитку нейродегенеративних порушень мозку, наразі залишається багато нез'ясованих питань щодо етіології цих захворювань. Також залишається багато невирішених питань щодо розробки практичного лікування цих патологій, оскільки нейродегенеративні захворювання важко діагностувати на ранніх стадіях і, відповідно, вчасно вжити профілактичних заходів. Хоча багато людей з ХП зберігають позитивні риси особистості та особистісні якості, в міру погіршення стану вони можуть відчувати істотні проблеми: втрату пам'яті, зниження швидкісних характеристик та продуктивності мислення, погіршення мови, порушення орієнтації, зміни особистості, труднощі в повсякденній діяльності, нехтування власними потребами, некогнітивні прояви та нехарактерну поведінку. У більшості розвинених країн пацієнтами опікуються не лише медичні працівники, а й соціальні служби. При цьому нейродегенеративні захворювання зумовлюють комплекс потреб і, особливо на більш пізніх етапах, високий рівень соціальної залежності та супутньої захворюваності. Ці потреби пацієнтів у догляді часто кидають виклик навичкам і здібностям осіб, які здійснюють догляд, та співробітникам служб соціальної допомоги. Станом на 2016 рік у 276 млн населення Землі неврологічні розлади були провідною причиною втрачених та прожитих із втратою працездатності років (ВРЖВП) і однією із провідних причин смертності (9,0 млн). Абсолютна кількість випадків смерті та втрати працездатності від усіх неврологічних порушень помітно зростає (смертність на 39%, ВРЖВП на 15%). В цілому було встановлено, що тягар неврологічних розладів за останні 27 років збільшився і, ймовірно, збільшуватиметься у майбутньому внаслідок одночасного зростання чисельності та старіння населення, тим самим спричиняючи зростаючий попит на ресурси та послуги для пацієнтів при неврологічних розладах. Існує нагальна світова потреба в удосконаленні профілактики та управління неврологічними порушеннями. Ефективних способів зупинити старіння організму та попередити розвиток нейродегенеративних захворювань на сьогодні не існує, проте спроби модулювати процес старіння та відтермінування патологічних змін у ЦНС є перспективним підходом для досягнення так-званого «фізіологічного» старіння організму із збереженням продуктивної діяльності особистості.

Нейродегенерація за визначенням порушує властивості центральної нервової системи, впливаючи на функції, структуру та виживання нейронів. Теорія вільних радикалів старіння надихнула багатьох дослідників, використовувати скавенджери АФО для пригнічення індукції оксидативного

стресу, який є чи не головною причиною змін у протеостазі нейронів, спричинюючи окисні модифікації білків, що, у свою чергу перешкоджає їхній ефективній деградації.

Добре відомо, що гомеостаз металів відіграє важливу роль у регуляції клітинних функцій. Купрум, ферум, манган і цинк є важливими для нейротрансмісії, ферментативних реакцій і мітохондріальних функцій, регульованих центральною нервовою системою (ЦНС). Таким чином, дисбаланс іонів металів спричинює патологічні стани, серед яких - нейродегенеративні розлади. Докази накопичення заліза в *substantia nigra* головного мозку пацієнтів з ХП з одночасним накопиченням включень неправильно згорнутого альфа-синуклеїну вказує на прямий зв'язок між залізом та альфа-синуклеїном у патогенезі ХП. Альфа-синуклеїн, знайдений у тільцях Леві, існує у вигляді високо упорядкованих агрегованих форм, які можна описати як олігомери та / або фібрили. В умовах оксидативного стресу на процеси агрегації альфа-синуклеїну в основному впливає взаємодія з редокс-активним залізом. Серед найпоширеніших редокс-активних перехідних металів у мозку купрум виявляє найбільшу спорідненість до альфа-синуклеїну. Проте у головному мозку пацієнтів з ХП рівень купруму є знижений, тоді як рівень заліза, навпаки, підвищений. Таким чином, взаємодія заліза з альфа-синуклеїном є більш поширеною за умов патології. Здатність альфа-синуклеїну перетворювати залізо (III) на залізо (II) підкреслює ферриредуктазну активність цього білка, що може мати функціональне значення. І навпаки, надмірна експресія альфа-синуклеїну може призвести до надмірної продукції заліза (II), що в кінцевому підсумку може призвести до оксидативного стресу шляхом надлишкової генерації АФО, опосередкованої реакцією Фентона.

Створення в організмі умов за допомогою низькомолекулярних сполук природного походження, необхідних для ефективного функціонування автофагійної деградації пошкоджених білків (окисно модифікованих, агрегованих) і органел з порушеними функціями, є одним із очевидних перспективних підходів до супресії розвитку нейродегенеративних захворювань. До речовин, яким притаманні антиоксидантні властивості належать поліаміни (агматин, путресцин, спермід і спермідин), які можуть виконувати функцію скавенджерів АФО. Ці сполуки здатні пригнічувати апоптоз і є необхідними для проліферації клітин. Такі властивості надають перевагу поліамінам як потенційним препаратам для захисту нейронів від оксидативного стресу та передчасної загибелі. Щодо використання поліамінів як агентів, які здатні активувати процеси автофагії та пригнічувати апоптичну загибель клітин, ці сполуки також мають відповідний потенціал, який підтверджено низкою досліджень. З огляду на все вище сказане, комбінування впливу різних поліамінів за нетоксичних концентрацій, може стати новою платформою для створення терапії нейродегенеративних захворювань, таких як ХП, та сповільнити процеси нейродегенерації в старіючому організмі. Очевидно, що клінічна практика повинна трансформуватися таким чином, щоб забезпечити створення методів, які ґрунтуються на протидії механізмам порушення зв'язку між основними процесами старіння та хронічними захворюваннями.

15.2. Стан розроблення проблеми.

Головними ознаками ХП сьогодні вважаються неправильний фолдинг білка альфа-синуклеїну, агрегація, формування тілець-включень (амілоїдні бляшки, фібрилярні клубочки, агрегати поліглутаміну) та оксидативний стрес, нейрозапалення та мітохондріальна дисфункція. Усі ці прояви потребують корекції для підвищення життєздатності нейронів і зменшення побічних ускладнень від патологічних змін мозку. Тому авторами проекту вперше пропонується аналіз координованого застосування поліамінів (агматину, путресцину, сперміну та спермідину) для одночасної модуляції прооксидантно-антиоксидантної рівноваги в обраних моделях, ініціації деградації альфа-синуклеїну людини та пригнічення апоптозу, базуючись на знаннях про біологічні функції поліамінів у регуляції росту, проліферації, життєздатності клітин і відповіді на оксидативний стрес, індукований токсичними факторами, такими як іони металів (феруму, купруму, мангану) які діють на різні клітинні мішені, зумовлюючи надлишкове утворення АФО. Більшість моделей ХП, які використовувалися для вивчення ролі оксидативного стресу та дисфункції мітохондрій у етіології цього захворювання, були отримані за впливу хімічних агентів, які специфічно взаємодіяли з компонентами дихального ланцюга мітохондрій. Ми пропонуємо провести такі дослідження на штамах *O. polymorpha* та клітинах субліній нейробластоми людини SH-SY5Y, що експресують мутовані форми альфа-синуклеїну людини. Відомо, що альфа-синуклеїн взаємодіє з мембранами мітохондрій, викликаючи їхню пермеабілізацію, деполаризацію та, як наслідок, утворення надлишку вільних радикалів, які, у свою чергу, незворотно модифікують альфа-синуклеїн і викликають його

місфолдинг і агрегацію. Для вилучення олігомерів альфа-синуклеїну пропонується застосувати поліаміни як індуктори автофагії в *in vitro* та *in vivo* моделях. Хоча спермідин може взаємодіяти з альфа-синуклеїном і викликати його місфолдинг і агрегацію, можливо, доза цієї сполуки у поєднанні з агматином, або іншими поліамінами, може визначати рівень окисної модифікації альфа-синуклеїну та ефективність його автофагійної деградації. До сьогодні взаємодія спермідину з альфа-синуклеїном досліджувалася лише в штучних умовах, коли білок інкубували з цим поліаміном й аналізували утворення агрегатів. Ми ж пропонуємо здійснити такі дослідження в модельних біосистемах, які використовуватимуться під час виконання проекту. Прогнозується, що введення екзогенного спермідину певною мірою сприятиме агрегації альфа-синуклеїну, проте індукватиме автофагію цього білка, тоді як агматин перешкоджатиме окисній модифікації альфа-синуклеїну і сприятиме його ефективній деградації. У свою чергу пригнічення апоптозу за допомогою спермідину може позитивно вплинути на продовження тривалості життя та виживання клітин, які зазнали впливу цього поліаміну. Роль путресцину та сперміду в антиоксидантному та антиапоптичному, а також в регуляції автофагії сьогодні є мало дослідженою, тому використання цих поліамінів у наших дослідженнях дасть змогу встановити чи ці сполуки є ефективними для захисту клітин від патологічних змін, зумовлених впливом надлишку іонів металів і мутованих форм альфа-синуклеїну. Таким чином ми вперше пропонуємо використовувати комбінацію поліамінів для корекції патологічних змін, притаманних спадковій і набутій формам ХП. Наш підхід є більш масштабним і не обмежується лише захворюваннями, спричиненими накопиченням амілоїдних білків у клітинах нейрональної тканини при ХП, а передбачає також корекцію патологічних процесів, які відбуваються в нейронах при інших нейродегенеративних захворюваннях, головними ознаками яких є накопичення амілоїдних білків, оксидативний стрес і пригнічення процесів автофагії.

