

**Э.Р. Санатова, Л.Р. Галиева, Е.В. Мартынова, М.Н. Журавлева,
Я.О. Мухамедшина, А.А. Ризванов**

**ИЗМЕНЕНИЯ В ЦИТОКИНОВОМ ПРОФИЛЕ СЫВОРОТКИ
КРОВИ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИ
МОДИФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК МИКРОГЛИИ В ОБЛАСТЬ
ТРАВМАТИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ СПИННОГО МОЗГА КРЫСЫ**

OpenLab Генные и клеточные технологии
Казанский (Приволжский) федеральный университет
Казань, Российская Федерация

**E.R. Sanatova, L.R. Galieva, E.V. Martynova, M.N. Zhuravleva,
Y.O. Mukhamedshina, A.A. Rizvanov**

**CHANGES IN SERUM CYTOKINE PROFILE AFTER
TRANSPLANTATION OF GENETICALLY MODIFIED MICROGLIA INTO
AREA OF SPINAL CORD INJURY IN RATS**

OpenLab gene and cell technology
Kazan (Volga region) federal university
Kazan, Russian Federation

Контактный e-mail: elyaelya18@gmail.com

Аннотация. В статье рассмотрены изменения в цитокиновом профиле сыворотки крови животных с травматическим повреждением спинного мозга и трансплантацией генетически модифицированных клеток микроглии. Показано, что генетическая модификация клеток микроглии аденовирусными векторами с генами *egfp* и *gdnf* по-разному влияет на экспрессию цитокинов/хемокинов после их трансплантации в область травматического повреждения спинного мозга крыс.

Annotation. This article describes the changes in serum cytokine profile of animals with traumatic spinal cord injury and transplantation of genetically modified microglia. It is shown that the genetic modification of the microglia by adenoviral vectors with genes *egfp* and *gdnf* differently influences on the expression of cytokines/chemokines after transplantation these cells in the area of spinal cord injury.

Ключевые слова: травма спинного мозга, клетки микроглии, цитокиновый профиль, глиальный нейротрофический фактор.

Keywords: spinal cord injury, microglia, cytokine profile, glial cell derived neurotrophic factor.

На сегодняшний день результаты лечения пациентов с травматическим повреждением спинного мозга крайне неудовлетворительны и требуют разработки и внедрения новых терапевтических протоколов. Значительную роль в патогенезе вторичного повреждения играют воспалительные процессы и

инфильтрация ткани различными иммунными клетками, которые могут проникать в ткань спинного мозга при нарушении гематоэнцефалического барьера. В месте воспаления возникает иммунологическая дисфункция, причина которой до сих пор неясна. Кроме того, воспалительные процессы приводят к системной реакции и запускают иммунный ответ, потенциально способный вызвать аутоиммунные реакции, которые близко напоминают такие при рассеянном склерозе и поражении ЦНС при системной красной волчанке. При этом вопрос о большей роли позитивного или отрицательного влияния иммунных процессов на регенерацию до сих пор вызывает дискуссии [4].

В связи со сложившейся ситуацией актуальным представляется поиск современных методов борьбы с дегенеративными процессами в ЦНС, основанных на понимании молекулярных механизмов патогенеза данных патологий и направленных на адресную доставку клеток и факторов, обладающих иммуномодулирующим действием и потенциально способных стимулировать нейрорегенерацию. В последнее время наибольший интерес исследователей направлен на клетки микроглии. Для данного типа клеток показана активация при инфекции, ишемии и нейродегенеративных заболеваниях, способность мигрировать в область повреждения и экспрессировать цитокины, иммуномодуляторы и нейротрофины [1]. Микроглия является подклассом глиальных клеток, но в отличие от астроцитов и олигодендроцитов, происходит из моноцитов крови, то есть из клеток иммунной системы. Помимо резкой активации микроглией всех клеточных процессов при повреждении ЦНС, происходит и увеличение интенсивности фагоцитоза, что связывают с возможностью более раннего разрешения первичных травматических процессов в спинном мозге и, следовательно, улучшения долгосрочного функционального результата [6]. Вышеназванные свойства клеток микроглии указывают на перспективность их использования в качестве нового источника для трансплантации при повреждении ЦНС. Однако требуют прицельного изучения изменений в цитокиновом профиле на фоне проводимой клеточной терапии, что позволит установить возможные иммуномодулирующие механизмы микроглии и раскрыть их вклад в нейропротекцию и нейрорегенерацию.

Цель исследования – исследование цитокинового профиля в сыворотке экспериментальных животных с моделью дозированной контузионной травмы спинного мозга на фоне трансплантации генетически модифицированных клеток микроглии.

