Доставка рекомбинантного аденовируса с клонированным геном GDNF в область травмы спинного мозга при помощи клеток крови пуповины человека стимулирует восстановление двигательной функции и поддерживает популяцию глиальных клеток

Я.О. Мухамедшина [1,2], Г.Ф. Шаймарданова [3], И.И. Салафутдинов [2], А.А. Ризванов [2], Т.В. Повышева [2], Г.А. Масгутова [1], М.В. Нигметзянова [1], Ю.А. Челышев [1,2]

[1] Казанский государственный медицинский университет, Казань

[2] Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

[3] Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань

Delivery of cord blood cells modified with adenoviral vectors expressing GDNF into the area of spinal cord injury stimulates recovery of motor function and supports a population of glial cells

Y.O. Mukhamedshina [1,2], G.F.Shaymardanova [3], I.I. Salafutdinov [2], A.A.Rizvanov [2], T.V. Povysheva [1], G.A. Masgutova [1], M.V. Nigmetzyanova [1], Yu.A. Chelyshev [1,2]

[1] Kazan State Medical University, Kazan

[2] Kazan (Volga region) Federal University, Kazan

[3] Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of RAS, Kazan

На модели контузионной травмы спинного мозга крысы на уровне Th8 изучено влияние доставки в область повреждения гена глиального нейротрофического фактора при помощи трансдуцированных аденовирусом мононуклеарных клеток крови пуповины человека на восстановление двигательной функции и поддержание популяции глиальных клеток. Полученные результаты свидетельствуют о том, что предлагаемый метод генно-клеточной терапии позволяет эффективно стимулировать посттравматическую регенерацию спинного мозга, что проявляется в виде улучшения показателей восстановления двигательной функции, увеличения количества реактивных астроцитов и предшественников олигодендроцитов.

Ключевые слова: аденовирусный вектор, травма спинного мозга, клетки крови пуповины.

On the model of rat spinal cord dosed contusion at Th8 level studied the effect of delivery into the area of damage of glial-cell-line-derived neurotrophic factor gene using adenovirus-transduced of human umbilical cord blood mononuclear cells on motor recovery and maintaining a population of glial cells. The results show that the proposed method of gene-cell therapy can effectively stimulate the regeneration of post-traumatic spinal cord injury, which is manifested in the form of improved indicators of recovery of motor function, increasing the number of reactive astrocytes and oligodendrocytes progenitors.

Key words: adenoviral vector, spinal cord injury, umbilical cord blood cells.

Доставка генов нейротрофических факторов при помощи вирусных векторов является перспективным методом для направленной терапии при патологии ЦНС. Одним из наиболее исследованных и безопасных с точки зрения неконтролируемой дифференцировки трансплантированных клеток и онкогенности является аденовирус [1]. Показано, что локальная доставка в область травмы спинного мозга гена глиального нейротрофического фактора (GDNF) при помощи аденовирусного вектора предотвращает ретроградную атрофию кортикоспинальных мотонейронов и стимулирует восстановление двигательной функции [2]. Однако доставка того же рекомбинантного аденовируса в комбинации с L-аргинином при травматическом повреждении мозга не восстанавливает функциональный дефицит, но уменьшает область повреждения [3]. Выбранный в качестве терапевтического гена *gdnf* является мощным фактором поддержания жизнеспособности нейронов, стимулирует рост аксонов, их миелинизацию, уменьшает апоптоз и дегенерацию ткани [4, 5]. Именно поэтому с данным нейротрофическим фактором связывают перспективы лечения неврологических расстройств.

Однако инъекция трансгена при помощи вирусных векторов позволяет трансдуцировать клетки, локализация которых ограничена достаточно узкой областью введения. Между тем, при травме спинного мозга в патологический процесс вовлекается обширная область, прилегающая к эпицентру травмы. Поэтому для наиболее полного проявления терапевтического действия вводимого гена необходимо обеспечить его экспрессию не только в эпицентре травматического повреждения, но и в прилегающих областях, как правило, достаточно удалённых от этой зоны. Для решения этой задачи наиболее перспективным подходом представляется доставка терапевтических генов

e-mail: chelyshev-kzn@yandex.ru

на клеточных носителях. С этой целью интенсивно исследуют клетки крови пуповины, обладающие низкой иммуногенностью, способностью сдерживать воспалительную реакцию, оказывать нейротрофическое действие и стимулировать неоваскуляризацию [6, 7]. Данное исследование посвящено оценке эффективности клеточно-опосредованной доставки гена *gdnf* при помощи аденовирусных векторов на восстановление двигательной функции и поддержание популяции глиальных клеток.