15.3. Досвід і доробок авторів.

Авторами проекту за попередні роки вперше було сконструйовано штами термотолерантних дріжджів *Ogataea (Hansenula) polymorpha*, в яких продукується альфа-синуклеїн людини, мічений зеленим флуоресцентним білком (EGFP) (Denega et al., 2014; Romanyshyn et al., 2016). Виявлено, що отримані штами спонтанно не формували амілоїдів альфа-синуклеїну, а сам білок помітно не впливав на ріст культури за фізіологічних умов культивування (1 % глюкози в ростовому середовищі). Для моделювання умов гіпоглікемії у клітинах *O. polymorpha* використовували середовище із 0,1 % глюкози, а для моделювання гіперглікемії – середовище з 10 % глюкози. Встановлено, що як дефіцит так і надлишок глюкози в культуральному середовищі помітно не впливали на ріст модельного штаму-продуцента альфа-синуклеїну у порівнянні зі штамом дикого типу (Romanyshyn et al., 2016).

За допомогою флуоресцентного барвника 2,7-DCFH-DA з'ясовано, що дефіцит глюкози зумовлював зростання рівня АФО у клітинах *O. polymorpha*. Як наслідок, відбувалося підвищення активності антиоксидантних ферментів (СОД та КАТ) та вмісту відновленого глутатіону, при цьому вміст продуктів окисної модифікації білків і ліпідів також зростав в обох досліджуваних штамів. Важливо також зазначити, що рекомбінантний альфа-синуклеїн не впливав на відповідні параметри в клітинах модельного штаму. Додавання спермідину або агматину в середовище з дефіцитом глюкози сприяло зменшенню вмісту активних форм кисню в клітинах дикого типу й, як наслідок, зниженню активності ферментів СОД і КАТ, вмісту відновленого глутатіону та продуктів окисної модифікації білків і ліпідів (Grushanyk, Stasyk & Stasyk, 2019, accepted to print). Проте вплив спермідину на стан прооксидантно-антиоксидантної рівноваги в клітинах модельного штаму принципово відрізнявся від клітин дикого типу, культивованих зі спермідином чи агматином. В цьому конкретному випадку дія спермідину нівелювалася гетерологічним альфа-синуклеїном, що вказувало на можливу взаємодію цього поліаміну з людським білком, тоді як агматин не виявляв таких властивостей. Розуміння відмінності у впливі цих поліамінів на антиоксидантну систему захисту клітин модельного штаму та їхню здатність взаємодіяти з людським альфа-синуклеїном потребує подальших досліджень.

З метою моделювання впливу дефіциту аргініну на процеси автофагійної деградації альфа-синуклеїну, який *in vivo* може бути створений із використанням аргінін-деградуючих ферментів (Stasyk et al., 2015), у модельного штаму було делетовано ген аргініносукцинатсинтетази. Встановлено, що дефіцит аргініну індуктував автофагію в клітинах ауксотрофного модельного штаму, проте не зумовлював повної деградації гетерологічного альфа-синуклеїну. Таке явище можна пояснити тим, що частина альфа-синуклеїнових олігомерів взаємодіє з клітинними мембрани і

не зазнає ефективної деградації за умов його надекспресії, а біосинтез альфа-синуклеїну є домінуючим у порівнянні з процесами деградації цього білка в клітинах модельного штаму. Також було встановлено, що вміст гетерологічного альфа-синуклеїну людини в клітинах модельного штаму дріжджів *O. polymorpha*, культивованих на середовищі з глюкозою як джерелом карбону та екзогенним поліаміном, спермідіном, зростає, хоча вакуолі у клітинах займали близько 80 % об'єму цитоплазми, що опосередковано вказувало на активацію процесів автофагії. Проте додавання екзогенного спермідину в культуральне середовище з трегалозою, як джерелом карбону, не впливало на морфологію клітин модельного штаму та штаму дикого типу, та не призводило до аномального збільшення розмірів клітин і об'єму вакуолей. Крім цього, за допомогою зворотно-транскрипційної полімеразної ланцюгової реакції було виявлено, що спермідин протягом 5 годин культивування модельного штаму на середовищі, яке містило цей поліамін, не впливав на рівень експресії генів *ATG1*, *ATG6*, *ATG7* та *ATG8*, які кодують білки, задіяні в процесах автофагії. Таке явище можна пояснити тим, що 5 годин культивування було недостатньо для виявлення ефекту спермідину на транскрипційну активність маркерних генів, або цей поліамін реалізовував свій вплив на рівні пост-трансляційних модифікацій Atg білків. Ці питання залишаються відкритими і очевидно потребують додаткового вивчення.

Основні наукові публікації авторського колективу за тематикою роботи:

1. Stasyk OG, Denega IO, Padhorny D, Dmytruk KV, Kozakov D, Abbas C, Stasyk OV. Glucose regulation in the methylotrophic yeast *Hansenula (Ogataea) polymorpha* is mediated by a putative transceptor Gcr1. *Int J Biochem Cell Biol.* 2018 Oct;103:25-34. doi: 10.1016/j.biocel.2018.08.002. IF – 3.29
2. Chen OI, Bobak YP, Stasyk OV, Kunz-Schughart LA. A Complex Scenario and Underestimated Challenge: The Tumor Microenvironment, ER Stress, and Cancer Treatment. *Curr Med Chem.* 2018;25(21):2465-2502. doi: 10.2174/0929867325666180117110259. IF – 3.29
3. Hinrichs CN, Ingargiola M, Käubler T, Löck S, Temme A, Köhn-Luque A, Deutsch A, Vovk O, Stasyk O, Kunz-Schughart LA. Arginine Deprivation Therapy: Putative Strategy to Eradicate Glioblastoma Cells by Radiosensitization. *Mol Cancer Ther.* 2018 Feb;17(2):393-406. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0807. IF – 5.25
4. Farré JC, Carolino K, Stasyk OV, Stasyk OG, Hodzic Z, Agrawal G, Till A, Proietto M, Cregg J, Sibirny AA, Subramani S. A New Yeast Peroxin, Pex36, a Functional Homolog of Mammalian PEX16, Functions in the ER-to-Peroxisome Traffic of Peroxisomal Membrane Proteins. *J Mol Biol.* 2017 Nov 24;429(23):3743-3762. doi: 10.1016/j.jmb.2017.10.009. IF – 4.6
5. Mayevska O, Chen O, Karatsai O, Bobak Y, Barska M, Lyniv L, Pavlyk I, Rzhpetsky Y, Igumentseva N, Redowicz MJ, Stasyk O. Nitric oxide donor augments antineoplastic effects of arginine deprivation in human melanoma cells. *Exp Cell Res.* 2017 Jun 15;355(2):162-171. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.04.003. IF – 3.46
6. Vovk OI, Chen OI, Igumentseva NI, Senchuk OY, Barska ML, Sybirna NO, Stasyk OV. Effects of the combined arginase and canavanine treatment on leukemic cells in vitro and in vivo. *Ukr Biochem J.* 2016 Mar-Apr;88(2):45-55. doi: 10.15407/ubj88.02.045. (SNIP 0.328)
7. Стасик О. Г., Романишин О. Р., Денега І. О., Климишин Н. І., Стасик О. В. Вплив різних концентрацій позаклітинної глюкози на цитотоксичність альфа-синуклеїну людини у модельних штаммах дріжджів *Hansenula polymorpha*. *Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол.* 2016;(73):85-95.
8. Pavlyk I, Rzhpetsky Y, Jagielski AK, Drozak J, Wasik A, Pereverzieva G, Olchowik M, Kunz-Schughart LA, Stasyk O, Redowicz MJ. Arginine deprivation affects glioblastoma cell adhesion, invasiveness and actin cytoskeleton organization by impairment of β -actin arginylation. *Amino Acids.* 2015 Jan;47(1):199-212. doi: 10.1007/s00726-014-1857-1. IF – 3.1
9. Stasyk OV, Boretsky YR, Gonchar MV, Sibirny AA. Recombinant arginine-degrading enzymes in metabolic anticancer therapy and bioanalytics. *Cell Biol Int.* 2015 Mar;39(3):246-52. doi: 10.1002/cbin.10383. IF – 1.78
10. Denega IO, Klymyshyn NI, Sybirna NO, Stasyk OV, Stasyk OG. Modeling of molecular processes underlying Parkinson's disease in cells of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Біологічні студії/Studia Biologica.* 2014;8(12):5–16.

(сумарний імпакт-фактор публікацій – **24.77**)

Монографії, що опубліковані у закордонних виданнях офіційними мовами Європейського Союзу:

1. Karatsai O., Stasyk O. and Redowicz M. J. Effects of Arginine and Its Deprivation on Human Glioblastoma Physiology and Signaling. Chapter 12. In: J. Barańska (ed.), Glioma Signaling, Advances in Experimental Medicine and Biology 1202. Springer International Publishing 2019. https://doi.org/10.1007/978-3-030-30651-9_12

2. Stasyk O. G., Stasyk O. V. Glucose Sensing and Regulation in Yeasts. In book: Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application. Edited by Sybirny AA. Springer International Publishing, 2019. ISBN 978-3-030-21109-7. P. 477-519. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-21110-3_14

3. Stasyk O.V. Methylotrophic yeasts as producers of recombinant proteins. Biotechnology of yeasts and filamentous fungi : monograph / Ed. A. A. Sybirny. Springer International Publishing AG, 2017. P. 325–350. DOI 10.1007/978-3-319-58829-2.

