

РАЗРАБОТКА И АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК СО СВЕРХЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНОВ НЕХА И НЕХВ ДЛЯ ТЕРАПИИ БОЛЕЗНИ ТЕЯ-САКСА

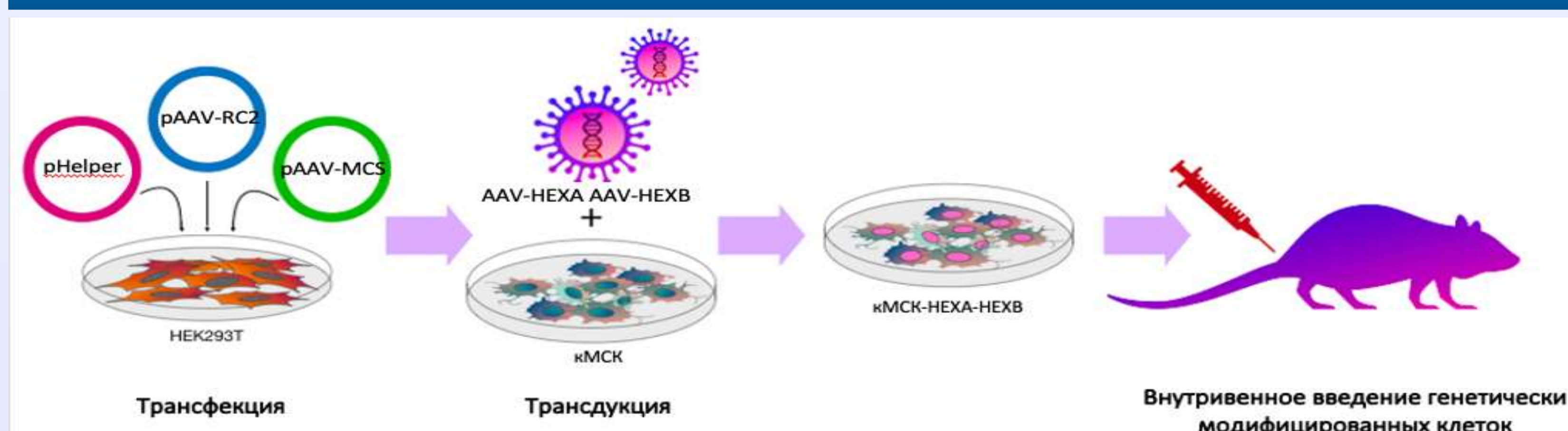
Шаймарданова А.А.

ФГАОУ ВО "Казанский (Приволжский) федеральный университет», aliceshaimardanova@mail.ru

1. Введение

Болезнь Тея-Сакса (БТС) является лизосомной болезнью накопления, которая вызвана различными мутациями в гене НЕХА, кодирующим α -субъединицу фермента β гексозаминидазы А (НехА). Данный фермент осуществляет специфическое расщепление GM2 ганглиозидов (GM2), входящих в состав цитоплазматической мембраны клеток. Нарушение работы фермента НехА приводит к накоплению GM2 в различных клетках и тканях организма. В основном поражается нервная ткань, вследствие высокого распространения GM2 в нейронах. Накопление GM2 приводит к инвалидизации и смерти пациентов. БТС характеризуется тяжелой нейродегенерацией, возникновением воспалительного ответа, задержкой психического и физического развития. На сегодняшний день заболевание остается неизлечимым.

2. Дизайн эксперимента



3. Результаты

3.1 Генетическая модификация HEK293T

На основе рAAV-HEXA и рAAV-HEXB были получены адено-ассоциированные вирусные векторы AAV-HEXA и AAV-HEXB. В образцах кондиционированной среды HEK293T, трансфицированных плазмидами рAAV-HEXA или рAAV-HEXB, активность НехА выше более чем в 20 раз (рисунок 1А). В кондиционированной среде мезенхимных стволовых клеток, трансдуцированных AAV-HEXA и AAV-HEXB (МСК-HEXA-HEXB) активность НехА выше в 5 раз, сравнительно с контрольными образцами (рисунок 1В). Вестерн-блот анализ показал наличие выраженных полос, соответствующих ожидаемым молекулярным массам α и β субъединиц фермента НехА в трансфицированных HEK293T и МСК-HEXA-HEXB