Материал и методы

Эксперименты проведены на 32 белых лабораторных крысах, самках и самцах, весом 200–250 г. Содержание и использование лабораторных животных соответствовало правилам, принятым в Казанском государственном медицинском университете и одобренным Этическим комитетом. Животных содержали в стандартных условиях со свободным доступом к воде и корму. Крыс наркотизировали путём внутрибрюшинной инъекции хлоралгидрата (Sigma) (80 мг/мл, 0,4 мл на 100 г). Всем животным проводили ламинэктомию на уровне Th8, после чего наносили дозированную контузионную травму спинного мозга металлическим стержнем весом 10 г строго на центр визуализируемого участка с высоты 25 мм [8]. Получение рекомбинантного аденовируса с клонированным геном *gdnf* было описано нами ранее [9]. Сразу после нанесения травмы животным экспериментальной группы (МККП+AdV-GDNF) вводили мононуклеарные клетки крови пуповины человека, трансдуцированные аденовирусом AdV-GDNF по 1 млн. в 5 мкл DPBS (БиолоТ, Россия) в 2 точки на расстоянии 1 мм ростральнее и каудальнее эпицентра травмы и 0,5 мм латеральнее срединной линии при помощи гамильтоновского шприца (Sigma, США). Животным первой контрольной группы (МККП+AdV-EGFP) в аналогичных условиях эксперимента вводили те же клетки, трансфицированные аденовирусным вектором с геном усиленного зелёного флуоресцирующего белка (EGFP). Крысам с контузионной травмой спинного мозга второй контрольной группы трансплантацию клеток не производили. В течение 7 сут. после операции всем экспериментальным животным внутримышечно вводили гентамицин (5 мг/кг) один раз в сутки.

Для оценки восстановления двигательной функции использовали поведенческий тест BBB [10]. На седьмые сутки после контузионной травмы спинного мозга крыс исследовали через сутки в одно и то же время, располагая в центре открытого поля и регистрируя в баллах параметры произвольных движений с участием двух независимых исследователей.

Через 30 сут. после нанесения травмы животных наркотизировали и транскардиально перфузировали 4% раствором параформальдегида (4°С). Фрагмент спинного мозга длиной 5 см (по 2,5 см в ростральном и каудальном направлении от эпицентра повреждения) забирали вместе с позвонками. Через 12 ч от начала фиксации выделяли спинной мозг и разделяли его на 5 равных частей.

Иммунофлуоресцентное окрашивание проводили на поперечных срезах спинного мозга толщиной 20 мкм, полученных на микротом-криостате HM560 Cryo-Star (Carl Zeiss, Германия). Для идентификации антигена срезы инкубировали с первичными антителами к α-рецептору тромбоцитарного фактора роста (α-PDGFR, SantaCruze, 1:150) и глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP, SantaCruze, 1:200) в течение ночи при 4°С, промывали в фосфатно-солевом буфере, и затем инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентными красителями anti-mouse Alexa 647 (Invitrogen, 1:200) и anti-rabbit Alexa 647 (Invitrogen, 1:200) в течение 2 ч при комнатной температуре. Для визуализации ядер клеток срезы дополнительно окрашивали в течение 10 мин при комнатной температуре раствором 4',6-диамидино-2-фенилиндола (краситель DAPI, 10 мкг/мл в ФС буфере, Sigma, США). Окрашенные срезы заключали в среду, поддерживающую флуоресценцию, изучение и оцифровку изображений проводили при помощи конфокального сканирующего микроскопа LSM 510-Meta (Carl Zeiss).

Количество α-PDGFR^{+}-клеток подсчитывали на оцифрованных изображениях в 4 фиксированных зонах серого и белого вещества на площади 0,05 мм^2: вентро-медиальная область вентральных канатиков (VF), вентральные рога (VH), кортикоспинальный тракт в дорсальных канатиках (CST), центральный канал (CC). Анализ количества GFAP^{+}-клеток проводили в аналогичных условиях в следующих зонах: вентро-медиальная часть переднего канатика и латеральная часть бокового канатика справа и слева. Результаты морфометрии обрабатывали с использованием дисперсионного анализа ANOVA.

