

Анализ экспрессии рекомбинантного гена *vegf* генетически модифицированными мононуклеарными клетками пуповинной крови в эксперименте *in vivo*

Я.О. Мухамедшина, В.В. Соловьева, И.И. Салафутдинов, Е.Е. Черенкова, В.Ю. Федотова, З.З. Сафиуллов, А.А. Измайлов, Г.А. Шарифуллина, С.Р. Абдулхаков, М.С. Калигин, Ф.В. Баширов, М.А. Мухамедьяров, М.М. Шмаров, Б.С. Народицкий, А.П. Киясов, А.А. Ризванов, Р.Р. Исламов

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Казанский государственный медицинский университет, Казань

Analysis of recombinant *vegf* gene expression by genetically modified umbilical cord blood mononuclear cells in experiment *in vivo*

Y.O. Mukhamedshina, V.V. Solovieva, I.I. Salafutdinov, E.E. Cherenkova, V.Y. Fedotova, Z.Z. Safiullov, A.A. Izmailov, G.A. Sharifullina, S.R. Abdulhakov, M.S. Kaligin, F.V. Bashirov, M.A. Muhamediarov, M.M. Shmarov, B.S. Naroditskii, A.P. Kiasov, A.A. Rizvanov, R.R. Islamov

Kazan (Volga region) Federal University, Kazan

Kazan State Medical University, Kazan

Для получения значимого терапевтического эффекта трансплантируемые генетически модифицированные клетки должны обладать повышенной способностью к выживанию и активной экспрессией терапевтического гена. В настоящей работе с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания нами была исследована функциональная активность генно-клеточной конструкции для доставки терапевтического гена в область регенерации. В качестве модели использовали трансгенных SOD1-G93A мышей с фенотипом бокового амиотрофического склероза, которым проводили ксенотрансплантацию мононуклеарных клеток пуповинной крови человека, генетически модифицированных экспрессионными аденовирусными векторами, кодирующими сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) и репортерный зеленый флуоресцентный белок (EGFP).

Результаты исследования позволили установить не только продолжительность выживания трансплантированных клеток, но и эффективность экспрессии рекомбинантного гена в генетически модифицированных клетках *in vivo*. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание при помощи антител к ядерному антигену человека HNA и сосудистому эндотелиальному фактору роста VEGF обнаружило HNA⁺/VEGF⁺ клетки на терминальной стадии заболевания, через 15 нед. после трансплантации. Полученные данные свидетельствуют, что генетически модифицированные мононуклеарные клетки пуповинной крови, трансплантированные трансгенным SOD1-G93A мышам, способны проникать через гематоэнцефалический барьер, мигрировать в область дегенерации нервной ткани и сохранять жизнеспособность от момента трансплантации до смерти животных в терминальной стадии заболевания. При этом экспрессионный вектор на основе аденовируса, содержащего терапевтический ген, активно функционирует в трансплантированных клетках, а секреторный продукт рекомбинантного гена воздействует на клетки-мишени по паракринному механизму.

Ключевые слова: сосудистый эндотелиальный фактор роста, зеленый флуоресцентный белок, генно-клеточная терапия, мононуклеарные клетки пуповинной крови, боковой амиотрофический склероз

To obtain a significant therapeutic effect transplanted genetically modified cells should have an enhanced ability to survive and active expression of the therapeutic gene. In this paper, by using immunofluorescent staining we investigated the functional activity of the gene-cell formulation designed to deliver a therapeutic gene into the area of regeneration. As a model we used transgenic SOD1-G93A mice with amyotrophic lateral sclerosis phenotype which received xenotransplantation of human umbilical cord blood mononuclear cells, genetically modified with adenoviral expression vector encoding vascular endothelial growth factor (VEGF) and the reporter green fluorescent protein (EGFP).

Results of the study allowed to establish not only the duration of survival of transplanted cells, but also the efficiency of expression of recombinant genes in genetically modified cells *in vivo*. Double immunofluorescent staining with antibodies against human nuclear antigen HNA and VEGF detected HNA⁺/VEGF⁺ cells in the terminal stage of disease 15 weeks after transplantation. These data suggest that genetically modified umbilical cord blood mononuclear cells, transplanted into SOD1-G93A transgenic mice, are able to penetrate the blood-brain barrier and migrate into the area of degeneration of nerve tissue and survive from the time of transplantation until the death of animals at the terminal stage of disease. At that time adenoviral expression vector encoding therapeutic gene is functionally active in transplanted cells, and secretory products of recombinant gene act on target cells by a paracrine mechanism.

