

ПРИМЕНЕНИЕ ВИРУСНОГО ВЕКТОРА AAV-SYN-BDNF-EGFP КАК НЕЙРОПРОТЕКТИВНОГО АГЕНТА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ГИПОКСИИ *in vitro*

DOI: 10.17691/stm2018.10.2.05

УДК 577.212:616.831

Поступила 19.01.2018 г.



Е.В. Митрошина, к.б.н., доцент кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины¹; старший научный сотрудник лаборатории по разработке методов нейропротекции Центра трансляционных технологий¹; старший научный сотрудник отдела молекулярно-клеточных технологий ЦНИЛ²;

Е.А. Епифанова, младший научный сотрудник лаборатории генетики развития мозга НИИ нейронаук¹;

Т.А. Мищенко, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории по разработке методов нейропротекции Центра трансляционных технологий¹; старший научный сотрудник отдела молекулярно-клеточных технологий ЦНИЛ²;

Р.С. Ярков, магистр 1-го года обучения кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины¹;

А.А. Бабаев, к.б.н., доцент кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины¹; старший научный сотрудник лаборатории генетики развития мозга НИИ нейронаук¹;

М.В. Ведунова, д.б.н., ведущий научный сотрудник, директор Института биологии и биомедицины¹

¹Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23;

²Приволжский исследовательский медицинский университет, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1

Цель исследования — разработать и изучить влияние вирусного вектора AAV-Syn-BDNF-EGFP на жизнеспособность первичных культур клеток гиппокампа в норме и при моделировании одного из факторов ишемии (гипоксии) *in vitro*.

Материалы и методы. Для разработки вирусного конструктора были использованы плазмиды AAV-Syn-EGFP, pDP5, DJvector, pHelper. Тестирование разработанного вектора выполняли на культуре диссоциированных клеток гиппокампа, полученных от эмбрионов мышей линии C57BL/6 18-го дня гестации. Инфицирование первичных культур разработанным вирусным конструктором проводили на 7-е сутки культивирования (7 DIV). Оценивали жизнеспособность и спонтанную биоэлектрическую активность клеток в культуре на 1, 3 и 7-е сутки после инфицирования. На 7-е сутки после инфицирования (14 DIV) также проводили анализ спонтанной кальциевой активности диссоциированных культур с помощью функционального кальциевого имиджинга. Для оценки нейропротекторных свойств разработанного конструктора на 14-й день (14 DIV) культивирования выполняли моделирование гипоксии *in vitro*.

Результаты. Разработан аденоассоциированный вирусный вектор AAV-Syn-BDNF-EGFP, несущий последовательность гена *BDNF* и предназначенный для увеличения экспрессии нейротрофического фактора головного мозга. Показано, что применение данного вектора для инфицирования первичных культур клеток гиппокампа мыши приводит к увеличению продукции *BDNF* клетками культуры. Разработанный вирусный вектор не оказывает негативного влияния на жизнеспособность и функциональную активность нейронных сетей первичных культур гиппокампа. Продемонстрированы нейропротекторные свойства гиперэкспрессии *BDNF* при моделировании гипоксии *in vitro*.

Заключение. Разработанный вирус, содержащий последовательность гена *BDNF*, повышает экспрессию *BDNF* нейронами головного мозга, что позволяет снизить гибель нервных клеток при моделировании гипоксии *in vitro*.

Ключевые слова: генно-инженерные конструкторы; аденоассоциированные вирусные векторы; нейротрофический фактор головного мозга; *BDNF*; ишемия головного мозга; гипоксия головного мозга; первичные культуры клеток гиппокампа; нейропротекция.