Монографії, що опубліковані мовами, які не належать до мов Європейського Союзу:

1. Стасик О. Г., Климишин Н. І., Матійців Н. П., Дронська Х. А., Бобак Я. П., Стасик О. В. Шляхи деградації аномальних форм альфа-синуклеїну та їхня роль у патогенезі хвороби Паркінсона. Загальна теорія здоров'я і здоров'язбереження: колективна монографія / За загальною редакцією проф. Ю. Д. Бойчука. Харків: ХНПУ ім. Г. С. Сковороди, 2017. С. 172-180.

Патент на корисну модель

Спосіб одержання поверхневого антигена вірусу гепатита В за допомогою рекомбінантних штамів дріжджів *Hansenula polymorpha* з пошкодженою катаболітною репресією. **Патент України на корисну модель #73449 (2012)**. Автори: Красовська О. С., Стасик О. В., Сибірний А. А.

15.4. Структура досліджень.

Особливість структури наших досліджень полягає в тому, що пілотний скринінг впливу надлишку іонів металів і модулюючого ефекту поліамінів на ключові патологічні процеси, притаманні для ХП, здійснюватиметься на модельних штаммах *O. polymorpha* з експресією мутованих форм людського білка альфа-синуклеїну. Проте використання іншої моделі ХП - клітинної лінії нейробластоми людини SH-SY5Y дасть змогу перевірити ефекти цих поліамінів на більш складних та наближених до людського організму модельних біосистемах. Зручність обраних об'єктів полягає в тому, що введення іонів металів і поліамінів можна здійснювати шляхом додавання у поживне середовище. Дослідження впливів кожного окремого чинника будуть проводитись паралельно на обох моделях ХП, із врахуванням результатів, отриманих на кожній із них. Заключний етап проекту буде полягати у пошуку найоптимальнішої комбінації поліамінів та їхніх нетоксичних концентрацій для коригувального впливу на антиоксидантну систему захисту, ефективної індукції автофагійної деградації та пригнічення апоптозу, з метою корекції фізіологічного стану клітин при індукції оксидативного стресу чи експресії мутованого білка альфа-синуклеїну. За допомогою біохімічних та імуноцитохімічних методів буде проаналізовано якісні та кількісні зміни в активності ензиматичної ланки антиоксидантного захисту, коливання пулів продуктів окисної модифікації білків і ліпідів за впливу поліамінів на тлі надлишку іонів металів у модельних біосистемах. Методом Вестерн-блот аналізу та кількісної полімеразної реакції (ПЛР) буде оцінено рівень експресії ключових *ATG* генів і відповідних білкових продуктів (*Atg1, Atg6, Atg7, Atg8, Bcl-2, PARP* та ін.), задіяних в процесах автофагії. Вплив поліамінів на пригнічення апоптозу в клітинах модельних біосистем буде контролюватися на рівні транскрипційної активності генів, продукти яких задіяні в процесах запрограмованої клітинної загибелі, на рівні експресії проапоптичних і антиапоптичних білків та імуноцитохімічними методами.

15.5. Наявність матеріально-технічної бази для виконання роботи.

У роботі будуть використані сучасні та класичні методи клітинної біології та молекулярної генетики, біохімічних, та ультраструктурних досліджень. Виконавець проекту Відділ сигнальних механізмів клітини Інституту біології клітини НАН України є належно забезпечений необхідним для його успішного виконання обладнанням та основними реактивами. Деякі спеціалізовані реагенти, лабораторний посуд та інші розхідні матеріали будуть придбані за кошти проекту.

Зокрема виконавець проекту володіє термостатованими CO₂-інкубаторами та ламінарами для культивування пухлинних клітин і культур мікроорганізмів, низькотемпературними холодильниками для зберігання біологічних зразків та матеріалів, високошвидкісними центрифугами, ПЛР-машиною, апаратами для електрофорезу ДНК і білків, звичайними та флуоресцентним мікроскопами, проточним цитофлуориметром, апаратом для

високоєфективної рідинної хроматографії, спектрофотометрами для аналітичних досліджень та іншими приладами, використання яких передбачається у ході реалізації проекту. Відділ сигнальних механізмів клітини також володіє значною власною колекцією пухлин людини різних типів і колекцією штамів *Ogataea polymorpha*, що будуть використані у ході виконання проекту.

16. Техніко-економічне обґрунтування

н е м а є

17. Власна оцінка науково-технічного рівня розробки, що пропонується, яка очікується за результатами наукової, науково-технічної роботи

- | |
|--|
| <input type="checkbox"/> немає аналогів у світі або краща за існуючі у світі аналоги |
| <input checked="" type="checkbox"/> немає аналогів в Україні |
| <input type="checkbox"/> краща за існуючі в Україні аналоги за всіма основними показниками |
| <input type="checkbox"/> перевищує існуючі в Україні аналогічні розробки за окремими показниками |

18. Використання результатів роботи

18.1. Очікувані наукові та науково-практичні результати, об'єкти права інтелектуальної власності (ОІВ), які плануються до впровадження після завершення роботи

н е м а є

18.2. Шляхи та способи подальшого використання в суспільній практиці результатів виконання роботи

Зі збільшенням тривалості життя людини кількість пацієнтів з нейродегенеративними розладами стрімко зростає. Хоча багато вчених присвячують свою роботу дослідженню патогенезу та розвитку нейродегенеративних порушень мозку, наразі залишається багато нез'ясованих питань щодо етіології цих захворювань. Також залишається багато невирішених питань щодо розробки практичного лікування цих патологій, оскільки нейродегенеративні захворювання (НДЗ) важко діагностувати на ранніх стадіях і, відповідно, вчасно вжити профілактичних заходів. Хоча багато людей з НДЗ зберігають позитивні риси особистості та особистісні якості, в міру погіршення стану вони можуть відчувати істотні проблеми: втрату пам'яті, зниження швидкісних характеристик та продуктивності мислення, погіршення мови, порушення орієнтації, зміни особистості, труднощі в повсякденній діяльності, нехтування власними потребами, некогнітивні прояви та нехарактерну поведінку. У більшості розвинених країн пацієнтами опікуються не лише медичні працівники, а й соціальні служби. При цьому НДЗ зумовлюють комплекс потреб і, особливо на більш пізніх етапах, високий рівень соціальної залежності та супутньої захворюваності. Ці потреби пацієнтів у догляді часто кидають виклик навичкам і здібностям осіб, які здійснюють догляд, та співробітникам служб соціальної допомоги. Станом на 2016 рік у 276 млн населення Землі неврологічні розлади були провідною причиною втрачених та прожитих із втратою працездатності років (ВРЖВП) і однією із провідних причин смертності (9,0 млн). Абсолютна кількість випадків смерті та втрати працездатності від усіх неврологічних порушень помітно зросла (смертність на 39%, ВРЖВП на 15%). В цілому було встановлено, що тягар неврологічних розладів за останні 27 років збільшився і, ймовірно, збільшуватиметься у майбутньому внаслідок

одночасного зростання чисельності та старіння населення, тим самим спричиняючи зростаючий попит на ресурси та послуги для пацієнтів при неврологічних розладах. Існує нагальна світова потреба в удосконаленні профілактики та управління неврологічними порушеннями.

За даними ВООЗ у світі налічується близько 35 мільйонів людей хворих на нейродегенеративні захворювання, серед яких 6 мільйонів – пацієнтів з ХП. Кожного року в Україні від 2 300 до 2 500 осіб вперше захворюють на цю недугу. Ці цифри є наближеними до світових, оскільки захворюваність на ХП у світі за різними даними становить від 100 до 200 хворих на 100 тис населення. Підраховано, що кількість хворих на нейродегенеративні захворювання подвоюватиметься приблизно кожні 15 років, якщо не буде винайдено ефективних ліків. В Україні, згідно з даними офіційної статистики МОЗ України, поширеність ХП за 10 років зростає з 26,8 на 100 тис. населення до 42,7. Сьогодні найефективнішим засобом лікування ХП є препарат леводопа, максимальна дія якого триває від 3 до 5 років. На жаль, згодом ефективність дії цього препарату починає зменшуватися. Адекватне лікування ХП навіть зі зниженням темпу прогресування захворювання лише на 10 % дозволяє заощаджувати в системі охорони здоров'я та соціального забезпечення розвинутих країн до 327 тис. доларів щорічно. В Україні для державних закупівель препаратів "Левомом" і "Левомом ретард" (основних препаратів при лікуванні ХП) витрачається приблизно 500 грн. в місяць на одного пацієнта. Якщо перерахувати на кількість зареєстрованих хворих (23 076) станом на 01.01.2013 рік, то наша держава витрачає більше 100 млн грн. у рік. Перспективним напрямком профілактики й лікування недуги є використання препаратів (наприклад, поліамінів), мішенями яких є апоптоз, оксидативний стрес, мітохондріальна дисфункція та інші процеси, які спричиняють нейрональну загибель.

