

Создание клеточной платформы для исследования окислительного стресса при болезни Паркинсона

Научный руководитель – Медведев Сергей Петрович

Байрамова Эльвира Махаловна

Студент (магистр)

Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия

E-mail: bairamovaelvira@gmail.com

Гибель дофаминергических нейронов приводит к развитию болезни Паркинсона (БП) - тяжёлого хронического нейродегенеративного заболевания. В результате стремительно развиваются симптомы, приводящие к инвалидизации больного. Лечение БП в настоящее время носит лишь поддерживающий характер, что связано с недостаточной изученностью патологических механизмов, лежащих в основе гибели нейронов [1]. Одним из этих механизмов является окислительный стресс (ОС), возникающий в результате увеличенного образования активных форм кислорода (АФК) при недостаточной активности антиоксидантной системы (АОС). Важным элементом АОС является глутатион, по соотношению окисленных и восстановленных форм которого можно судить об окислительном стрессе клетки. В дофаминергических нейронах больных БП это соотношение нарушено, что может приводить к их гибели [2]. При этом актуальным подходом моделирования нейродегенеративных заболеваний является получение линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) от клеток больных БП, которые могут быть дифференцированы в релевантные типы клеток [3].

Целью работы является создание клеточной платформы для визуализации и количественной оценки патологических процессов, происходящих при окислительно-восстановительном стрессе в культивируемых клетках пациентов, страдающих БП.

Нами была получена генетическая конструкция, кодирующая биосенсор, состоящий из *roGFP2*, соединённого линкером с *Grx1* - ключевым ферментом в реакциях окисления/восстановления глутатиона. Окисленная и восстановленная формы *roGFP2* имеют разный максимум поглощения света, что позволяет оценить редокс-состояние клетки. Для работы также использовали плазмиду, несущую тетрациклиновый трансактиватор. Встройка трансгенов проводилась в локус *AAVS1* с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9. Данными плазмидными конструкциями мы трансфицировали линию ИПСК, полученную в результате перепрограммирования мононуклеарных клеток периферической крови больного БП. После трансфекции и селекции на антибиотике были получены 13 субклонов, из которых после ПЦР-скрининга мы отобрали троих для дальнейшей работы. Данные субклоны проверены на активацию экспрессии трансгена при добавлении доксициклина с помощью флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуорометрии. При добавлении доксициклина процент *roGFP2*⁺-клеток значительно повышается.

В данный момент проводится характеристика полученных линий ИПСК, а также разрабатывается протокол их дифференцировки в дофаминергические нейроны. Дальнейшая работа будет направлена на изучение редокс-потенциала глутатиона в условиях индукторов и ингибиторов окислительного стресса в полученных нейронах, кодирующих биосенсор.

Источники и литература

- 1) Курушина О.В. [и др.] Болезнь паркинсона: современные взгляды на этиологию, патогенез, диагностику и лечение // Лекарственный вестник. 2014. No 2 (54). С. 3–8.
- 2) Dias V. [et al.] The Role of Oxidative Stress in Parkinson ' s Disease // Journal of Parkinson's Disease. 2013. No 3. С. 461–491.
- 3) Martínez-Morales P. [et al.] Stem cells as in vitro model of Parkinson's disease // Stem Cells International. 2012. С. 1–7.