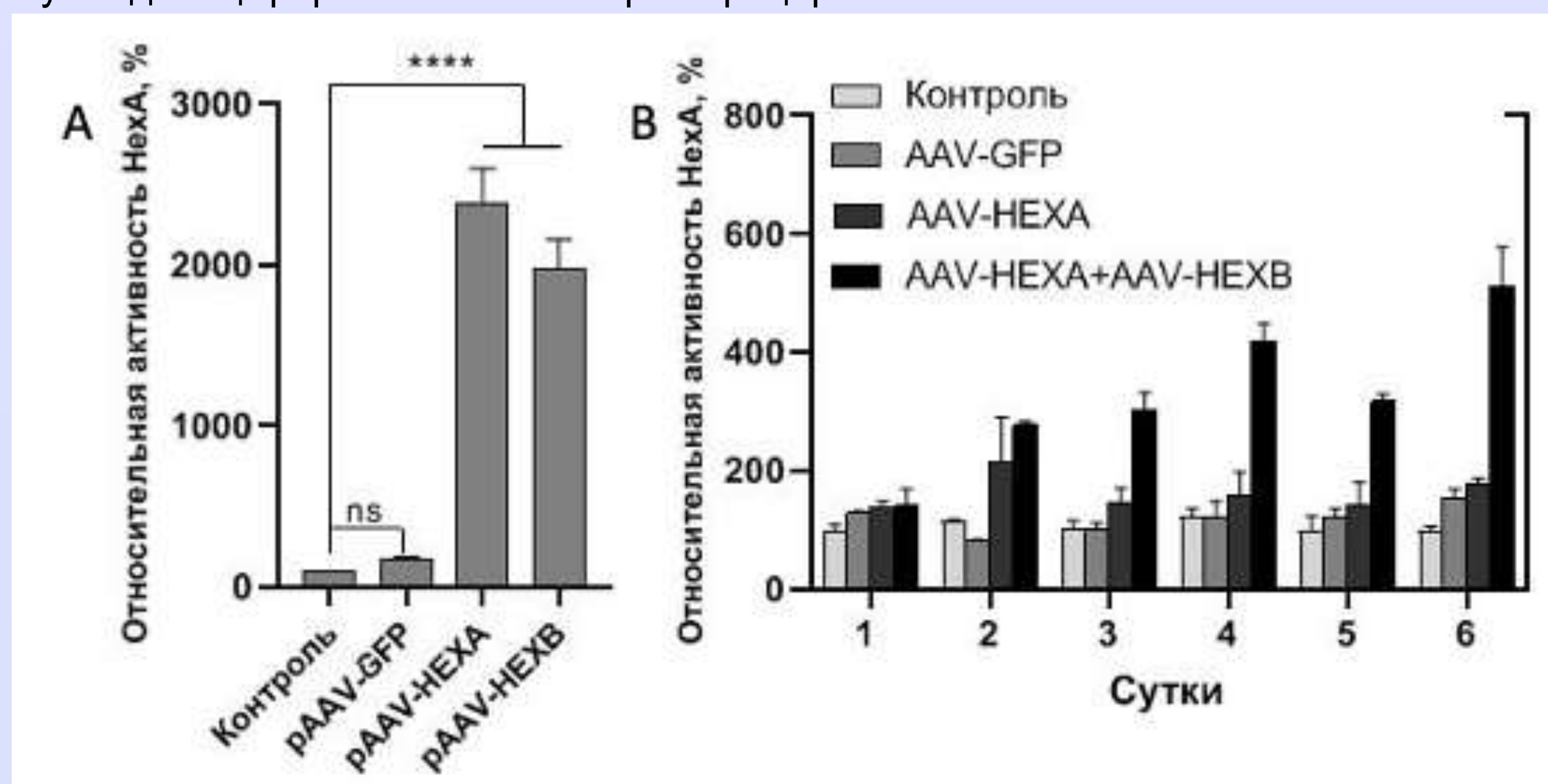


Рис. 1. А – Активность НехА в кондиционированной среде HEK293, трансфицированных рAAV-HEXA или рAAV-HEXB. В – Активность НехА в кондиционированной среде МСК-HEXA-HEXB.