Ефективних способів зупинити старіння організму та попередити розвиток НДЗ на сьогодні не існує, проте спроби модулювати процес старіння та відтермінування патологічних змін у ЦНС є перспективним підходом для досягнення так-званого «фізіологічного» старіння організму із збереженням продуктивної діяльності особистості. Сьогодні в наукових джерелах зустрічається багато суперечливих даних щодо позитивної та негативної ролі поліамінів, зокрема агматину та спермідину, в розвитку нейродегенеративних патологій. Спермідин може уповільнювати процес старіння та сприяти стресостійкості у багатьох видів, в тому числі дріжджів, комах, черв'яків, мишей і людини, опосередковуючи свою дію через індукцію автофагії чи пригнічення апоптозу або незалежно від цих процесів. Також цьому поліаміну притаманні нейропротекторні властивості, які забезпечують захист нейронів від ушкоджень, викликаних оксидативним стресом, запаленням або ішемією. За допомогою *in vitro* та *in vivo* моделей, у наших дослідженнях ми пропонуємо з'ясувати роль поліамінів (агматину, спермідину, сперміну та путресцину) у процесах автофагійної деградації, апоптозу та антиоксидантного захисту при патологічних змінах, викликаних мутованими формами альфа-синуклеїну на тлі введення іонів феруму, мангану та купруму. Змінюючи пул поліамінів, ми зможемо дослідити ефективність цих сполук у модельних біосистемах і, у разі потреби, апробувати їхню комбінацію для підсилення ефекту в індукції автофагії, антиапоптичних процесах та антиоксидантному захисті. Поєднуючи дію досліджуваних поліамінів, ми вперше зможемо встановити спільні та відмінні елементи, які є мішенями цих сполук і з'ясувати, які саме сигнальні шляхи клітини є задіяними в індукції автофагії та пригніченні апоптозу за такого комбінованого впливу. Отримані нами дані можна буде у подальшому використовувати для досліджень у більш складних біологічних систем, таких як тваринні моделі. А у разі успіху на тваринних моделях запровадити таку комбінацію у доклінічні випробування.

18.3. Потенційні споживачі наукових та науково-технічних результатів, об'єктів права інтелектуальної власності (ОІВ)

Країна	Назва підприємства, організації	Найменування результатів, ОІВ	Можливі обсяги споживання
Україна	Національна академія медичних наук України, Міністерство охорони здоров'я України	Схема корекції за допомогою поліамінів патологічних змін, спільних для хвороби Паркінсона та інших нейродегенеративних захворювань,	від 25 до 30 млн грн
Зарубіжжя	Біомедичні центри, науково-дослідницькі лабораторії в галузі нейробіології	Схема регуляції апоптозу та автофагії за допомогою поліамінів для корекції патологій, зумовлених нейродегенеративними процесами	100 тис євро

19. Об'єкти права інтелектуальної власності (ОІВ), використання яких передбачається під час проведення досліджень (для прикладних досліджень та фундаментальних, де використовуються ОІВ)

н е м а є

20. Фінансові аспекти роботи

20.1. Загальна вартість роботи 1300,000 тис. грн.

словами: один мільйон триста тисяч грн.

20.2. Вартість роботи:

Роки виконання роботи	2020 р.	2021 р.	2022 р.	2023 р.	2024 р.
Вартість виконання робіт (тис. грн.)	200,000	260,000	260,000	260,000	320,000

21. Наукові ради (комітети, комісії) НАН України, ради регіональних наукових центрів НАН і МОН України, яких доцільно залучити до експертної оцінки запиту

Західний науковий центр НАН України та МОН України

22. Кандидатури можливих експертів у галузі, до якої відноситься робота, що пропонується

Прізвище, ім'я, по батькові	Науковий ступінь, посада	Місце роботи
Костерін Сергій Олексійович	академік НАН України, д.б.н., проф., заступник директора з наукової роботи	Ін-т біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України
Риндич Алла Володимирівна	член-кореспондент НАН України, д.б.н., проф., завідувач відділу	Ін-т молекулярної біології і генетики НАН України
Скок Марина Володимирівна	академік НАН України, д.б.н., проф., головний науковий співробітник	Ін-т біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України
Філоненко Валерій Вікторович	академік НАН України, д.б.н., проф., завідувач відділу	Ін-т молекулярної біології і генетики НАН України
Воробець Зіновій Дмитрович	д.б.н., проф., завідувач кафедри	Львівський національний університет ім. Данила Галицького, кафедра медичної біології, паразитології та генетики
Арбузова Світлана Борисівна	д.м.н., проф., директор	КЛПУ «Східно-Український спеціалізований центр медичної генетики та пренатальної діагностики»

23. Додатки, що є невід'ємною частиною запиту:

1. Технічне завдання на виконання роботи (Додаток А).
2. Планова калькуляція кошторисної вартості роботи (Додаток Б).

26 лютого 2020 р.

дата

Директор
Інституту біології клітини НАН України
академік НАН України



(підпис) Андрій СИБІРНИЙ



Науковий керівник роботи

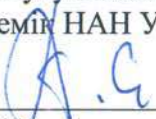
Молодший науковий співробітник
Інституту біології клітини НАН України
к.б.н.



(підпис) Олена БОБК

ПОГОДЖЕНО

Директор
Інституту біології клітини НАН України
академії НАН України


_____ Андрій СИБІРНИЙ
(підпис)

«26» лютого 2020 р.



ЗАТВЕРДЖУЮ

Співкоординатор Програми
академік НАН України

_____ Сергій КОМІСАРЕНКО
(підпис)

« _____ » _____ 20__ р.
М.П.

ТЕХНІЧНЕ ЗАВДАННЯ
на виконання наукової (науково-технічної) роботи

«Роль іонів металів у патогенезі синуклеїнопатій людини: аналіз токсичних ефектів та нові підходи до терапії»
Цільова програма наукових досліджень НАН України «Геномі, молекулярні та клітинні основи розвитку інноваційних біотехнологій» на 2020–2024 рр.

Інститут біології клітини НАН України

1. Рішення про затвердження роботи

2. Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки

Фундаментальні наукові дослідження з найбільш важливих проблем розвитку науково-технічного, соціально-економічного, суспільно-політичного, людського потенціалу для забезпечення конкурентоспроможності України у світі та сталого розвитку суспільства і держави

3. Пріоритетний тематичний напрям наукових досліджень і науково-технічних розробок

Фундаментальні проблеми наук про життя та розвиток біотехнологій

4. Код та назва наукового напрямку або проблеми з Основних наукових напрямів та найважливіших проблем фундаментальних досліджень у галузі природничих, технічних і гуманітарних наук (для фундаментальних досліджень)

2.2.4.1. Вивчення механізмів регуляції функціональних систем організму за умов норми і патології

5. Основний напрям наукової діяльності установи, за яким проводяться роботи

Вивчення молекулярно-генетичних і біохімічних механізмів регуляції метаболізму у дріжджів та створення нових біотехнологічних процесів і продуктів на основі цих мікроорганізмів.

6. Мета роботи

На сьогодні етіологія є ХП практично невідомою. Хоча за останні роки було визначено генетичні фактори, які підвищують ризик розвитку ХП, більшість випадків цієї патології є спорадичними (неспадковими), а екологічні чинники, як вважається, відіграють помітну роль в етіології ХП. Роль впливу навколишнього середовища було з'ясовано завдяки дослідженням паркінсонізму, індукованого впливом МРТР (1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридину). Вплив різних пестицидів (таких як ротенон і паракват) спричиняє симптоми ХП. Епідеміологічні дослідження також виявили помітний зв'язок між ХП і тривалим впливом таких металів, як ртуть, свинець, марганець, мідь, залізо, алюміній, вісмут, титан і цинк після двох-трьох десятиліть їхнього хронічного впливу. Зокрема було встановлено різницю між рівнями металів у мозку (включаючи мідь та залізо) померлих хворих на ХП, порівняно зі здоровими донорами. Дослідження вказують на те, що накопичення заліза й опромінення або порушення метаболізму марганцю та міді можуть бути залучені у розвиток ХП. Основними джерелами ХП-асоційованих впливів є професійне опромінення, забруднення навколишнього середовища та морепродуктів, вживання медикаментів і відновлення металів таких як амальгами, з яких виготовляють зубні протези. Виробничий вплив заліза, алюмінію та марганцю подвоює ризик розвитку ПД. У працівників, які протягом 20 років професійно зазнавали впливу свинцю, марганцю або міді, також було виявлено 2–10-кратне збільшення ризику виникнення ХП.

Цей проєкт спрямований на подальше вивчення можливого взаємозв'язку між металами та ХП і розробку майбутніх стратегій лікування ХП, зокрема шляхом використання терапії, яка ґрунтується на властивостях поліамінів як антиоксидантів при метал-індукованому оксидативному стресі та як індукторів деградації (зокрема, автофагійної) аномальних форм альфа-синуклеїну, утворених за впливу іонів металів.