Результаты

К 30 сут. показатель восстановления двигательной функции при трансплантации в область повреждения спинного мозга МКПК человека, трансдуцированных аденовирусом AdV-GDNF, возрастал на 58% при сравнении с соответствующим показателем у животных 1 контрольной группы с введением тех же клеток, трансдуцированных аденовирусом AdV-EGFP. На сроке 9, 11 и 13 сут. показатель BBB в экспериментальной группе по сравнению с 1 контрольной достоверно возрастал, соответственно на 62,7%, 59,5% и 53,5% (рис. 1).

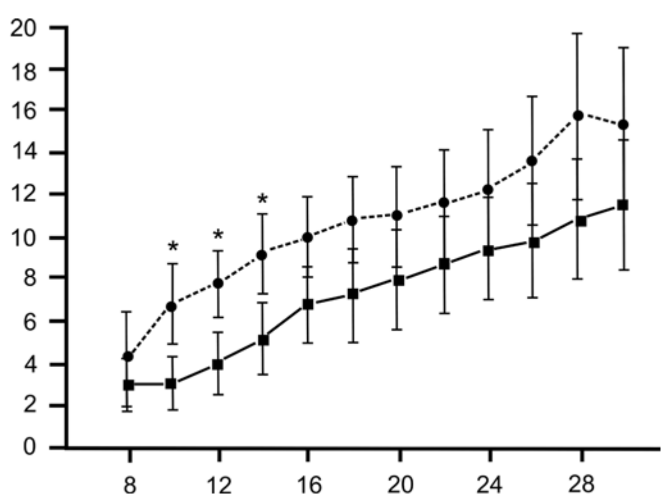

Рис. 1. Результаты теста BBB, восстановление двигательной функции. По оси абсцисс – сутки после операции, по оси ординат – показатель теста в баллах. Пунктирная линия – экспериментальная группа, сплошная линия – 1 контрольная группа.
** p<0,05*

К 30 сут. после контузионной травмы спинного мозга крысы в экспериментальной и контрольных группах в белом и сером веществе были обнаружены GFAP$^+$-астроциты. В группе МККП+AdV-GDNF в зонах подсчёта на расстоянии 0,5 см от эпицентра травмы в каудальном направлении популяция GFAP$^+$-клеток в 2 раза превышала аналогичную в контрольной группе.

При проведении иммунофлуоресцентных реакций с антителами к α-PDGFR во всех исследуемых группах в белом и сером веществе выявлены α-PDGFR$^+$-олигодендроциты. В экспериментальной и 2 контрольной группах их количество и распределение в указанных областях существенно различалось (рис. 2).

Обнаружено достоверное увеличение количества α-PDGFR$^+$-клеток во всех фиксированных зонах белого и серого вещества на расстоянии 0,5 см в ростральном направлении от эпицентра повреждения в экспериментальной группе (МККП+AdV-GDNF), по сравнению со 2 контрольной (без трансплантации клеток). При этом в области VF и CST этот показатель больше в группе МККП+AdV-GDNF по сравнению с группой без трансплантации клеток в 2,8–3 раза, а в зонах CC и VH в 2,2–2,4 раза, соответственно (рис. 3).