Как цитировать: Mitroshina E.V., Epifanova E.A., Mishchenko T.A., Yarkov R.S., Babaev A.A., Vedunova M.V. Application of the AAV-Syn-BDNF-EGFP virus vector as a neuroprotective agent in modeling hypoxia *in vitro*. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2018; 10(2): 47–58, <https://doi.org/10.17691/stm2018.10.2.05>

Для контактов: Митрошина Елена Владимировна, e-mail: helenmitroshina@gmail.com

Application of the AAV-Syn-BDNF-EGFP Virus Vector as a Neuroprotective Agent in Modeling Hypoxia *in vitro*

E.V. Mitroshina, PhD, Associate Professor, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine¹; Senior Researcher, Laboratory for Neuroprotection Methods Development, Center for Translational Technologies¹; Senior Researcher, Molecular Cellular Technologies Department, Central Scientific Research Laboratory²;

E.A. Epifanova, Junior Researcher, Brain Development Genetics Laboratory, Institute of Neuroscience¹;

T.A. Mishchenko, PhD, Senior Researcher, Laboratory for Neuroprotection Methods Development, Center for Translational Technologies¹; Senior Researcher, Molecular Cellular Technologies Department, Central Scientific Research Laboratory²;

R.S. Yarkov, MSc, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine¹;

A.A. Babaev, PhD, Associate Professor, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine¹; Senior Researcher, Brain Development Genetics Laboratory, Institute of Neuroscience¹;

M.V. Vedunova, DSc, Leading Researcher, Institute of Biology and Biomedicine; Director of Institute of Biology and Biomedicine¹

¹Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russia;

²Privolzhsky Research Medical University, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia

The aim of the study was to develop the AAV-Syn-BDNF-EGFP virus vector and study its effect on primary cultures in normal conditions and under hypoxia *in vitro*.

Materials and Methods. To produce the virus construct, AAV-Syn-EGFP, pDP5, DJ vector, and pHelper plasmids were used. The developed vector was tested on primary hippocampal cells obtained from C57BL/6 mouse embryos on the embryonic day 18 (E18). Infection of primary cultures with the developed virus construct was carried out on the 7th day of culture development *in vitro* (7 DIV). The cell viability and spontaneous bioelectrical activity of the cultured cells were assessed on days 1, 3, and 7 after infection. On the 7th day after infection (14 DIV), spontaneous calcium activity of dissociated cultures was analyzed using functional calcium imaging. To evaluate the neuroprotective properties of the developed construct, *in vitro* hypoxia modeling was performed on the 14th day (14 DIV) of cultivation.

Results. The AAV-Syn-BDNF-EGFP adeno-associated virus vector carrying the sequence of the *BDNF* gene has been developed to increase this neurotrophin expression. Primary hippocampal cells infected by the vector were found to produce increased amounts of BDNF. The developed virus vector did not adversely affect the viability and functional activity of the neural networks in the primary hippocampal cultures. The BDNF overexpression enhanced the neuroprotective potential of cells subjected to oxygen deficiency.

Conclusion. The developed virus containing the *BDNF* gene sequence increases the endogenous BDNF expression by brain neurons, and thus reduces the death rate of nerve cells in the hypoxia model *in vitro*.

Key words: genetically engineered constructs; adeno-associated virus vectors; brain-derived neurotrophic factor; BDNF; cerebral ischemia; cerebral hypoxia; primary hippocampal cell cultures; neuroprotection.

Введение

Ишемический инсульт головного мозга характеризуется выраженным повреждением функций ЦНС после кратковременной или длительной окклюзии кровеносных сосудов головного мозга. В настоящее время активно ведется поиск эффективных стратегий предотвращения и терапии ишемических повреждений мозга, способов поддержания функциональной активности нейронных сетей. Следует отметить, что ишемическое повреждение головного мозга является многофакторной патологией. Ключевыми повреждающими факторами при нарушении кровоснабжения головного мозга служат гипоксия (кислородная депри-

вация), снижение поступления энергетических субстратов к нервным клеткам (глюкозная депривация) и окислительный стресс.

Показано [1–4], что эффективным подходом для коррекции ишемических повреждений головного мозга является применение нейротрофического фактора головного мозга BDNF. Это — один из ключевых представителей семейства нейротрофинов, который обеспечивает рост и развитие головного мозга в эмбриогенезе, а также образование и поддержание нормального функционирования нейронных сетей в постнатальном периоде [5, 6]. BDNF участвует в модуляции синаптической передачи в гиппокампе и некоторых отделах коры головного мозга [7–10].