Зокрема, метою проєкту є дослідження впливу іонів металів на гомеостаз альфа-синуклеїну людини (біосинтез, агрегацію та деградацію) в модельних біосистемах та розробка нових підходів до корекції патологічних змін, індукованих іонами металів та аномальними формами альфа-синуклеїну, з використанням біологічно-активних речовин. Відповідно до мети сформульовано такі завдання: 1) Сконструювати та охарактеризувати модельні рекомбінантні штами дріжджів *Ogataea polymorpha* та генно-модифіковані субліній клітин нейробластоми людини SH-SY5Y, що експресують мутовані (схильні до агрегації) форми альфа-синуклеїну людини; 2) Проаналізувати вплив іонів металів на прооксидантно-антиоксидантну рівновагу в модельних штамів *O. polymorpha* та у клітин субліній

нейробластоми людини SH-SY5Y; 3) Дослідити роль поліамінів та інших біологічно-активних сполук в антиоксидантному захисті та регуляції гомеостазу (біосинтез і деградація) альфа-синуклеїну в модельних штамів *O. polymorpha* та клітинах нейробластоми людини SH-SY5Y, що експресують мутовані форми альфа-синуклеїну людини.

7. Термін проведення роботи:

початок — 01 квітня 2020 р. ; закінчення — 31 грудня 2024 р.

Орієнтовний обсяг коштів на виконання роботи в цілому **1300,000** тис. грн.

та по роках

2020 р. — 200,000 тис. грн.

2021 р. — 260,000 тис. грн.

2022 р. — 260,000 тис. грн.

2023 р. — 260,000 тис. грн.

2024 р. — 320,000 тис. грн.

8. Календарний план роботи

№ з/п	Найменування основного етапу роботи	Термін виконання	Відповідальний виконавець
1	Конструювання та фізіологічний аналіз модельних рекомбінантних штамів дріжджів <i>Ogataea polymorpha</i> , що експресують мутовані (схильні до агрегації) форми альфа-синуклеїну людини	01 квітня 2020 р. - 31 грудня 2020 р.	д.б.н., с.д., О.В. Стасик; к.б.н., Я.П. Бобак; к.б.н., О.І. Вовк.
2	Дослідження кумулятивного ефекту іонів металів і мутованого альфа-синуклеїну на проліферативну активність, сенесценцію, апоптоз у модельних штамів <i>O. polymorpha</i> та у клітин нейробластоми людини SH-SY5Y, як моделі хвороби Паркінсона	01 січня 2021 р. - 31 грудня 2021 р.	д.б.н., с.д., О.В. Стасик; к.б.н., Я.П. Бобак; к.б.н., О.І. Вовк; к.б.н., Г.Ю. Шуваєва; С.В. Чернишук.
3	Конструювання та фізіологічний аналіз генно-модифікованих клітин нейробластоми людини SH-SY5Y, що експресують мутовані форми альфа-синуклеїну людини	01 січня 2022 р. - 31 грудня 2022 р.	д.б.н., с.д., О.В. Стасик; к.б.н., Я.П. Бобак; к.б.н., О.І. Вовк; к.б.н., Г.Ю. Шуваєва; С.В. Чернишук.

4	Вивчення впливу іонів металів на прооксидантно-антиоксидантну рівновагу в модельних штамів <i>O. polyomrpha</i> та у клітин субліній нейробластоми людини SH-SY5Y	01 січня 2023 р. - 31 грудня 2023 р.	д.б.н., с.д., О.В. Стасик; к.б.н., Я.П. Бобак; к.б.н., О.І. Вовк; к.б.н., Г.Ю. Шуваєва; С.В. Чернишук.
5	Дослідження ролі поліамінів та інших біологічно-активних сполук в антиоксидантному захисті та регуляції гомеостазу альфа-синуклеїну в модельних штамів <i>O. polyomrpha</i> та клітинах нейробластоми людини SH-SY5Y, що експресують мутовані форми альфа-синуклеїну людини	01 січня 2024 р. - 31 грудня 2024 р.	д.б.н., с.д., О.В. Стасик; к.б.н., Я.П. Бобак; к.б.н., О.І. Вовк; к.б.н., Г.Ю. Шуваєва; С.В. Чернишук.

9. Зміст, основні вимоги до виконання роботи, рівня і способів її виконання

Етап 1. Конструювання та фізіологічний аналіз модельних рекомбінантних штамів дріжджів *Ogataea polymorpha*, що експресують мутовані (схильні до агрегації) форми альфа-синуклеїну людини

Що відомо: У результаті роботи, проведеної в рамках проекту «Моделювання в клітинах дріжджів молекулярних процесів, характерних для хвороби Паркінсона, та аналіз впливу екзо- та ендогенних чинників на процеси агрегації та деградації альфа-синуклеїну людини», який виконувався за цільовою комплексною міждисциплінарною програмою наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства» у 2015-2019 рр., вперше було сконструювано штам метилотрофних дріжджів *Ogataea polymorpha*, в яких продукується альфа-синуклеїн людини (основний маркер ХП), мічений зеленим флуоресцентним білком (EGFP). Наявність гетерологічного білка у клітинах була підтверджена методом флуоресцентної мікроскопії та Вестерн-блот аналізу. Виявлено, що отримані штамми спонтанно не формували амілоїдів альфа-синуклеїну, а сам білок помітно не впливав на ріст культури за фізіологічних умов культивування (1 % глюкози в ростовому середовищі) (Стасик *та ін.*, 2016), проте незначно впливав у разі дефіциту глюкози в культуральному середовищі. Також було встановлено, що цитозольний неагрований альфа-синуклеїн утворював тимчасові агрегати у разі додавання в ростове середовище інгібітора вакуолярних протеаз PMSF, що вказувало на те, що процеси автофагійної деградації необхідні для підтримання нетоксичних рівнів альфа-синуклеїну та виживання клітин модельного штаму за умов конститутивної експресії рекомбінантного людського білка.

Що ми пропонуємо: Дослідження сімей з історією хвороби Паркінсона дали змогу виявити низку мутацій, які призводять до раннього (A30P, E46K, A53T, G51D) або пізнього початку (H50Q) цього захворювання. Вплив таких змін у послідовності на кінетику загальної агрегації альфа-синуклеїну був предметом досліджень із моменту виявлення цього білка як основного компонента тілець Леві. Вважається, що амінокислотна заміна A53T прискорює агрегацію альфа-синуклеїну порівняно з протеїном WT (немутована форма), тоді як про білок із заміною A30P сьогодні зібрано суперечливі дані, зокрема про те, що його агрегація відбувається повільніше, швидше або з тією ж швидкістю, що і білка WT. Для форм E46K та H50Q альфа-синуклеїну встановлено, що процес їхньої агрегації прискорюється, порівняно з WT альфа-синуклеїном, але форма G51D агрегує повільніше, ніж білок WT (Flagmeier *et al.*, 2014).

Дріжджова модель ХП, яка використовувалася при виконанні завдань проекту «Моделювання в клітинах дріжджів молекулярних процесів, характерних для хвороби Паркінсона, та аналіз впливу екзо- та ендогенних чинників на процеси агрегації та деградації альфа-синуклеїну людини» за цільовою комплексною міждисциплінарною програмою наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства» у 2015-2019 рр., є унікальною, оскільки в ній максимально відтворюються ключові молекулярні процеси, притаманні людській клітині. На відміну від модельних штамів класичного об'єкта досліджень *Saccharomyces cerevisiae*, штамми дріжджів *O. polymorpha* ростуть при 37°C і вище та продовжують дихальний метаболізм навіть за високих концентрацій глюкози у ростовому середовищі, не змінюючи його на бродіння. На базі штамів *O. polymorpha* отримано продуценти цілої низки секреторних і внутрішньоклітинних гетерологічних білків з регульованим і конститутивним синтезом. Для цього виду дріжджів притаманна домінантна макроавтофагія, процес характерний також для вищих еукаріотів; відома послідовність геному та ідентифіковано гени та білки, залучені в автофагійну деградацію клітинного матеріалу. Раніше нами було встановлено, що надекспресія WT альфа-синуклеїну людини в модельних штаммах дріжджів *O. polymorpha* не призводила до його агрегації, тому на Етапі 1 запропонованого проекту буде сконструйовано рекомбінантні штамми з мутованими формами цього білка, кон'югованого зі зеленим флуоресцентним білком EGFP, з метою отримання стійких альфа-синуклеїнових агрегатів у клітинах дріжджів. Буде проаналізовано вплив різних мутантних форм альфа-синуклеїну на фізіологію рекомбінантних штамів *O. polymorpha* (життєздатність клітин дріжджів, проліферативну активність, процеси старіння та загибелі). За допомогою флуоресцентної мікроскопії буде проаналізовано умови, за яких відбуватиметься агрегація альфа-синуклеїну людини у клітинах дріжджів, а також швидкість і особливості цього процесу. За допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі за неденатуруючих умов буде здійснено скринінг різних форм агрегованого альфа-синуклеїну (олімерної, протофібрильної та фібрильної). Методом

Вестерн-блот аналізу буде досліджено вміст мутованих форм рекомбінантного людського альфа-синуклеїну в клітинах модельного штаму в ранній і середній логарифмічній стадії росту, в якій переважають молоді клітини з активним метаболізмом та іншими клітинними процесами, і в стаціонарній фазі росту культури, в якій домінують старіючі клітини зі сповільненим метаболізмом, пригніченими процесами біосинтезу білка та його деградації.