Key words: vascular endothelial growth factor, green fluorescent protein, gene-cell therapy, umbilical cord blood mononuclear cells, amyotrophic lateral sclerosis.

Генетически модифицированные клетки, подготовленные для регенеративной медицины с целью доставки терапевтических генов, должны иметь предсказуемые и воспроизводимые характеристики, а именно: активно мигрировать в область регенерации, чтобы обеспечить адресную доставку терапевтических генов; интегрироваться с клетками органа-реципиента для увеличения продолжительности собственной жизни; эффективно синтезировать и секретировать продукты терапевтических трансгенов. При этом не стоит рассчитывать, что клеточные носители, как и стволовые клетки, будут участвовать в замещении погибших паренхиматозных клеток. В настоящее время доклинические исследования ведутся в двух главных направлениях: 1) поиск клеток, наиболее подходящих на роль клеточного носителя; 2) выбор генетической конструкции, обеспечивающей эффективную экспрессию рекомбинантного гена. В нашей лаборатории разрабатывается технология генно-клеточной терапии бокового амиотрофического склероза с помощью генетически модифицированных клеток, полученных на основе мононуклеарной фракции пуповинной крови и аденовирусных векторов, экспрессирующих нейропротекторные факторы. Целью настоящего исследования явился анализ экспрессии терапевтических генов в составе рекомбинантного аденовируса *in vitro* после трансдукции мононуклеарных клеток пуповинной крови, а также *in vivo*, после ксенотрансплантации генетически модифицированных клеток человека трансгенным SOD1-G93A мышам с фенотипом бокового амиотрофического склероза. В качестве терапевтического гена применяли сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF). В качестве репортерного гена применяли усиленный зеленый флуоресцентный белок (EGFP).

Материал и методы

Генетическая модификация мононуклеарных клеток пуповинной крови. Клеточный носитель терапевтического гена создавали на основе мононуклеарной фракции пуповинной крови человека и рекомбинантного аденовирусного экспрессионного вектора. Пуповинную кровь забирали после получения информированного согласия беременной и дородового скрининга на наличие противопоказаний к донорству крови. По общепринятому протоколу из пуповинной крови с помощью центрифугирования в градиенте плотности фиколла выделяли мононуклеарную фракцию клеток [1]. Все манипуляции с кровью выполнены под на базе банка стволовых клеток Казанского государственного медицинского университета.

Для доставки в мононуклеарные клетки терапевтического гена был выбран экспрессионный вектор на основе рекомбинантного аденовируса серотипа 5. Трансдукцию клеток проводили аденовирусными векторами, экспрессирующими репортерный ген зеленого флуоресцентного белка EGFP (Ad5-EGFP) или терапевтический ген сосудистого эндотелиального фактора роста человека VEGF изоформы 121 (Ad5-VEGF121), полученные нами ранее [2]. Подготовленные для трансплантации клетки делили на две части. Одну часть клеток оставляли для исследования *in vitro*, другую часть генетически модифицированных клеток разводили в стерильном физиологическом растворе до концентрации 2×10^7 кл./мл для трансплантации транс-

генным мышам с фенотипом бокового амиотрофического склероза.

Ксенотрансплантация генетически модифицированных клеток SOD1-G93A мышам. Трансгенные мыши B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J, экспрессирующие мутантный ген человека SOD1 (Gly93→Ala; глицин замещён на аланин в позиции 93), приобретены в питомнике лабораторных животных «Пушино». Половозрелым мышам обоего пола путём инъекции в ретроорбитальное пространство трансплантировали 2×10^7 генетически модифицированных клеток в объеме 100 мкл. В первой экспериментальной группе мышам трансплантировали генетически модифицированные клетки, трансдуцированные аденовирусом Ad5-EGFP. Во второй группе животных получили инъекцию генетически модифицированных клеток, трансдуцированных аденовирусом Ad5-VEGF121. Ксенотрансплантацию клеток производили на 27–28 нед. жизни мышей до появления клинических признаков заболевания. В терминальной стадии заболевания (42–44 нед. жизни) животных наркотизировали, через большой круг кровообращения транскардиально перфузировали сначала холодным фосфатно-солевым буфером (pH = 7,4), затем – холодным 4% раствором параформальдегида (pH = 7,4). Спинной мозг извлекали из позвоночного столба, постфиксировали в растворе параформальдегида. Для криопротекции фиксированную ткань насыщали 30% раствором сахарозы на фосфатно-солевом буфере (pH = 7,4).

