

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПУПОВИНОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА И ПРЯМАЯ ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ КОЖНЫХ РАН У КРЫС

И.М. Газизов^{1,2}, И.И. Салафутдинов¹, М.О. Мавликеев¹, Ф.В. Баширов², Р.Р. Исламов², А.А. Ризванов¹, А.П. Киясов¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

Application of genetically modified umbilical cord blood cells and direct gene therapy for treatment of skin wounds in rats

I.M. Gazizov^{1,2}, I.I. Salafutdinov¹, M.O. Mavlikeev¹, F.V. Bashirov², R.R. Islamov², A.A. Rizvanov¹, A.P. Kiassov¹

¹ Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

² Kazan State Medical University, Kazan, Russia

За последние несколько десятилетий были предложены различные методы лечения, ускоряющие регенерацию ран кожи. Наиболее перспективными являются два новых подхода — генная терапия и терапия стволовыми клетками. В данной работе были совмещены оба подхода в виде применения трансфицированных плазмидой pBud-VEGF165-FGF2 мононуклеарных клеток пуповинной крови человека при полнослойных ранах кожи у крыс. Двухкассетная экспрессионная плаزمида pBud-VEGF165-FGF2 кодирует одновременно два терапевтических гена VEGF и FGF2, отвечающих за экспрессию проангиогенных факторов роста. В результате проведенного исследования показано, что в группах с применением генно-клеточной терапии через 2 нед. после введения клеток часть мононуклеаров пуповинной крови может быть обнаружена в области нанесения раны и сохраняет экспрессию маркеров стволовых и гемопоэтических клеток C-kit и CD34. Другая часть трансплантированных клеток выявляется среди клеток эпидермиса, волосяных фолликулов, эндотелия сосудов и дермы. Изучение экспрессии PCNA показало, что при применении трансфицированных клеток, процессы пролиферации завершаются быстрее по сравнению с применением нативных клеток.

Полученные данные позволили предложить следующие выводы: 1) мононуклеарные клетки пуповинной крови могут быть использованы для оптимизации регенерации ран кожи; 2) трансфицирование трансплантируемых мононуклеарных клеток пуповинной крови генами VEGF и FGF2 ускоряет процессы регенерации кожных ран.

Ключевые слова: кожная рана, регенерация, трансфекция, гемопоэтические стволовые клетки, мононуклеарные клетки, пуповинная кровь, двухкассетная экспрессионная плаزمида, VEGF, FGF2.

Регенерация ран кожи была и остается предметом многих экспериментальных исследований, актуальность которых обусловлена большим числом пациентов с острыми и хроническими механическими, термическими, химическими, аутоиммунными повреждениями кожного покрова. В классической работе Л.Б. Берлина показано, что регенерация эпидермиса млекопитающих и человека всегда сопровождается пролиферацией жизнеспособного эпителия придатков кожи, в первую очередь клеток волосяных фолликулов. В процессе регенерации элементы наружного волосяного влагалища и протоков потовых желез образуют многослойные тяжи, постепенно смещающиеся на поверхность кожи и превращающиеся в поверхностный эпителий [1]. Дальнейшие работы развили теорию стволовых клеток и выявили их в составе базального слоя эпидермиса, волосяных

There were proposed several methods for stimulation of skin wound repair over the last few decades. The most perspective among them are gene and stem cell therapy. In our experiments we combined both approaches by application of human cord blood mononuclear cells (hUCB-MC) transfected with pBud-VEGF165-FGF2 plasmid to enhance healing of full thickness skin wounds in rats. Dual expression cassette plasmid pBud-VEGF165-FGF2 encodes both VEGF and FGF2 therapeutic genes, expressing pro-angiogenic growth factors. Our results showed that in 2 weeks after transplantation some transplanted cells still retain expression of stem cell and hematopoietic markers C-kit and CD34. Other transplanted cells could be found among keratinocytes, hair follicle cells, endothelial cells and in derma. Study of PCNA expression revealed that application of transfected cells terminate proliferative processes in regenerating wound earlier than application of untransfected cells.

We concluded that: 1) hUCB-MC can be used for treatment of skin wounds; 2) transfection of hUCB-MC with VEGF and FGF2 genes enhances regeneration of skin wounds.