Етап 2. Дослідження кумулятивного ефекту іонів металів і мутованого альфа-синуклеїну на проліферативну активність, сенесценцію, апоптоз у модельних штамів *O. polymorpha* та у клітин нейробластоми людини SH-SY5Y, як моделі хвороби Паркінсона

Що відомо: Важливу роль у набутті альфа-синуклеїном β -структурної конформації відіграють такі фактори, як точкові мутації в гені *SNCA*, який кодує цей білок, і фактори довкілля, наприклад, низьке рН, висока температура, катіони металів, пестициди, гепарин та інші глікозаміноглікани (Emadi S. *et al.*, 2007). Тривала експозиція до підвищених рівнів іонів Mn, наприклад, при роботі з електрозварювальним апаратом чи під час праці у шахті, призводить до розвитку патології, яка отримала назву манганізм і має багато спільних ознак із ХП, таких як когнітивні порушення, психічні та рухові розлади. Проте, Mn також може бути залучений у етіологію ХП, на що вказують епідеміологічні дослідження пацієнтів з ХП, які мали тривалий контакт із цим металом. Ймовірно, мангановмісні сполуки спричиняють зростання внутрішньоклітинного рівня альфа-синуклеїну (Verina T. *et al.*, 2012), що зумовлює утворення агрегатів цього білка. Інший можливий механізм впливу іонів Mn^{2+} – це існування сайтів зв'язування іонів металів у структурі білка альфа-синуклеїну. Відомо, що альфа-синуклеїн може діяти також як клітинна феррeredуктаза, використовуючи Cu і NADH як кофактори для відновлення Fe (III) до Fe (II) (P. Davies, 2011), що вказує на наявність у цього білка сайтів зв'язування з іонами металів. За допомогою біофізичних досліджень було з'ясовано, що у надлишку іони Al (III), Cu (II), Cd (II) і Fe (III) можуть спричинити утворення фібрил альфа-синуклеїну (V. Uversky, 2001), основних компонентів тілець Леві. Здатність альфа-синуклеїну зв'язувати іони двовалентних металів (у тому числі Fe) залежить від пост-трансляційних модифікацій цього протеїну. Фосфорилування Ser-129, яке є переважаючою модифікацією у разі ХП, підвищує афінність альфа-синуклеїну до Cu (II), Pb (II) і Fe (II), але не Fe (III). Отже, іони токсичних металів можуть відігравати не останню роль у агрегації альфа-синуклеїну та підсиленні токсичності цього білка для клітини. З огляду на це надзвичайно важливим є з'ясування механізмів агрегації та деградації альфа-синуклеїну на тлі тривалої експозиції до підвищених рівнів іонів металів. Проте, молекулярні механізми цих явищ наразі ще не достатньо вивчені та потребують більш комплексного підходу до їхнього дослідження.

Що ми пропонуємо: Використовуючи рекомбінантні штами *O. polymorpha*, в яких експресуються мутантні форми альфа-синуклеїну, буде з'ясовано роль іонів металів в агрегації досліджуваного білка, процесах старіння та відмирання клітин модельних штамів. Агрегація альфа-синуклеїну буде моніторитися за допомогою флуоресцентної мікроскопії; утворення олігомерів, протофібрил і фібрил – за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі за неденатуруючих умов; старіння культури – за допомогою мікроскопії та фракціонування клітин у градієнті густини Percoll; відмирання клітин – за допомогою фарбування живих клітин барвником FUN-1 і мертвих клітин барвником метиленовим синім, а також за допомогою визначення фосфатидилсерину у зовнішньому шарі ліпідного бішару плазматичної мембрани та ін.

Клітинна лінія нейробластоми людини SH-SY5Y (з базальним рівнем експресії альфа-синуклеїну) буде використана для моделювання молекулярних процесів, притаманних хворобі Паркінсона. Ця лінія є похідною від клітинної лінії SK-N-SH, яка в 1970 році була отримана в культурі з біопсії кісткового мозку метастатичної нейробластоми 4-річної дівчинки і пройшла три етапи клонального відбору. Початкова характеристика клітинної лінії SH-SY5Y виявила помірну активність дофамін- β -гідроксилази та незначні рівні холінацетилтрансферази, ацетилхолінестерази та бутирилхолінестерази, тирозингідроксилазної активності та невисокий рівень вивільнення базального норадреналіна. Тирозин гідроксилаза є ферментом, що лімітує швидкість синтезу катехоламіну та перетворює тирозин в L-ДОФА, попередник дофаміну, який перетворюється в норадреналін дофамін- β -гідроксилазою. Отже, клітинна лінія SH-SY5Y може мати катехоламінергійний фенотип, оскільки вона здатна синтезувати як дофамін, так і норадреналін. Хоча ці властивості не класифікують клітини SH-SY5Y як виключно дофамінергійні, проте ця клітинна лінія широко застосовується як модель ХП. Клітинна лінія SH-SY5Y характеризується низкою генетичних аберацій завдяки своєму злякисному походженню, але більшість генів і шляхів, порушених у патогенезі ХП, в ній є інтактними. Крім дофамінергійного фенотипу, здатність клітинної лінії відтворювати клітинні аномалії ХП має вирішальне значення для обґрунтованості моделі. Однією з головних ознак ХП є агрегація альфа-синуклеїну. Для імітації цієї патологічної особливості успішно застосовується надекспресія WT альфа-синуклеїну або стабільна експресія однієї з його мутацій, таких як A53T

або А30Р. Тим не менш, ці маніпуляції не завжди неминуче призводять до посилення формування включень. Тому для спостереження за агрегацією альфа-синуклеїну іноді потрібні такі тригери, як диференціація клітин з одночасною обробкою FeCl₂ (та Н₂О₂) або блокуванням Hsp70. Проте спонтанна агрегація альфа-синуклеїну може відбуватися й у нетрансфікованих клітинах SH-SY5Y. Інші патологічні процеси, пов'язані з ХП, такі як аномальна функція мітохондрій, оксидативний стрес та автофагія або протеасомна дисфункція, також були відтворені в клітинах SH-SY5Y. Тому на Етапі II цього проекту буде вивчено вплив надлишку іонів металів на фізіологію клітин нейроblastоми людини SH-SY5Y. Зокрема, буде проаналізовано життєздатність клітин, процеси старіння, сенесценції та апоптичної загибелі (морфологічні та біохімічні зміни при апоптозі) за надлишку іонів металів у культуральному середовищі. За допомогою електрофорезу за неденатуруючих умов і Вестерн-блот аналізу буде встановлено, чи здатні клітини нейроblastоми людини SH-SY5Y формувати агрегати альфа-синуклеїну за впливу надлишку іонів металів (феруму, мангану та купруму).

Етап 3. Конструювання та фізіологічний аналіз генно-модифікованих клітин нейроblastоми людини SH-SY5Y, що експресують мутовані форми альфа-синуклеїну людини.

Що відомо: Поряд із стратегіями хімічно індукованої ХП також широко використовуються генетичні підходи (наприклад, делеція або надекспресія генів із мутаціями, виявленими у спадкових формах ХП) для індукування ХП-подібного фенотипу. Всього відомо 19 локусів, асоційованих із спадковими формами ХП. На сьогодні найпоширенішим методом імітації ХП у клітинах SH-SY5Y є надекспресія незначної частини таких мутованих форм альфа-синуклеїну (А30Р, А53Т, Е46К, G51D, Н50Q, S129А, S129D, S129Е) або позаклітинного внесення аномального альфа-синуклеїну до культури клітин. Також були здійснені спроби делетувати, надекспресувати або експресувати мутовані форми інших генів, таких як LRRK2 (G2019S, I2020T, R1441C, Y1699C), PINK1 (G309D, P209A, P399L, T313M), DJ-1 (A39S, C53A, C106A, L106A), ATP13A2, PLA2G6, GBA і Parkin (C289G, C431F, G328E, G430D, K161N, R42P, T240N, T240R, R265C, W453stop) для вивчення молекулярних процесів, які реалізуються у разі патологічних змін при ХП. Пригнічення експресії генів здебільшого проводили шляхом трансфекції siRNA або shRNA, тоді як стабільну експресію мутованих генів досягали шляхом їхнього введення у такі вектори, як pcDNA3.1, які трансфікували за допомогою реактивів Lipofectamine® 2000 (ThermoFisher Scientific) або FuGENE® (Promega), аденовірусної інфекції або лентивірусної трансдукції. У сукупності дослідження, що імітують генетичні мутації, наявні в геномі хворих на ХП, дали змогу ідентифікувати різноманітний набір шляхів та молекулярних процесів, які беруть участь у прояві захворювання, включаючи дисфункцію мітохондрій та пошкодження мітофагії, порушення протеасомної деградації та регуляції автофагії, що призводить до агрегації білка.

Що ми пропонуємо: Використовуючи сконструйовані нами трансгенні сублінії нейроblastоми людини SH-SY5Y, буде проаналізовано вплив різних мутантних форм альфа-синуклеїну на фізіологію клітин (життєздатність клітин нейроblastоми, проліферативну активність, процеси старіння та загибелі). За допомогою флуоресцентної мікроскопії буде проаналізовано умови, за яких відбуватиметься агрегація альфа-синуклеїну людини у клітинах субліній нейроblastоми людини SH-SY5Y, а також швидкість і особливості цього процесу. За допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі за неденатуруючих умов буде здійснено скринінг різних форм агрегованого альфа-синуклеїну (олімерної, протофібрильної та фібрильної). Методом Вестерн-блот аналізу буде досліджено вміст мутованих форм рекомбінантного людського альфа-синуклеїну в клітинах нейроblastоми. Також буде встановлено у якій формі (олігомерній, протофібрильній чи нерозчинній фібрильній) альфа-синуклеїн матиме найбільш токсичний вплив на клітини модельних ліній.