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Для приготовления криостатных срезов поясничный отдел спинного мозга помещали в заливочную среду TBS (Triangle Biomedical Science, США) и замораживали с помощью элемента Пельтье в камере криостата Microm HM 560 (Thermo Scientific, США). Свободно плавающие поперечные срезы толщиной 20 мкм подвергали двойному иммунофлуоресцентному окрашиванию. Для идентификации антигена срезы инкубировали с первичными антителами к ядерному антигену человека HNA (Chemicon, 1:125, США), репортерному зелёному флуоресцирующему белку GFP (Santa Cruz, 1:100, США), сосудистому эндотелиальному фактору роста VEGF (Sigma-Aldrich, 1:125, США) и цитозольному белку, инициирующему апоптоз, Caspase-3 (Sigma-Aldrich, 1:1000, США) в течение ночи при 4°C, промывали в фосфатно-солевом буфере, и затем инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентными красителями anti-mouse Alexa 647 (Invitrogen, 1:150, США), anti-goat Alexa 488 (Invitrogen, 1:100, США), anti-rabbit Alexa 555 (Invitrogen, 1:150, США) в течение 2 ч при комнатной температуре. Для визуализации клеточных ядер 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, и изучали при помощи конфокального сканирующего микроскопа LSM 510-Meta (Carl Zeiss, Германия).

Результаты

Эффективность генетической модификации мононуклеарных клеток пуповинной крови оценивали по интенсивности зеленой флуоресценции клеток, трансдуцированных Ad5-EGFP, на инвертированном флуо-

ресцентном микроскопе исследовательского класса AxioObserver Z1 (Carl Zeiss, Германия). Через сутки после трансдукции в мононуклеарных клетках выявлена зеленая флуоресценция, что свидетельствует об эффективной генетической модификации клеток рекомбинантным аденовирусом Ad5-EGFP (рис. 1).

Боковой амиотрофический склероз характеризуется прогрессирующей гибелью двигательных нейронов прецентральной извилины коры, ствола головного мозга и передних столбов спинного мозга. Гибель двигательных нейронов при заболевании происходит путём апоптоза. Проведённая нами диагностика

апоптоза с помощью антител к каспазе-3 выявила вступившие в апоптоз двигательные нервные клетки передних рогов спинного мозга. Поскольку животных выводили из эксперимента в терминальной стадии заболевания и клинически у мышей наблюдали выраженный паралич задних конечностей, поэтому среди мотонейронов преимущественно выявлялись каспаза-3 позитивные нейроны. При двойном иммунофлуоресцентном окрашивании с помощью антител к каспазе-3 и ядерному антигену человека нами среди каспаза-3 позитивных нейронов были выявлены HNA-позитивные клетки (рис. 2).

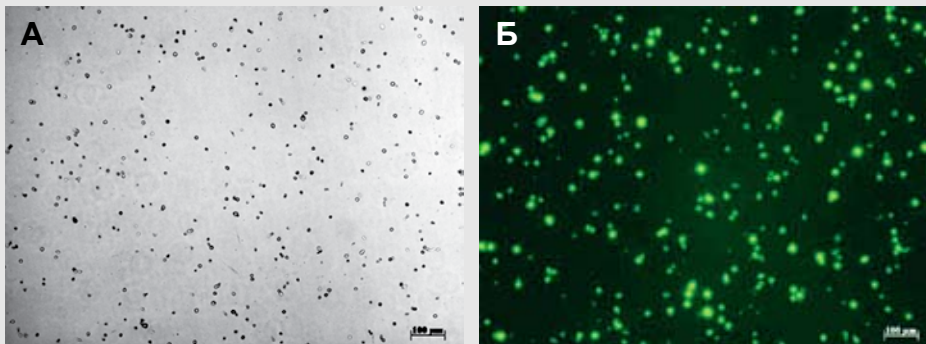


Рис. 1.
Клетки мононуклеарной фракции пуповинной крови человека, трансдуцированные рекомбинантным аденовирусом Ad5-EGFP: А – фазово-контрастная микроскопия; Б – флуоресцентная микроскопия. Шкала: 100 мкм