Key words: skin wound, regeneration, transfection, haematopoietic stem cell, mononuclear cells, cord blood, dual cassette expression plasmids, VEGF, FGF2.

фолликулов человека, а у животных — базальном слое эпидермиса и в бугорках наружных волосяных влагалищ, расположенных у основания волосяной воронки под устьем выводных протоков сальных желез [2]. Современное представление о регенерации кожи, помимо пролиферации стволовых клеток, включает понимание миграции клеток, накопления внеклеточного матрикса, роста новых сосудов и последующего ремоделирования ткани [3, 4].

Особо тяжелые формы поражения кожи, либо генетические заболевания, такие как врожденный буллезный эпидермолиз, требуют поиска альтернативных подходов в лечении ран [5]. На сегодняшний день активно изучаются альтернативные клеточные источники регенерации тканей кожи — как естественные, так и получаемые с терапевтическими целями: клетки костного мозга [6], пуповинной крови [7],

жировой ткани [8], эпителия кожи и волосяных фолликулов [9, 10]. Также активно ведутся исследования по трансфекции клеток, предназначенных для трансплантации в кожные раны, генами цитокинов и факторов роста, вовлеченных в процесс репаративной регенерации [11–16].

Целью нашей работы стало изучение трансплантации трансфицированных генами VEGF и FGF2 гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови при регенерации кожных ран у крыс.

Материал и методы

Пуповинная кровь была забрана специально обученным персоналом роддома, по инструкции Банка стволовых клеток Казанского медицинского университета (лицензия №ФС-16-01-000895 от 20.04.2011), после подписания добровольного информированного согласия. Мононуклеарную фракцию пуповинной крови человека выделяли посредством центрифугирования в градиенте плотности фиколла по известной методике [17]. Подсчет количества и определение жизнеспособности ядродержащих клеток осуществляли после окрашивания трипановым синим. Во всех полученных образцах количество жизнеспособных клеток было не менее 97%. Клетки трансфицировали плазмидой rBud-VEGF165-FGF2 при помощи метода электропарации, как описано ране А. Rizvanov и соавт. (2011). Контролем служили клетки трансфицированные rBud-EGFP [18]. После трансфекции клетки инкубировали в течение 24 часов в полноценной среде RPMI. Увеличение экспрессии мРНК клонированных генов подтверждали в ходе ПЦР в режиме реального времени (результаты не представлены).

Исследование проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 225–250 г ($n = 10$). Под эфирным наркозом животным на нижней части спины удаляли шерсть, кожу обрабатывали 70% этанолом и ножницами наносили полнокожную рану диаметром 10 мм. День нанесения ран считали нулевым днем эксперимента. Через сутки животным экспериментальной группы по периферии кожной раны проводили инъекцию 2×10^6 модифицированных мононуклеарных клеток в гиподермальную часть кожи, животным контрольной группы – инъецировали 2×10^6 нетрансфицированных мононуклеарных клеток пуповинной крови человека. Из эксперимента животных выводили через 2 нед. после введения клеток, участок кожной раны помещали в 10% нейтральный формалин на 0,2 М фосфатном буфере (рН = 7,4) на 24 ч для фиксации и заливали в парафин по стандартной методике. Срезы окрашивали иммуногистохимически коммерческими антителами к HLA-ABC (клон W6/32, 1:100, Dako, Дания), HNA (ядерный антиген клеток человека, клон 235-1, 1:100, Millipore, США), C-kit (рецептор к фактору стволовых клеток, клон T595, 1:400, Novocastra, Великобритания), PCNA (ядерный антиген пролиферирующих клеток, клон PC10, 1:100, Dako, Дания), CD 31 (клон 1A10, 1:20, Великобритания), CD144 (клон 36B5, 1:100, Novocastra, Великобритания), WF (фактор фон Виллебранда, клон NCH-38, 1:50, Dako, Дания), CD 34 (клон QBEnd/10, 1:75, Novocastra, Великобритания). Иммуногистохимическое окрашивание было проведено при помощи визуализационной системы Novolink фирмы Novocastra (Великобритания).