Етап 4. Вивчення впливу іонів металів на прооксидантно-антиоксидантну рівновагу в модельних штамів *O. polymorpha* та у клітин субліній нейроblastоми людини SH-SY5Y

Що відомо: Оксидативний стрес вважається однією з головних причин патогенезу ХП. У пацієнтів з ХП спостерігається надпродукція АФО, яка призводить до розвитку оксидативного стресу та порушення функціональності мітохондрій. Цей процес у дофамінергійних зонах мозку супроводжується підвищенням рівня феруму, окисненням нуклеїнових кислот, підвищенням рівня окиснення білків і ліпідів та зниженням вмісту внутрішньоклітинного антиоксиданта глутатіону (GSH). Деякими дослідженнями було встановлено, що ферум викликає оксидативний стрес у дофамінергійній нігдростріальній системі, що виявляє важливий ефект у патогенезі ХП. Підвищення рівня іонів цього металу може виникати при

пошкодженні його транспорту до мітохондрій. Високий внутрішньоклітинний пул феруму у дофамінергійних нейронах при ХП може полегшити взаємодію іонів цього металу з H_2O_2 та підвищити продукцію високотоксичних гідроксильних радикалів.

Відомо, що нейрони з триплікацією гена альфа-синуклеїну мають більш високий базальний рівень оксидативного стресу. При додані мономерних, олігомерних або фібрильних форм екзогенного альфа-синуклеїну до культури нейрональних клітин, олігомери альфа-синуклеїну викликали значний оксидативний стрес, на противагу мономерам і фібрилам. Нейрони, оброблені лише олігомерним альфа-синуклеїном, характеризувалися зниженням рівня GSH та збільшення перекисного окислення ліпідів. Здатність олігомерів до індукування продукції АФО значно знижувалася за наявності хелаторів металів, таких як дефероксамін, що свідчить про те, що олігомери альфа-синуклеїну утворюють супероксидні радикали шляхом зв'язування з іонами металів із змінною валентністю, такими як купрум і ферум. Інкубація *in vitro* альфа-синуклеїну з ферумом призводила до утворення H_2O_2 та гідроксильних радикалів, що підтверджувало селективну чутливість нейронів *substantia nigra* до надлишку феруму, який провокував оксидативний стрес.

Редокс-активні іони мангану відіграють ключову роль у адаптації клітин до оксидативного стресу. Як кофактор супероксиддисмутази або як компонент непротеїнових антиоксидантів, манган може боротися з окислювальним пошкодженням клітинних компонентів без шкідливих побічних ефектів, зумовлених реакціями Фентона. Проте антиоксидантні властивості мангану можуть обмежуватися впливом феруму. Внутрішньоклітинний пул феруму може перевищувати пул мангану, що у свою чергу перешкоджає зв'язуванню марганцю зі супероксиддисмутазою, а завдяки реакціям Фентона ферум може протидіяти небілковим мангановмісним антиоксидантам. Mn-SOD легко зв'язує ферум з подібною до мангану спорідненістю та геометрією, проте ферум інактивує фермент. Зв'язування феруму може блокувати субстрат-зв'язувальну ділянку та порушувати окисно-відновний потенціал каталітичної ділянки ферменту. Це у свою чергу призводить до накопичення в клітинах супероксид-радикалів і розвитку оксидативного стресу. Проте дані щодо антиоксидантних властивостей мангану є суперечливими, оскільки було виявлено, що через 24 години інкубації первинних культур нейронів з надлишком мангану в культуральному середовищі відбувалася олігомеризація альфа-синуклеїну, підвищення пулу АФО та окисне пошкодження макромолекул. Тоді як преінкубація з відновленим глутатионом (GSH) частково пригнічувала олігомеризацію альфа-синуклеїну та пошкодження нейронів, а додавання H_2O_2 у культуральне середовище, навпаки, прискорювало цей процес. Було продемонстровано, що вплив мангану на тканини мозку щурів активував експресію білків, задіяних у відповіді на незгорнуті білки, та загибель апоптотичних клітин. У тваринних моделях, де експресія альфа-синуклеїну була пригнічена siRNA, манган-індукований апоптоз був менш вираженим.

Що ми пропонуємо: Використовуючи модельні штами *O. polymorpha* та клітини субліній нейробластоми людини SH-SY5Y (в яких експресуються мутовані форми альфа-синуклеїну) буде досліджено вплив іонів металів, таких як ферум, купрум і манган, на рівень АФО, вміст окисненого глутатиону та окисну модифікацію білків і ліпідів, проаналізувати зміни в показниках ензиматичної (активність каталази, супероксиддисмутази та ферментів глутатионової системи - глутатіонпероксидази, глутатіоредуктази та глутатіонтрансферази) та неензиматичної (рівень відновленого глутатиону) ланок антиоксидантного захисту модельних об'єктів. Оскільки дослідження впливу іонів металів на індукцію оксидативного стресу проводилися в основному на моделях з надекспресією WT (немутованого) альфа-синуклеїну, важливо буде дослідити такий вплив у системах, які експресують мутовані форми альфа-синуклеїну, щоб з'ясувати чи впливатимуть мутації в гені *SNCA* на ферриредуктазну активність кодованого ним білка і чи зміщуватиметься при цьому прооксидантно-антиоксидантна рівновага в сторону прооксидантів. Адже швидкому прогресуванню генетично детермінованої форми ХП може сприяти хронічна експозиція до іонів важких металів. Крім цього планується з'ясувати чи іони мангану можуть активувати антиоксидантний захист, чи все ж таки цей метал сприяє розвитку оксидативного стресу.

Етап 5. Дослідження ролі поліамінів та інших біологічно-активних сполук в антиоксидантному захисті та регуляції гомеостазу альфа-синуклеїну в модельних штамів *O. polymorpha* та клітинах нейробластоми людини SH-SY5Y, що експресують мутовані форми альфа-синуклеїну людини

Що відомо: Оксидативний стрес є наслідком незбалансованого окислювально-відновного стану, зумовленого або надмірним генерування АФО, або дисфункцією антиоксидантної системи. Мозок є одним із органів, особливо чутливих до впливу АФО у зв'язку з високими потребами у кисні та наявності великої кількості сприйнятливих до перекисного окислення клітинних ліпідів. Попередні дослідження виявили, що оксидативний стрес

відіграє центральну роль у загальній патофізіології таких нейродегенеративних захворювань, як ХП. Для профілактики та лікування нейродегенеративних захворювань була запропонована антиоксидантна терапія, хоча результати щодо її ефективності у лікування НДЗ сьогодні є дещо суперечливими. Відомо, що агматин, захищає мітохондрії нейронів головного мозку від втрати енергоємності, запобігає колоїдно-осмотичному набуханню цих органел, падінню електричного потенціалу, оксидативному стресу та біоенергетичному колапсу. У свою чергу для спермідину було з'ясовано, що цьому поліаміну притаманні протизапальні та антиоксидантні властивості, він підсилює метаболічну функцію мітохондрій та дихання, сприяє активності шаперонів та покращує протеостаз. Багато властивостей спермідину як сповільнюючого старіння поліаміну причинно пов'язані із його здатністю забезпечувати протеостаз шляхом стимуляції цитопротекторної макроавтофагії. У більшості випадків патології, асоційовані з віковими змінами, включаючи онкозахворювання, нейродегенерацію та серцево-судинні захворювання, безпосередньо пов'язані з внутрішньоклітинним накопиченням токсичних «шлаків», а його видалення шляхом автофагії є добре задокументованим способом захисту від вікових хвороб. Спермидин індукує аутофагію шляхом пригнічення декількох ацетилтрансфераз, включаючи EP300, одного з основних негативних регуляторів автофагії. Нещодавно його ефективність була визначена як така, що еквівалентна активності рапаміцину. А сам спермидин було визнано як імунодепресант із захисними та автофагійно-стимулюючими властивостями. Важливо, що генетичне порушення автофагії нівелює сприятливий вплив спермідину на тривалість життя дріжджів, мух і червів. Більше того, у мишей у разі гальмування автофагії в кардіоміоцитах або зляккісно трансформованих клітинах втрачалися кардіопротекторні та імуноконтролюючі протиракові властивості спермідину. Сьогодні в літературних джерелах немає жодної згадки про можливу роль агматину в індукції автофагії, тому виникає логічне запитання, чи цей поліамін у перспективі можна використовувати не лише як скавенджер АФО, але й як стимулюючий автофагію агент, подібно до спермідину.