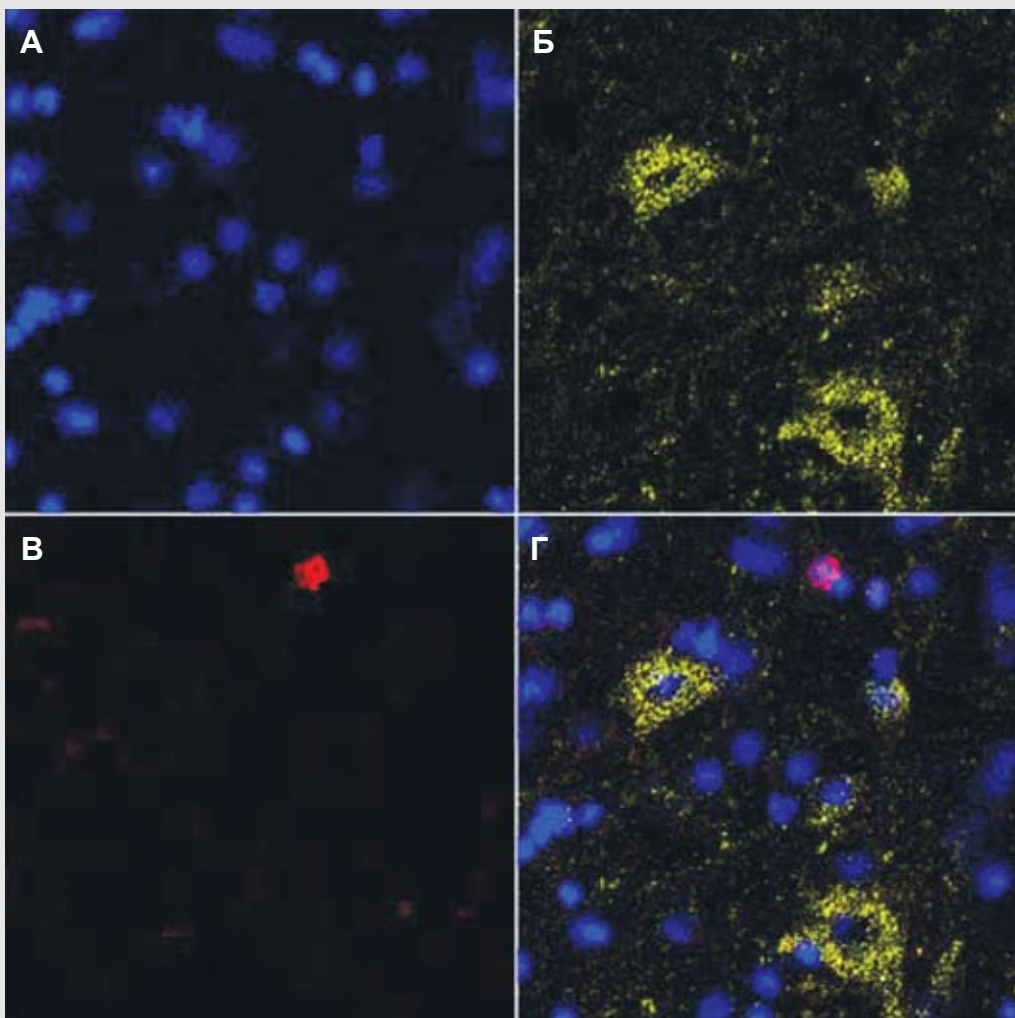


Рис. 2.
Спинной мозг трансгенной мыши SOD1-G93A (поперечный срез) через 42 нед. после трансплантации генетически модифицированных клеток пуповинной крови человека: А – ядра клеток; Б – экспрессия каспазы-3; В – экспрессия ядерного антигена человека (HNA); Г – объединение панелей А-В. Среди каспаза-3 позитивных мотонейронов присутствуют каспаза-3 негативные HNA-позитивные мононуклеарные клетки человека. Иммунофлуоресцентная реакция с антителами к HNA и каспазе-3. Окраска ядер: DAPI

Обнаруженный факт подтверждает нашу гипотезу, что мононуклеарные клетки способны проникать через гематоэнцефалический барьер и мигрировать в места нейродегенерации и по паракринному механизму поддерживать выживание нервных клеток.