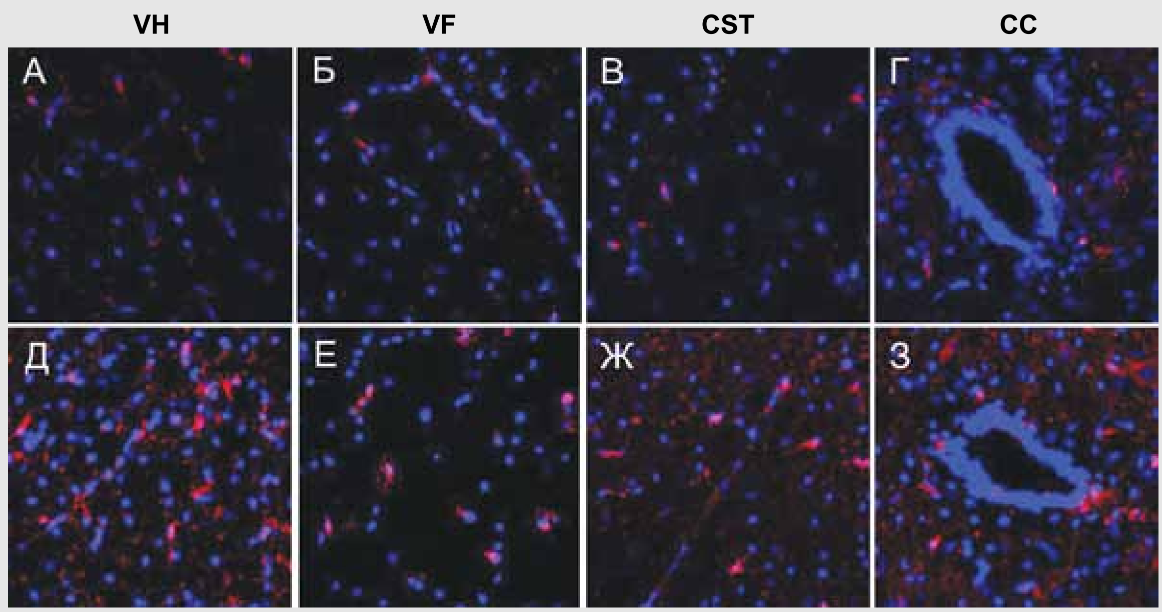

Рис. 2. Спинной мозг крыс, экспрессия α–PDGFR (красный) в фиксированных зонах серого и белого вещества на расстоянии 0,5 см ростральнее эпицентра травмы:
А–Г – 2 контрольная группа животных; Д–З – экспериментальная группа (МККП+AdV–GDNF).
VH – вентральные рога; VF – вентро-медиальная область вентральных канатиков;
CST – кортикоспинальный тракт в дорсальных канатиках; CC – центральный канал.
Иммуногистохимическая реакция с антителами к α–PDGFR. Визуализация ядер: DAPI.
Ув.:×400

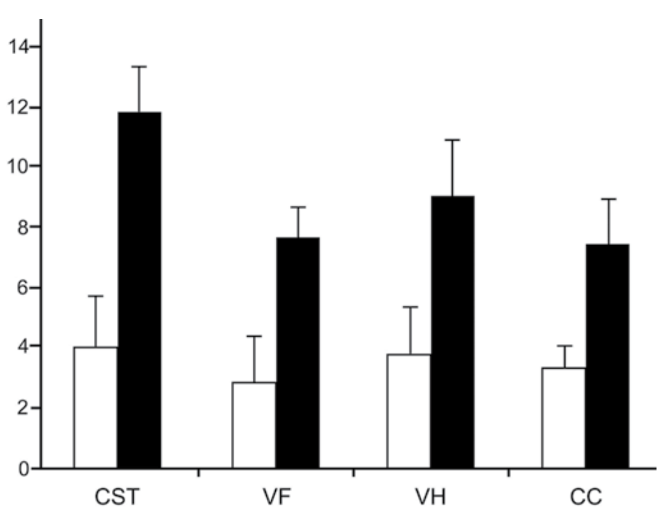

Рис. 3.
Количество α–PDGFR+–клеток (ось ординат) в фиксированных зонах серого и белого вещества на расстоянии 0,5 см в ростральном направлении от эпицентра повреждения (ось абсцисс), 30 сут. после операции.
Белые столбцы – 2 контрольная группа (без трансплантации клеток);
темные – экспериментальная группа (МККП+AdV–GDNF).
В каждой зоне при сравнении показателя пары столбиков – $p<0,05$

Обсуждение

Полученные результаты исследования свидетельствуют о том, что заявляемый способ клеточно-опосредованной доставки терапевтического гена *gdnf* при помощи аденовирусных векторов в область травмы спинного мозга позволяет эффективно стимулировать его репаративную регенерацию, что проявляется в виде улучшения показателей восстановления двигательной функции и увеличения количества реактивных астроцитов, а также олигодендроцитов, существенно необходимых для протекания процесса нейрорегенерации. Выявленное нами в результате проведения генно-клеточной терапии увеличение количества GFAP^{+}-астроцитов следует рассматривать как позитивный фактор стимулирования нейрорегенерации. Этот вывод основан на известном представлении о роли реактивных астроцитов, которые оказывают антиоксидантное и цитопротекторное действие на нейроны и миелинобразующие олигодендроциты, в том числе путём увеличения экспрессии мембранного транспортёра глутамата и снижения содержания этого возбуждающего нейромедиатора во внеклеточном пространстве [11].