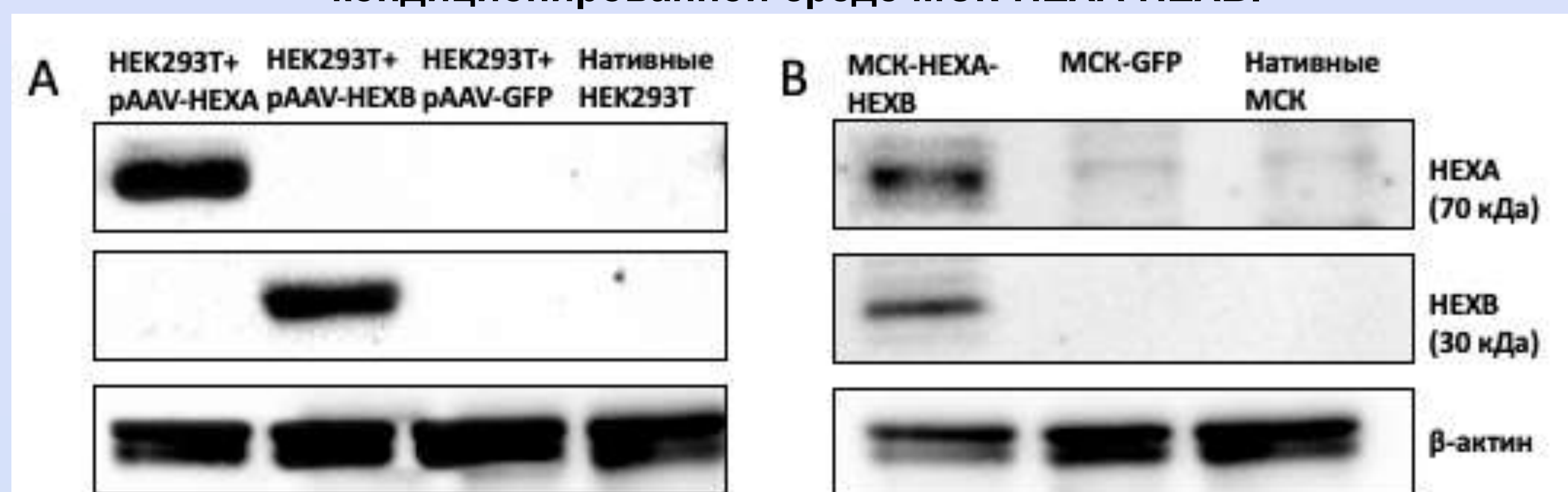


Рис. 2. Вестерн-блот анализ экспрессии α -субъединицы НехА (продукт гена НЕХА) и β -субъединицы НехА (продукт гена НЕХВ) в: А – HEK293T, трансфицированных рAAV-HEXA или рAAV-HEXB, В – МСК, трансдуцированных AAV-HEXA и AAV-HEXB. В качестве контроля использовались векторные конструкции, кодирующие зеленый флуоресцентный белок.

3.2 Analysis of HexA enzyme activity

Показано, что после введения МСК-HEXA-HEXB, в плазме крови крыс на 21 сутки активность НехА увеличивается примерно в 1,5 раза (рисунок 3). Введение МСК-HEXA-HEXB не влияет на клеточность (процент живых клеток) в органах крыс (рисунок 4А), лейкоформулу (рисунок 4В) и цитокиновый профиль сыворотки крови крыс, сравнительно с контрольными группами.