Материалы и методы исследования

Клетки микроглии получали из коры головного мозга новорожденных крысят (n=20, возраст 3-5 дней) породы Wistar по оптимизированному протоколу [9]. Для этого перед забором ткани осуществляли прижизненную перфузию 4°C раствором DPBS (БиолоТ) с добавлением гепарина натрия (5 ЕД/мл, объем 10 мл). После вскрытия черепной коробки, выделяли кору больших полушарий, предварительно удалив мягкую мозговую оболочку.

Вещество коры тщательно механически гомогенизировали и инкубировали в растворе ферментов (папаин 2 мг/мл, ДНК-аза 50 Ед/мл, диспаза 2,5 Ед/мл (БиолоТ)) в DPBS в течение 15 минут при 37°C. В последующем полученный гомогенат отмывали DPBS, пропускали через нейлоновую сетку (шаг решетки 100 мкм) и осаждали клетки центрифугированием.

Для выделения микроглии из смешанной суспензии клеток использовали метод центрифугирования в прерывистом градиенте плотности Histodenz (Sigma) в 0,9% NaCl при 4°C. После центрифугирования в градиенте плотности фракция клеток микроглии была получена в кольце, расположенном между 20% и 10% Histodenz. Кольцо аккуратно собирали с помощью спинальной иглы и отмывали в DPBS.

В последующем микроглию культивировали на среде DMEM/F12 с добавлением рекомбинантного аденовируса, несущего ген усиленного зеленого флуоресцентного белка (Ad5-EGFP) или глиального нейротрофического фактора (Ad5-GDNF), с MOI 20 в течение 24 часов. Далее клетки тщательно отмывали от среды и вируса центрифугированием.

Дозированную контузионную травму спинного мозга крыс породы Wistar (масса 200-250 г.) проводили на уровне T8 по методу [8]. Сразу после нанесения повреждения крысам опытной группы (n=6) вводили полученные клетки микроглии, трансдуцированные Ad5-GDNF (1 млн в 5 мкл DPBS), в область травмы при помощи гамильтоновского шприца (Sigma). Животным 1-ой контрольной группы (n=6) в том же количестве и в тех же условиях вводили клетки микроглии, трансдуцированные Ad5-EGFP. Крысам 2-ой контрольной группы трансплантацию клеток после травмы спинного мозга не проводили. В течение 7 суток после операции всем экспериментальным животным внутримышечно вводили гентамицин (5 мг/кг) один раз в сутки. Животных содержали в отдельных клетках, со стандартным суточным режимом и свободным доступом к воде и корму. Забор крови для выделения сыворотки и последующего мультиплексного анализа осуществляли непосредственно перед операцией, через 3, 7 и 14 суток после травмы из хвостовой вены.

Мультиплексный анализ по технологии xMAP Luminex проводили с использованием набора RECYMAG65K27 (Millipore), позволяющий проводить одновременный мультиплексный анализ 27 цитокинов хемокинов и интерлейкинов крысы в 50 мкл исследуемого образца. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Origin7 Pro. Статистическую достоверность определяли с помощью дисперсионного анализа one-way Anova.

Результаты исследования и их обсуждение

Исследование цитокинового профиля в сыворотке животных с травмой спинного мозга без трансплантации клеток (2-ая контрольная группа) на разных сроках после травмы показало достоверное изменение уровня: IL-1 β , IL-2, MCP-1, MIP-2, RANTES, IL-5, MIP-1 α , IL-1 α . Значения провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 β , IL-2 и IL-1 α , уменьшалось на 3 и 14 сутки, и

увеличивалось на 7 сутки после повреждения, соответственно. Наиболее значительные изменения с 3 по 14 сутки после травмы происходили в показателях хемокина MIP-1 α , который является решающим фактором для возникновения иммунных реакций при воспалении и инфекции [7]. Так уровень MIP-1 α увеличивался к 7 суткам после травмы более чем в 32 раза по отношению к аналогичному показателю до операции. На более раннем сроке после травмы (3 сутки) обнаружено увеличение в 2,5 раза хемокина MCP-1, который участвует в нейровоспалительных процессах при различных заболеваниях ЦНС, сопровождающихся нейрональной дегенерацией [2].