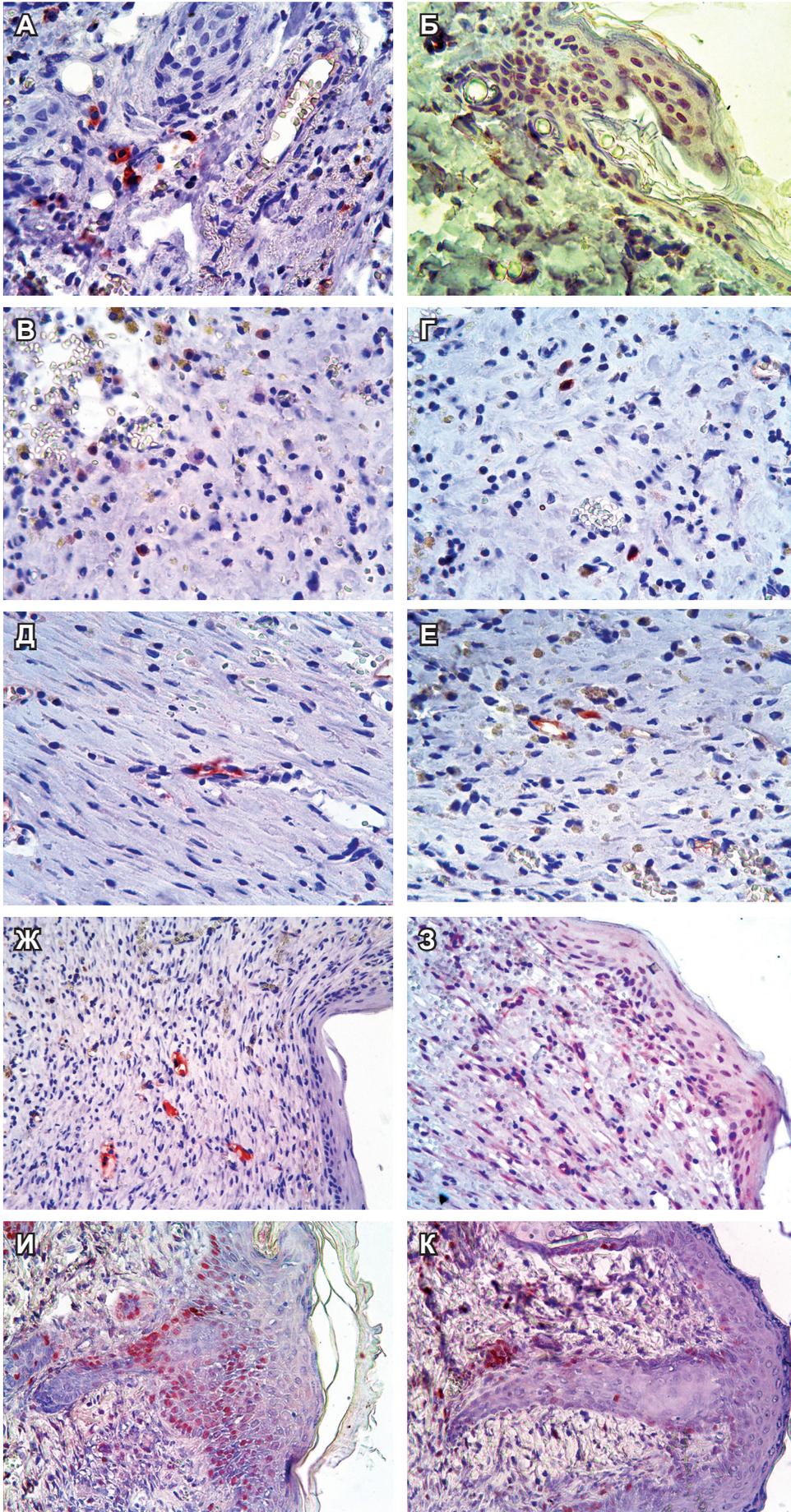
Контроль специфичности иммуногистохимической реакции проводили путём замены первичных АТ неиммунной сывороткой мыши или кролика, а также путём исключения из реакции первичных АТ.