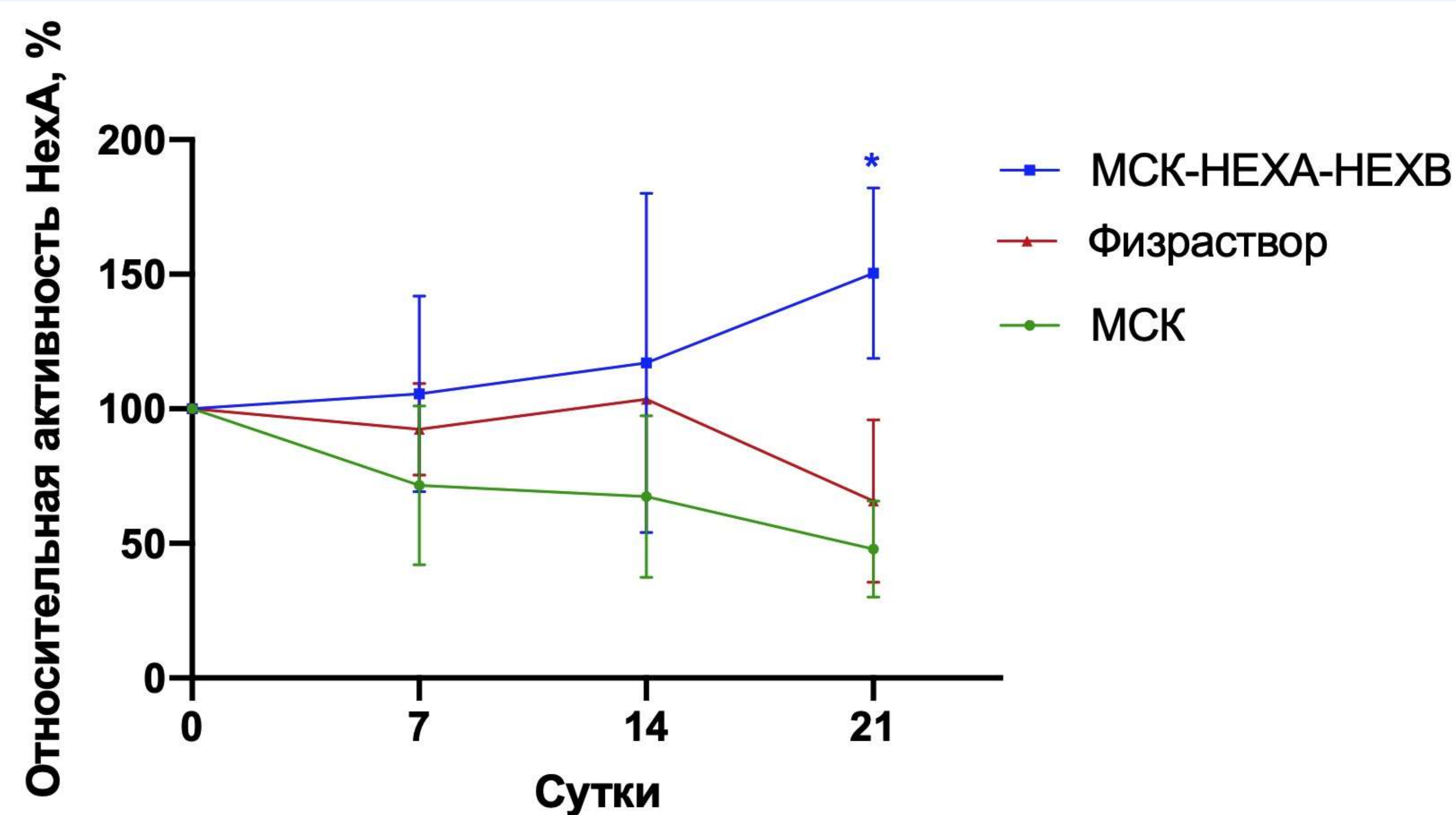


Рис. 3. Динамика активности фермента в плазме крови крыс после введения трансдуцированных МСК, плазму забирали до введения клеток (0 точка) и далее с интервалом в 7 дней