При трансплантации клеток микроглии, несущих не терапевтический ген EGFP, были выявлены изменения в цитокиновом профиле по следующим цитокинам/хемокинам: Eotaxin, GM-CSF, IL-13, IL-10, MCP-1, GRO/KC/CINC-1, Fractalkine, MIP-1 α , LIX, IL-5, MIP-2, TNF α , IL-17A, IL-1 β , IL-2, IL-18, RANTES. Полученные результаты свидетельствуют о значительном влиянии трансплантации клеток микроглии с геном EGFP на цитокиновый профиль в сыворотке животных. Это может быть связано с возможностью экспрессии микроглией таких медиаторов воспаления, как MCP-1, MIP-1 α , TNF- α , IL-1 β , значение которых было найдено увеличенным на исследуемых сроках после операции [9]. Несмотря на высокие уровни провоспалительных цитокинов/хемокинов, были найдены повышенные уровни противовоспалительных интерлейкинов, таких как IL-13 и IL-10 на 7 и 3-7 сутки после травмы и введения клеток, соответственно. В данной группе было также показано увеличение уровня IL-18 (противовоспалительный цитокин) на 7 и 14 сутки, который приводит к образованию GM-CSF, увеличение которого также обнаружено на 7 сутки.

При трансплантации клеток микроглии, несущих терапевтический ген GDNF, были выявлены изменения в цитокиновом профиле лишь 5 цитокинов/хемокинов из 27 выявляемых: IL-18, LIX, Fractalkine, IL12p70, IL-1 α . Установлено, что IL-18 и LIX ведут себя одинаково при трансплантации генетически модифицированных *egfp* и *gdnf* клеток микроглии. В то время как уровень Fractalkine реагирует по-разному в указанных группах. Так в опытной группе значение Fractalkine, который играет важную роль в миграции микроглии [5], уменьшается на 7 сутки, а в 1-ой контрольной группе увеличивается на всех исследуемых сроках. По всей видимости, обнаруженная разница связана с влиянием GDNF на посттравматические процессы и поведение клеток микроглии. Уровень IL12p70 (играет ключевую роль в индукции иммунного ответа [3]) в группе с трансплантацией микроглии с геном GDNF обнаружен сниженным на 14 сутки после операции, в то время как в других экспериментальных группах изменений со стороны данного цитокина обнаружено не было. Полученные результаты свидетельствуют о том, что генетическая модификация клеток микроглии терапевтическим трансгеном GDNF изменяет экспрессию цитокинов собственно данными клетками и влияет на микроокружение, про- и противовоспалительные механизмы после травмы

спинного мозга. Для раскрытия механизмов лежащих в основе указанных процессов необходимы дальнейшие исследования и проведение мультиплексного анализа культуры клеток микроглии на разных сроках культивирования.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ (МК-4020.2015.7).

Выводы:

1. Травма спинного мозга приводит к увеличению уровня провоспалительных цитокинов (IL-1 α , IL-2, MIP-1 α , MCP-1, IL-1 β) в сыворотке животных в течение первых двух недель после повреждения;

2. Генетическая модификация клеток микроглии аденовирусными векторами с генами *egfp* и *gdnf* по-разному влияет на цитокиновый профиль в сыворотке после их трансплантации в область травматического повреждения спинного мозга крыс.

Литература:

1. Ekdahl C.T. Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia / C.T. Ekdahl, Z. Kokaia, O. Lindvall // *Neuroscience*. – 2009. – P. 1021-1029.

2. Gerard C. Chemokines and disease / C. Gerard, B.J. Rollins // *Nature Immunology*. – 2001. – P. 10-15.

3. Germann T. Interleukin-12. *Int. Arch* / T. Germann, E. Rude // *Allergy Immunol.* – 1995. – P.10-12.

4. Laliberte A.M. The immunological response to spinal cord injury: Helpful or harmful? / A.M. Laliberte, M.G. Fehlings // *Exp Neurol*. – 2013. – P.282-285.

5. Maciejewski-Lenoir D. Characterization of fractalkine in rat brain cells: migratory and activation signals for CX3CR-1-expressing microglia. *Journal of Immunology*. – 1950. – P.1628-1635.

6. Redondo-Castro E. Phagocytic microglial phenotype induced by glibenclamide improves functional recovery but worsens hyperalgesia after spinal cord injury in adult rats. *European Journal of Neuroscience*. – 2013. – P. 3786-3798.

7. Ren M. Polymerization of MIP-1 chemokine (CCL3 and CCL4) and clearance of MIP-1 by insulin-degrading enzyme. *EMBO J*. – 2010. – P. 39-66.

8. Scheff S.W. Experimental modeling of spinal cord injury: characterization of a force-defined injury device. *J Neurotrauma*. – 2003. – P.179-193.

9. Wood P. *Neuroinflammation: Mechanisms and Management*. Springer Science & Business Media. – 2002.

УДК 57.021

Д.А. Сичкар, В.В. Мелехин, О.Г. Макеев