α-PDGFR является специфическим маркёром клеток-предшественниц олигодендроцитов [12]. Наличие α-PDGFR^{+}-клеток в области повреждения имеет большое значение для процесса регенерации, так как свидетельствует о ремиелинизации проводников [13]. В нашем эксперименте значительное увеличение количества α-PDGFR^{+}-олигодендроцитов в экспериментальной группе по сравнению с контрольной, где трансплантацию клеток не проводили, свидетельствует о стимуляции посттравматической регенерации выбранной нами генно-клеточной конструкцией.

Рассмотренный в данном исследовании метод генно-клеточной терапии травмы спинного мозга, предполагающий доставку аденовирусного вектора с геном *gdnf* при помощи МККП в область повреждения, улучшает функциональные показатели и поддерживает популяцию наиболее значимых для нейрорегенерации глиальных клеток.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №12-04-31092мол_а, грантов РФФИ № 12-04-31092_мол_а и № 13-04-12035_офи_м, гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых докторов наук № МД-433.2013.4. Работа частично выполнена на оборудовании Федерального центра коллективного пользования физико-химических исследований веществ и материалов (ФЦКП ФХИ) и Научно образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Gray S.J., Choi V.W., Asokan A. et al. Production of recombinant adeno-associated viral vectors and use in in vitro and in vivo administration. Curr. Protoc. Neurosci. 2011; 4(17): 1–36.
2. Tang X.Q., Wang Y., Huang Z.H. et al. Adenovirus-mediated delivery of GDNF ameliorates corticospinal neuronal atrophy and motor function deficits in rats with spinal cord injury. Neuroreport 2004; 15(3): 425–29.
3. Degeorge M.L., Marlowe D., Werner E. et al. Combining glial cell line-derived neurotrophic factor gene delivery (AdGDNF) with L-arginine decreases contusion size but not behavioral deficits after traumatic brain injury. Brain Res. 2011; 27(1403): 45–56.
4. Cheng H., Wu J.P., Tzeng S.F. Neuroprotection of glial cell line-derived neurotrophic factor in damaged spinal cords following contusive injury. J. Neurosci. Res. 2002; 69(3): 397–405.
5. Mills C.D. Allchorne A.J., Griffin R.S. et al. GDNF selectively promotes regeneration of injury — primed sensory neurons in the lesioned spinal cord. Mol. Cell Neurosci. 2007; 36(2): 185–94.
6. Park D.H., Lee J.H., Borlongan C.V. et al. Transplantation of umbilical cord blood stem cells for treating spinal cord injury. Stem Cell Rev. 2011; 7: 181–94.
7. Chen C.T., Foo N.H., Liu W.S. et al. Infusion of human umbilical cord blood cells ameliorates hind limb dysfunction in experimental spinal cord injury through anti-inflammatory, vasculogenic and neurotrophic mechanisms. Pediatr. Neonatol. 2008; 49(3): 77–83.
8. Шаймарданова Г.Ф., Мухамедшина Я.О., Архипова С.С. и др. Посттравматические изменения спинного мозга крысы при трансплантации мононуклеарных клеток крови пуповины человека, модифицированных генами VEGF и FGF. Ж. Морфология 2011; 140(6): 36–42.
9. Черенкова Е.Е., Федотова М.А., Борисов Р.Р. и др. Создание рекомбинантных аденовирусов и лентивирусов, экспрессирующих ангиогенные и нейропротекторные факторы, с помощью технологии клонирования Gateway. Ж. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2012; 7(3): 164–8.
10. Basso D.M., Beattie M.S., Bresnahan J.C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. Neurotrauma 1995; 12(1): 1–21.
11. Lepore A. C., O'Donnell J., Kim A.S. et al. Reduction in expression of the astrocyte glutamate transporter, GLT1, worsens functional and histological outcomes following traumatic spinal cord injury. Glia 2011; 59(12): 1996–2005.
12. Watzlawik J.O., Warrington A.E., Rodriguez M. PDGF is required for remyelination-promoting IgM stimulation of oligodendrocyte progenitor cell proliferation. PLoS One 2013; 8(2): 1–16.
13. Baracskay K.L., Kidd G.J., Miller R.H. et al. NG2-positive cells generate A2B5-positive oligodendrocyte precursor cells. Glia 2007; 55: 1001–10.

Поступила 29.08.2013