

ПНИ «Разработка генетических конструкций для коррекции митохондриальных дисфункций»

Этап №4 (01.01.2016 – 30.06.2016)

по теме: РАЗРАБОТКА ЛАБОРАТОРНОГО РЕГЛАМЕНТА ПОЛУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ, ВЫЗЫВАЕМОЙ МУТАЦИЯМИ В МИТОХОНДРИАЛЬНОМ ГЕНОМЕ.

В ходе выполнения проекта по Соглашению о предоставлении субсидии от 07.08.2014г. № 14.604.21.0113 с Минобрнауки России в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014- 2020 годы» на этапе № 4 в период с 01 января 2016 года по 30 июня 2016 года в соответствии с «Планом - графиком исполнения обязательств» по Соглашению **выполнялись следующие работы:**

1. Разработка лабораторного регламента получения генетической конструкции для коррекции митохондриальной дисфункции, вызываемой мутациями в митохондриальном геноме;
2. Получение экспериментальных образцов генетической конструкции для коррекции митохондриальной дисфункции;
3. Закладка экспериментального образца генетической конструкции на хранение в лиофилизированном и в осажденном виде;
4. Разработка программы и методики исследовательских испытаний разработанной генетической конструкции для коррекции митохондриальной дисфункции, вызываемой мутациями в митохондриальном геноме;
5. Проведение исследовательских испытаний;
6. Исследование функциональности экспериментального образца генетической конструкции, заложенного на хранение в осажденном виде при плюс 4 градусах Цельсия.

При этом были **получены следующие результаты:**

Разработанная генетическая конструкция предназначена для коррекции митохондриальной дисфункции, вызываемой мутациями в митохондриальном геноме человека, в частности созданная генетическая конструкция может супрессировать мутацию известную под названием «основная делеция» размером 4977 п.н. (8483–13459), являющуюся причиной тяжелых наследственных заболеваний человека, объединенных под общим названием Синдром Кернса-Сейра (сокращенно KSS). KSS - митохондриальная миопатия, которая чаще всего проявляется в подростковом и юношеском возрасте. KSS является опасным вариантом хронической внешней офтальмоплегии, которая часто прогрессирует. В процессе испытаний экспериментального образца было подтверждено, что генетическая конструкция обеспечивает восстановление параметров митохондриальных функций не менее чем на 20%. При этом измерялись два параметра: уровень гетероплазмии и эффективность митохондриального дыхания. Установлено, что генетическая конструкция эффективно импортируется в митохондрии с помощью белковых переносчиков.

Проведены испытания генетической конструкции, заложенной на хранение в лиофилизированном виде при +20 С на 1 месяц. Заложены два образца в осажденном виде при температуре +4 и -20 С на год.

- 1) Нарботанная генетическая конструкция - это продукт ПЦР, линейная ДНК, размером 5042 п.н, соответствующая области митохондриального генома, удаляющейся из него в результате «основной делеции». Итоговый размер ДНК 3227 кДа. В ходе испытаний выявлено, что после проникновения генетической конструкции в клетки человека происходит восстановление параметров митохондриальных функций: гетероплазмии (на 21%) и митохондриального дыхания (на 32%). Концентрация ДНК в экспериментальном образце 0,08 мкг/мл. Общее количество генетической конструкции 12 мкг. Ее детекция в митохондриях производилась методами радиоавтографии.
- 2) Генетическая конструкция разработана при помощи современных методов генетической инженерии. Выбранный способ доставки конструкции через мембраны митохондрий позволит создать новаторский метод корректировки механизмов супрессии мутаций в митохондриальном геноме.
- 3) Полученные теоретические и экспериментальные результаты четырех этапов ПНИ полностью удовлетворяют техническим требованиям проекта, а также дают нам возможность завершить выбранное направление исследований согласно плану–графику и техническому заданию Соглашения о предоставлении субсидии.
- 4) Настоящие исследования и результаты экспериментальной части соответствуют уровню мировых аналогов, что подтверждается их публикацией в международных научных журналах.

Область применения результатов исследований:

Генетические конструкции, полученные в результате выполнения проекта, могут найти прямое применение в медицине, в частности, в лечении болезней человека, вызванных митохондриальными дисфункциями, а также в ветеринарии. Как известно, в настоящее время синдром KSS практически не поддаются лечению. Наше исследование направлено на преодоление технологических и методологических трудностей в коррекции мутаций митохондриального генома.

Данный проект относится к разряду научных исследований, результаты которых могут оказать значительное влияние на развитие молекулярной биологии. Разработка генно-терапевтических методов лечения нейродегенеративных заболеваний человека позволит приблизить практическое применение в медицине лечения заболеваний человека, связанных с мутациями в митохондриальной ДНК. Проект позволит развивать международное научное сотрудничество в области митохондриальной медицины, формировать новые соответствующие объекты инфраструктуры.

Эффекты от внедрения результатов проекта

В результате окончательного исполнения задач ПНИ в 2016 году мы надеемся получить в достаточном количестве и необходимом качестве генетическую конструкцию для коррекции мутации, известную под названием «основная делеция» размером 4977 п.н. (8483–13459), являющуюся причиной тяжелых наследственных заболеваний человека, объединенных под общим названием Синдром Кернса-Сейра (сокращенно KSS) и предложить генно-терапевтическое решение для лечения нейродегенеративных заболеваний человека. Данные инновационные механизмы лечения будут иметь большое значение в развитии отечественной медицины в целом и генной медицины в частности. Излечение болезней, в настоящее время считающихся неизлечимыми, приведет к снижению смертности, приведет к повышению уровня и качества жизни.

Формы и объемы коммерциализации результатов проекта

Разрабатываемые генные конструкции для корректировки митохондриальных дисфункций найдут широкое применение в современной медицине и ветеринарии. Основными потребителями полученных технологий будут клиники, специализирующиеся на лечении заболеваний, вызванных мутациями ДНК, а также различные биотехнологические и научно-исследовательские лаборатории, работающие в данном секторе.

Результаты четвертого этапа ПНИ были доложены на Гордоновской исследовательской конференции «Митохондрии и хлоропласты», в Маунт Сноу, США, в устном докладе Кузьменко А.В. в период с 19.06.2016 по 24.06.2016 г.