Морфометрическое исследование содержания пролиферирующих кератиноцитов проводили при помощи морфометрической окулярной сетки при увеличении $\times 400$ на микроскопе Leica DM 1000 (Германия). Статистический анализ проводили при помощи пакета Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Маркер клеток человека HLA-ABC, который является антигеном главного комплекса гистосовместимости, определялся среди клеток ретикулярного слоя дермы как контрольной, так и экспериментальной группы (рис. А). Паттерн экспрессии во всех клетках был цитоплазматическим, уровень экспрессии варьировал от низкого до среднего. Исследование HNA - второго маркера клеток человека, примененного в нашем исследовании, позволило выявить HNA-позитивные клетки среди клеток эпидермиса и волосяных фолликул (рис. Б). Таким образом, можно утверждать, что гемопоэтические стволовые клетки пуповинной крови способны участвовать в регенерации ран кожи *in vivo*. Наши результаты подтверждают результаты исследования L.P. Kamolz и соавт. (2006), в которой была показана способность клеток пуповинной крови дифференцироваться в кератиноциты *in vitro* [7].

Исследование экспрессии C-kit выявило наличие множества C-kit-позитивных клеток в дерме обоих групп животных. Клетки по морфологии, как правило, напоминали лимфоциты, они имели крупные ядра с узким ободком иммуно-позитивной цитоплазмы (рис. В). Можно предположить, что мононуклеары пуповинной крови человека через 2 нед. после трансплантации сохраняют экспрессию маркера стволовых клеток – C-kit. Данное предположение подтверждается изучением экспрессии маркера гемопоэтических стволовых клеток CD34, которое выявило наличие сходных по морфологии CD34-позитивных клеток в дерме регенерирующих ран (рис. Г). Кроме этого CD34 также является маркером эндотелиальных клеток, и мы обнаружили, что клетки стенки некоторых капилляров дермы давали положительную реакцию с антителами к CD34 (рис. Д). Окрашивание CD34 только части капилляров может быть объяснено тем, что моноклональные антитела к CD34 иммунореактивны только к молекуле CD34 человека и по спецификации фирмы производителя не имеют кросс-реактивности к молекуле CD34 крыс. В этой связи нельзя исключить, что трансплантированные мононуклеары пуповинной крови в данных условиях способны к дифференцировке в эндотелиальном направлении *in vivo*. В предыдущих исследованиях нами уже были выявлены ангиогенные потенции клеток пуповинной крови на модели бокового амиотрофического склероза [18]. Изучение других эндотелиальных маркеров, таких как WF (рис. Е), CD31 (рис. Ж) и CD144 (рис. З) также выявило наличие иммунопозитивных капилляров. Следует также отметить, что при изучении CD144 мы выявили его экспрессию не только в эндотелиоцитах, но и в клетках волосяных фолликул, фибробластах и единичные мононуклеарных клетках.



Рана кожи крыс
через 2 нед. после
повреждения и лечения;
иммуногистохимические
реакции с антителами:
А – к HLA-ABC,
экспериментальная группа;
Б – к HNA,
экспериментальная группа;
В – к C-kit,
экспериментальная группа;
Г – к CD34, контрольная
группа;
Д – к CD34, контрольная
группа;
Е – к WF,
экспериментальная группа;
Ж – к CD31, контрольная
группа;
З – к CD144,
экспериментальная группа;
И – к PCNA, контрольная
группа;
К – к PCNA,
экспериментальная группа.
Докраска: гематоксилин.
Ув. ×400

Исследование PCNA выявило пролиферацию среди кератиноцитов эпидермиса и волосяных фолликул, клеток дермы, эндотелия сосудов. Морфометрическое исследование процентного содержания пролиферирующих кератиноцитов показало, что в экспериментальной группе экспрессия PCNA была достоверно ($p < 0,05$) ниже ($19,3 \pm 1,6\%$), чем в контрольной группе ($28,7 \pm 2,1\%$). Данные результаты указывают на то, что через 2 нед. после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови при полнослойных ранах пролиферация кератиноцитов достигает физиологических значений — $20,8 \pm 1,6\%$ [19], а в контрольной группе — сохраняется на высоком уровне, что говорит о незавершенности репаративной регенерации. Таким образом, трансфекция трансплантируемых клеток генами VEGF и FGF2 ускоряет регенерацию ран кожи. Более того, в наших исследованиях была показана эффективность плазмидной конструкции pBud-VEGF165-FGF2 в аспекте прямой генной терапии при лечении пациентов с хронической ишемией нижних конечностей [20] и трофической язвой пяточной области [21].