Мононуклеарные клетки пуповинной крови, трансдуцированные аденовирусом Ad5-EGFP, выявляли с помощью антител к EGFP. Лазерная микроскопия поперечных срезов поясничного отдела спинного мозга 6 мышей (по 20–30 срезов от каждой мыши), наркотизированных в терминальной стадии болезни, выявила EGFP-позитивные клетки. Иммунофлуоресцентное окрашивание позволило установить характер миграции трансплантированных клеток, продолжительность их выживания и эффективность экспрессии репортерного гена. EGFP-позитивные клетки обнаружены как в белом веществе спинного мозга (боковых, задних и передних канатиках), так и в сером веществе (преиму-

щественно в передних рогах) через 14 нед. после трансплантации (рис. 3).

Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание при помощи антител к HNA и VEGF было выполнено с целью выявления мононуклеарных клеток после трансдукции аденовирусом Ad5-VEGF121, экспрессирующим терапевтический ген. Лазерная микроскопия поперечных срезов спинного мозга 8 мышей (по 20–30 срезов от каждой мыши) в терминальной стадии заболевания показала, что через 15 нед. после ксенотрансплантации у всех мышей в поясничном утолщении спинного мозга присутствуют HNA⁺/VEGF⁺-клетки (рис. 4). Полученные результаты свидетельствуют, что генетически модифицированные мононуклеарные клетки человека после ксенотрансплантации трансгенным мышам способны продолжительное время выживать и секретировать VEGF в области нейродегенерации и по паракринному механизму поддерживать выживание двигательных нейронов.



Рис. 3. EGFP-позитивные клетки в сером веществе поясничного отдела спинного мозга трансгенной SOD1-G93A мыши, 14 нед. после трансплантации: А – ядра клеток; Б – экспрессия EGFP, С – объединение панелей А–Б. Иммунофлуоресцентная реакция с антителами к EGFP. Окраска ядер: DAPI

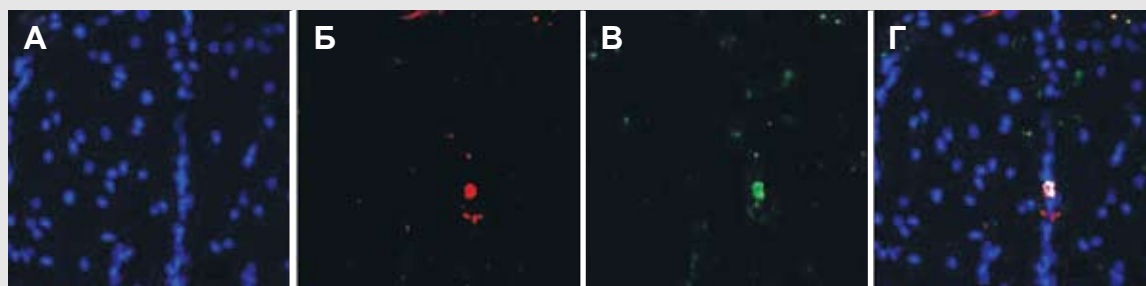


Рис. 4. Серое вещество поясничного отдела спинного мозга трансгенной SOD1-G93A мыши, 15 нед. после трансплантации: А – ядра клеток; Б – экспрессия HNA; В – экспрессия VEGF; Г – объединение панелей А–В, выявляющее HNA⁺/VEGF⁺-клетку. Иммунофлуоресцентная реакция с антителами к HNA и VEGF

Обсуждение

Выбор клеточного носителя для терапевтического гена остаётся одной актуальной задачей регенеративной медицины. В наших исследованиях активно разрабатывается доставка рекомбинантных генов в область регенерации с помощью мононуклеарных клеток пуповинной крови человека. Целесообразность применения мононуклеарных клеток пуповинной крови в качестве клеточного носителя терапевтического гена обусловлена особенными свойствами

этих клеток: низкая иммуногенность, доступность, простота получения и хранения. Wan-Zhang Yang с соавт. (2010) убедительно продемонстрировали безопасность аллотрансплантации пуповинной крови для терапии разных нозологических форм [3]. Кроме того, в пуповинной крови присутствуют стволовые клетки, являющиеся источником многочисленных ростовых и трофических факторов и способные давать начало специализированным клеткам разных тканей и стимулировать ангиогенез [4–5]. Немаловажным

фактором является и отсутствие законодательных, этических и религиозных запретов, связанных с трансплантацией клеток пуповинной крови, в отличие, например, от эмбриональных стволовых клеток.