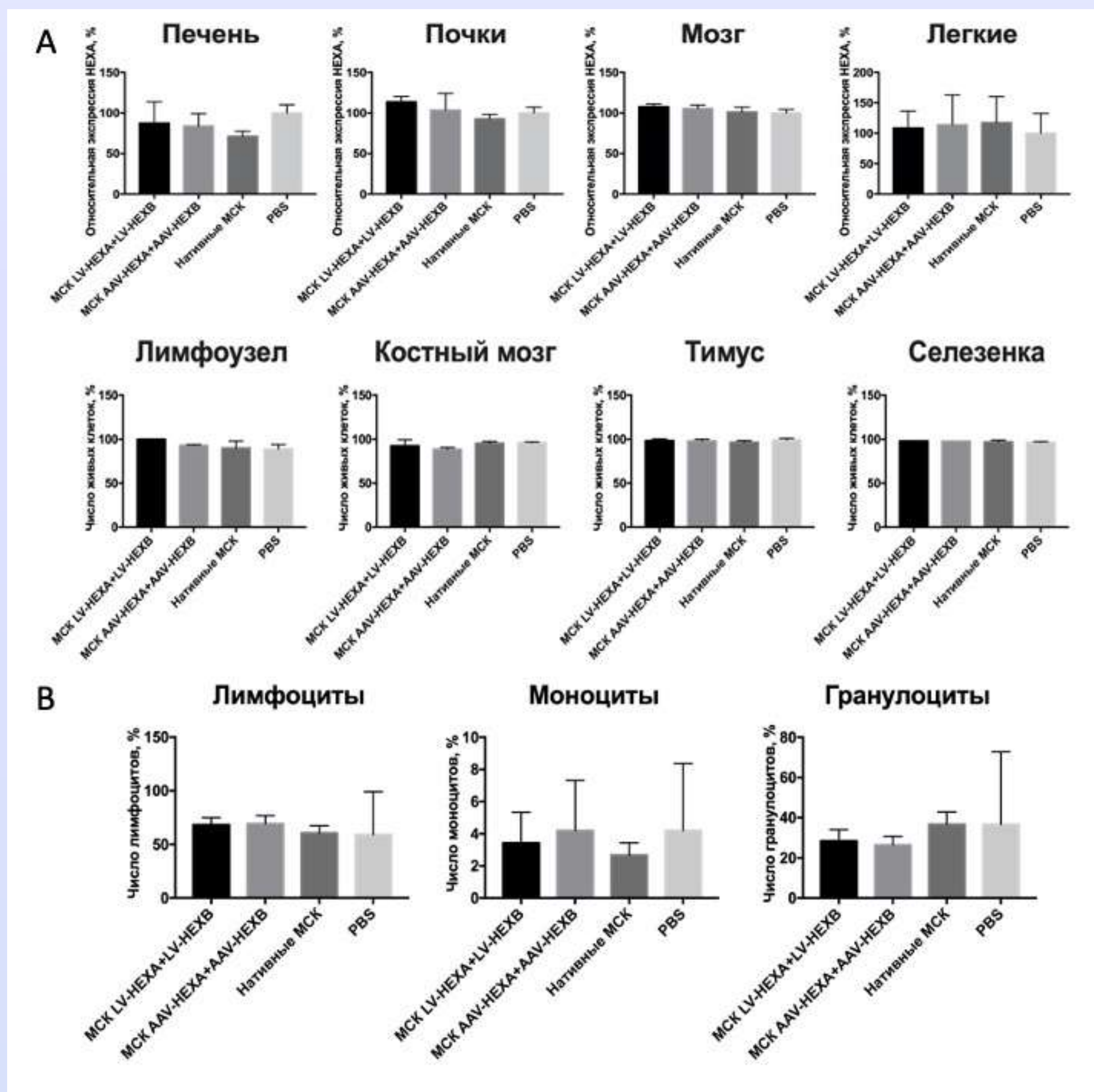


Рис. 4. А – Отношение живых и мертвых клеток в органах крыс через 4 недели после введения МСК-HEXA-HEXB. В – лейкоформула крыс через 4 недели после введения МСК-HEXA-HEXB. Контрольным группам крыс вводили нативные МСК или физиологический раствор.

4. Заключение

Таким образом, на клеточных культурах и на лабораторных животных мы показали, что МСК-HEXA-HEXB экспрессируют функционально активный фермент НехА, их внутривенное введение не вызывает иммунный ответ у животных. Эти данные дают основание предполагать, что данный генно-клеточный препарат является функциональным и безопасным, а также может рассматриваться в качестве кандидата для лечения БТС, однако для подтверждения терапевтического потенциала необходимы исследования на модельных животных.