Автофагія та апоптоз - добре охарактеризовані процеси, що сприяють підтримці клітинного та тканинного гомеостазу. Перетин між автофагією та апоптозом було виявлено за різних фізіологічних і патологічних станів. З огляду на це, декілька ключових молекул були визначені як точки зближення цих двох процесів. Beclin 1 ссавців, ортолог Atg6 дріжджів, є необхідним для ініціації автофагії. Проте нещодавно було з'ясовано, що Beclin 1 є також субстратом каспаз і розщеплюється цими ферментами. Після розщеплення Beclin 1 втрачає свою здатність до індукції автофагії, а утворений С-кінцевий фрагмент призводить до вивільнення цитохрому *c* з мітохондрій і запуску апоптозу. Важливо зазначити, що спермидин перешкоджає каспазо 3-залежному розщепленню Beclin 1 та сприяв виживанню нейрональних клітин *in vitro* та *in vivo*. Таким чином, розглядаючи потенційну роль Beclin 1 у модуляції перемикачів між апоптозом та автофагією, можна припустити, що спермидин чинить нейропротекторну дію, регулюючи вузол комутації автофагії та апоптозу через Beclin 1. Також відомо, що Beclin 1, внаслідок взаємодії з антиапоптотичними білками родини Bcl-2, не здатний ініціювати збирання преавтофагосомної структури, тим самим інгібуючи автофагію. У свою чергу члени родини білків Bcl-2, взаємодіючи один з одним, визначають про-, або антиапоптотичний сценарій розвитку подій шляхом регуляції проникності мембрани мітохондрій. Пермеабілізація мітохондріальної мембрани у поєднанні із втратою трансмембранного потенціалу в кінцевому рахунку призводить до вивільнення проапоптотичних факторів та запуску загибелі клітин. Агматин розглядається як один із чинників, який може запобігти цим процесам, оскільки діє не лише як скавенджер АФО, але й захищає мітохондрії від набряку, спричиненого Ca^{2+} , та втрати трансмембранного потенціалу. Крім того, в препаратах мітохондрій нирок було досліджено здатність агматину пригнічувати окислення сульфгідрильних груп і зменшувати вміст гідрогену пероксиду. Ці антиоксидантні властивості забезпечували захист мітохондрій від пошкодження та стійкість до клітинного апоптозу.

Що ми пропонуємо: Планується дослідити вплив поліамінів (агматину, путресцину, сперміну та спермідину) за надлишку іонів металів феруму, купруму та мангану на рівень АФО, вміст оксидованого глутатіону та окисну модифікацію білків і ліпідів, проаналізувати зміни в активностях каталази, супероксиддисмутази і ферментів глутатіонової системи та рівня відновленого глутатіону в модельних штамів *O. polymorpha* та клітини субліній нейробластоми людини SH-SY5Y (в яких експресуються мутовані форми альфа-синуклеїну). Такі дослідження дадуть змогу встановити які саме поліаміни можна використовувати як скавенджери АФО і як потенційні терапевтичні препарати для корекції патологічних змін, зумовлених кумулятивним ефектом надлишку іонів металів та експресією мутованих форм альфа-синуклеїну.

За допомогою цитопроточної флуориметрії буде встановлена частка апоптотичних і некротичних клітин нейробластоми людини SH-SY5Y, що експресують мутовані форми альфа-синуклеїну людини, за впливу надлишку іонів металів і при додатковій обробці культури клітин поліамінами.

Методом Вестерн-блот аналізу буде досліджено зміни профілів проапоптичних (p53, Bax, PARP, caspases 3, 8, 9) і антиапоптичних (Beclin 1, Bcl2, Bcl-XL) білків за впливу поліамінів на тлі надлишку іонів металів та експресії мутованих форм альфа-синуклеїну. У клітинах модельних штамів дріжджів буде досліджено морфологічні ознаки апоптозу (експозиція фосфатидилсерину на зовнішній поверні плазматичної мембрани, "комет"-аналіз геномної ДНК і ін.).

Завершальною стадією досліджень буде вивчення впливу поліамінів на індукцію автофагійної деградації мутованих форм альфа-синуклеїну в модельних об'єктах. Зокрема, планується за допомогою Вестерн-блот аналізу визначати рівень альфа-синуклеїну в клітинах модельних штамів *O. polymorpha* та клітинах субліній нейробластоми людини SH-SY5Y за різних умов культивування (при експозиції до надлишку іонів металів чи введенні поліамінів у культуральне середовище). За допомогою кількісної ПЛР буде проаналізовано зміни в профілях експресії ключових *ATG* генів. Це дасть змогу отримати відповідь на питання на якому рівні в клітинах відбувається регуляція автофагії за впливу поліамінів - на рівні транскрипції *ATG* генів чи на рівні пост-трансляційних модифікацій Atg білків.

10. Наукові (науково-технічні) результати, що очікуються за основними етапами та роботою в цілому

У результаті проведеної роботи буде:

1) Сконструйовано рекомбінантні модельні штами *O. polymorpha* з експресією мутованих форм альфа-синуклеїну людини для швидкого первинного скринінгу впливу різних іонів металів (феруму, купруму, мангану та ін.) і поліамінів (агматину, спермідину, сперміну та путресцину) на властивості альфа-синуклеїну та гомеостаз цього білка у клітинах дріжджів;

2) Отримано генно-модифіковані лінії клітин нейробластоми людини SH-SY5Y, в яких експресуються мутовані форми альфа-синуклеїну, для вивчення ролі іонів металів і поліамінів у патогенезі хвороби Паркінсона, асоційованої з порушеннями функції білка альфа-синуклеїну;

3) Вивчено вплив іонів металів і поліамінів на прооксидантно-антиоксидантну рівновагу (вміст активних форм кисню (АФО), продуктів окисної модифікації білків і ліпідів, стан ензиматичної та неензиматичної ланок антиоксидантного захисту) у клітинах модельних штамів дріжджів *O. polymorpha* та генно-модифікованих ліній нейробластоми людини SH-SY5Y, в яких експресуються мутовані форми альфа-синуклеїну;

4) Досліджено процеси автофагійної деградації альфа-синуклеїну (Вестерн-блот детекція кількості альфа-синуклеїну в клітинах модельних об'єктів, аналіз рівня експресії ключових генів, асоційованих із автофагією);

5) Проведено порівняння між даними отриманими на модельних штаммах дріжджів *O. polymorpha* та генно-модифікованих лініях нейробластоми людини SH-SY5Y, в яких експресуються мутовані форми альфа-синуклеїну;

б) Розроблено схему корекції патологічних змін, зумовлених впливом іонів металів і мутованих форм альфа-синуклеїну людини на клітини модельних об'єктів, із застосуванням поліамінів для відновлення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги та індукції деградації аномального білка.

Запропонований проект належить до фундаментальних науково-дослідних робіт, але також передбачає розробку нових підходів до корекції патологічних змін, характерних для ХП. Головним підтвердженням вірності обраної стратегії досліджень буде зниження вмісту АФО в клітинах рекомбінантних штамів дріжджів *O. polymorpha* з надекспресією альфа-синуклеїну та клітинній лінії та сублінії нейробластоми SH-SY5Y людини за умов металоопосередкованої індукції оксидативного стресу, на тлі введення поліамінів по-окремо чи у комбінації (детекція АФО *in vivo* за допомогою флуоресцентного барвника 2',7'-Дихлор-дигідро-флуоресцеїн діацетату); зниження вмісту окисно модифікованих білків і ліпідів у всіх обраних для досліджень моделях (визначення вмісту карбонільних груп білків і ТБК-позитивних продуктів); зменшення активності ферментів антиоксидантного захисту, як показник зниження рівня оксидативного стресу та вмісту АФО. Ефективність автофагії за введення поліамінів буде підтверджена зниженням вмісту альфа-синуклеїну в клітинах моделей ХП та підвищенням рівня експресії Atg білків (Вестерн-блот детекція), а також за типом пост-трансляційних модифікацій у використаних у роботі моделях ХП, активацією експресії ATG генів (зворотно-транскрипційна полімеразна реакція) та імуноцитохімічними дослідженнями. Як негативні контролю будуть використані специфічні інгібітори автофагійної та протеасомної деградації білків (MG132, бортезоміб, ЗМА, хлорохінон та інш.). Пригнічення процесів апоптозу буде оцінюватися за зростанням рівня антиапоптичних білків і зменшенням рівня проапоптичних (Вестерн-блот детекція) та імуноцитохімічним аналізом. У підсумку, перелічені показники мали б позитивно корелювати також із продовженням тривалості життя модельних об'єктів.

11. Перелік науково-технічної та іншої документації, що надається по завершенню роботи

Остаточний звіт про виконану науково-дослідну роботу
Акт здачі-прийняття виконаних робіт
Облікова картка НДДКР

Науковий керівник роботи

Молодший науковий співробітник
Інституту біології клітини НАН України
к.б.н.



Олена БОБК

(підпис)

Планова калькуляція кошторисної вартості наукової (науково-технічної) роботи

«Роль іонів металів у патогенезі синуклеїнопатій людини: аналіз токсичних ефектів та нові підходи до терапії»
на 2020 рік

Термін виконання роботи: початок — 01.04.2020 р., закінчення — 31.12.2024 р.

№ з/п	Найменування статей витрат	КЕКВ	Сума, тис. грн.
1	Заробітна плата	2111	100,000
2	Нарахування на оплату праці	2120	22,000
3	Предмети, матеріали, обладнання та інвентар	2210	16,500
4	Оплата послуг (крім комунальних)	2240	1,000
5	Видатки на відрядження	2250	1,500
6	Оплата водопостачання та водовідведення	2272	8,000
7	Оплата електроенергії	2273	40,000
8	Оплата природного газу	2274	10,000
9	Інші поточні видатки	2800	1,000
Разом:			200,000
в т.ч. накладні витрати			33,300
% їх до основної заробітної плати			36,0%

УСТАНОВА-ВИКОНАВЕЦЬ:

Директор
Інституту біології клітини НАН України
академік НАН України

Андрій СИБІРНИЙ

М.П.

Науковий керівник роботи
Молодший науковий співробітник
Інституту біології клітини НАН України
к.б.н.

Олена ВОВК

(підпис)