ЛИТЕРАТУРА:

1. Берлин Л.Б. Морфология кожи после ожогов и свободной пересадки. Л.: Медицина, 1966: 222.
2. Niemann C., Watt F.M. Designer skin: lineage commitment in postnatal epidermis. *Trends Cell Biol.* 2002; 12 (4): 185–92.
3. Singer A.J., Clark R.A. Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.* 1999; 341 (10): 738–46.
4. Wu Y., Chen L., Scott P.G., Tredget E.E. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells.* 2007; 25 (10): 2648–59.
5. Tolar J., Blazar B.R., Wagner J.E. Concise Review: Transplantation of Human Hematopoietic Cells for Extracellular Matrix Protein Deficiency in Epidermolysis Bullosa. *Stem Cells.* 2011; 29: 900–6.
6. Fathke C., Wilson L., Hutter J. et al. Contribution of bone marrow-derived cells to skin: collagen deposition and wound repair. *Stem Cells* 2004; 22 (5): 812–22.
7. Kamolz L.P., Kolbus A., Wick N. et al. Cultured human epithelium: human umbilical cord blood stem cells differentiate into keratinocytes under in vitro conditions. *Burns* 2006; 32 (1): 16–9.
8. Kim W.S., Park B.S., Sung J.H. et al. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.* 2007; 48 (1): 15–24.
9. Roh C., Lyle S. Cutaneous stem cells and wound healing. *Pediatr. Res.* 2006; 59 (4, Pt. 2): 100R–3R.
10. Oshima H., Rochat A., Kedzia C. et al. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell* 2001; 104 (2): 233–45.
11. Sprugel K.H., McPherson J.M., Clowes A.W., Ross R. Effects of growth factors in vivo. I. Cell ingrowth into porous subcutaneous chambers. *Am. J. Pathol.* 1987; 129 (3): 601–13.
12. Lynch S.E., Nixon J.C., Colvin R.B., Antoniades H.N. Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors. *PNAS USA* 1987; 84 (21): 7696–700.
13. Jeschke M.G., Klein D. Liposomal gene transfer of multiple genes is more effective than gene transfer of a single gene. *Gene Ther.* 2004; 11 (10): 847–55.
14. Mathor M.B., Ferrari G., Dellambra E. et al. Clonal analysis of stably transduced human epidermal stem cells in culture. *PNAS USA* 1996; 93 (19): 10371–6.
15. Hachiya A., Sriwiriyanont P., Patel A. et al. Gene transfer in human skin with different pseudotyped HIV-based vectors. *Gene Ther.* 2007; 14 (8): 648–56.
16. Pereira C.T. et al. Scar trek: follicular frontiers in skin replacement therapy. *Genet. Mol. Res.* 2007; 6 (1): 243–9.
17. Rizvanov A.A., Kiyasov A.P., Gazizov I.M. et al. Human umbilical cord blood cells transfected with VEGF, L1CAM do not differentiate into neurons but transform into vascular endothelial cells and secrete neuro-trophic factors to support neuro-genesis — a novel approach in stem cell therapy. *Neurochemistry International* 2008; 53: 389–394.
18. Rizvanov A.A., Guseva D.S., Salafutdinov I.I. et al. Genetically modified human umbilical cord blood cells expressing vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor 2 differentiate into glial cells after transplantation into amyotrophic lateral sclerosis transgenic mice. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 2011; 236 (1): 91–8.
19. Харин Г.М. Использование современных технологий в изучении посттравматической регенерации кожи. *ПЭМ* 2004; 16 (4): 11–3.
20. Плотников М.В., Ризванов А.А., Масгутов Р.Ф. и др. Первые результаты клинического применения прямой генной терапии VEGF и bFGF при лечении пациентов с хронической ишемией нижних конечностей. *Практическая медицина* 2013; 2 (1-2): 123–5.
21. Муллин Р.И., Масгутов Р.Ф., Салафутдинов И.И. Комбинированное лечение трофической язвы пяточной области с использованием вакуум-терапии в сочетании с прямой генной терапией: клинический случай. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2013; 8 (3): 125–8.

Поступила: 22.07.2014