Вторым немаловажным компонентом в создании клеточного носителя терапевтического гена является векторная система. В данной работе вектором терапевтического гена был выбран рекомбинантный аденовирус, который считается одним из перспективных векторов для генной терапии в регенеративной медицине [6]. Рекомбинантный аденовирус способен инфицировать широкий спектр как делящихся, так и неделящихся клеток, а вирусный геном может принять трансгенные вставки до 8 тысяч пар нуклеотидов. Из-за отсутствия способности к интеграции в геном хозяина аденовирусная система позволяет добиться временной, но достаточно продолжительной экспрессии трансгенов [7].

В настоящем исследовании нами на основе мононуклеарных клеток пуповинной крови и аденовирусной системы получен эффективный клеточный носитель терапевтических генов, функциональная активность которого была подтверждена в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Так в экспериментах *in vitro* с помощью флуоресцентной микроскопии показана высокая эффективность трансдукции мононуклеарных клеток пуповинной крови аденовирусным вектором, несущим репортерный ген *egfp*. Результаты, полученные в экспериментах *in vivo*, свидетельствуют, что генетически модифицированные мононуклеарные клетки пуповинной крови, трансплантированные трансгенным SOD1-G93A мышам, способны

проникать через гематоэнцефалический барьер, мигрировать в область дегенерации нервной ткани и сохранять жизнеспособность от момента трансплантации до смерти животных в терминальной стадии заболевания. При этом экспрессионный вектор на основе аденовируса, содержащего терапевтический ген, активно функционирует в трансплантированных клетках, а секреторный продукт рекомбинантного гена воздействует на клетки-мишени по паракринному механизму. Предложенный нами метод генно-клеточной терапии бокового амиотрофического склероза на основе мононуклеарных клеток пуповинной крови и аденовирусного вектора является более безопасным по сравнению с прямой генной терапией с применением вирусов, более эффективным по сравнению с трансплантацией нативных немодифицированных клеток и позволяет не только длительно поддерживать продукцию терапевтических молекул в области нейродегенерации, но и контролировать вирусную инфекцию.

Благодарности

Выполнение данного научного исследования финансируется за счёт государственного контракта ФЦП Министерства образования и науки Российской Федерации № 16.512.11.2101 и грантами Российского Фонда Фундаментальных Исследований (11-04-00902-а, 10-04-01423-а). 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. Fuss I.J., Kanof M.E., Smith P.D. et al. Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. *Curr Protoc Immunol.* 2009; Chapter 7: Unit 7.1.
2. Завалишин И.А., Бочков Н.П., Суетна З.А. и др. Генная терапия бокового амиотрофического склероза. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2008; 145(4): 467–70.
3. Yang W.Z., Zhang Y., Wu F. et al. Safety evaluation of allogeneic umbilical cord blood mononuclear cell therapy for degenerative conditions. *J. Transl. Med.* 2010; 8:75.
4. Ma N., Stamm C., Kaminski A. et al., Human cord blood cells

induce angiogenesis following myocardial infarction in NOD/scid-mice. *Cardiovasc. Res.* 2005; 66(1): 45–54.

5. Neuhoff S., Moers J., Rieks M. et al. Proliferation, differentiation, and cytokine secretion of human umbilical cord blood-derived mononuclear cells *in vitro*. *Exp. Hematol.* 2007; 35(7): 1119–31.

6. Vorburger S.A., Hunt K.K. Adenoviral gene therapy. *Oncologist* 2002; 7(1): 46–59.

7. Yan R., Zhang L., Zhang Q. et al. A new finding concerning adenoviral-mediated gene transfer: A high-level, cell-specific transgene expression in the neural stem cells of adult mice. *J. Virol. Methods.* 2012. Epub ahead of print.

Поступила 05.08.2012