Многочисленные работы свидетельствуют о том, что применение экзогенного нейротрофина повышает устойчивость нервных клеток к повреждающему действию факторов ишемии как *in vitro*, так и *in vivo* [11–14]. BDNF снижает гибель нейронов, уменьшает объем очага инсульта, ускоряет восстановление неврологического статуса и когнитивных способностей животных [15, 16]. Еще одной интересной особенностью BDNF является способность поддерживать жизнеспособность нейронов, не входящих в нейронные сети, в раннем онтогенезе. Эта особенность может позволить поддерживать жизнеспособность нейронов, потерявших связи с другими нейронами в результате разрушения нейронных сетей, в постинсультном периоде в течение достаточно длительного времени.

Одно из перспективных направлений современной медицины — разработка биотехнологических методов доставки в организм различных соединений, обладающих нейропротекторным действием, в том числе с помощью вирусных векторов для генной терапии. Это позволяет повысить на продолжительный срок уровень продукции нужного белка, избежать необходимости длительного приема лекарственных препаратов, оказывать воздействие на строго определенный тип клеток. Сейчас активно изучаются возможности применения вирусных векторов, доставляющих ген *BDNF* в нервные клетки, при нейродегенеративных заболеваниях и травмах нервной системы. Например, работами S. Liu с соавт. [17] показано, что применение аденоассоциированного вирусного вектора, несущего ген *BDNF*, стимулирует рост аксонов после травмы спинного мозга. Продемонстрирован положительный эффект применения вирусных векторных систем BDNF при дегенерации нейронов сетчатки [18, 19], атаксии Фридриха [20], болезни Альцгеймера [21]. Однако имеются и данные, свидетельствующие о сложности использования подобных способов доставки. Например, в работе E. Dekeyster с соавт. [22] положительного эффекта — сверхэкспрессии BDNF — при применении вирусной доставки при глаукоме не наблюдалось.

Несмотря на это, инициация экспрессии BDNF с помощью вируса может рассматриваться как новый подход к созданию эффективных методов терапии ишемического инсульта головного мозга. Подобные исследования в мире только начинаются. Известны примеры успешного использования модифицированного вируса AAV-BDNF [23]. При введении его в субвентрикулярную зону взрослым крысам за 14 дней до проведения окклюзии правой средней мозговой артерии показано улучшение восстановления локомоторной функции после инсульта. Этот процесс может быть связан с усилением миграции нейрогенетических клеток у экспериментальных животных.

Цель исследования — разработать и изучить влияние вируса AAV-Syn-BDNF-EGFP на жизнеспособ-

ность первичных культур клеток гиппокампа в норме и при моделировании одного из факторов ишемии (гипоксии) *in vitro*.

Материалы и методы

Плазмиды. Для разработки необходимого вирусного конструкта были использованы плазмиды AAV-Syn-EGFP, pDP5, DJvector, pHelper. AAV-Syn-EGFP — плазида, полученная на основе бактериальной плазмиды pUC19 и несущая последовательности человеческого промотора белка синапсина hSyn, WPRE-энхансера, SV40 polyA сигнальную последовательность, фланкированную ITR-повторами (inverted terminal repeat) из аденоассоциированного вируса серотипа 2 (AAV2). Три остальные плазмиды (pDP5, DJvector, pHelper) представляют собой набор вспомогательных плазмид, необходимых для сборки аденоассоциированного вирусного вектора, которые несут гены *Rep*, *Cap*.

Выделение суммарной РНК. Выделение суммарной РНК из биологических образцов (ткани мозга мыши) для последующей наработки кДНК, кодирующей белок BDNF, проводили по стандартному протоколу с применением реагента Extract RNA («Евроген», Россия).

Полимеразная цепная реакция. При проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) для наработки клонируемых фрагментов гена *BDNF* использовали коммерческий набор реактивов Phusion High-Fidelity PCR Kit, включающий Phusion High-Fidelity ДНК-полимеразу (Thermo Fisher Scientific, США). Преимуществом данной полимеразы является повышенная скорость и точность работы фермента. Для выполнения ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) использовали обратную транскриптазу MMLV («Евроген», Россия).

Плазмидное клонирование. Очистку полученной последовательности BDNF выполняли с помощью коммерческого набора Isolate II PCR and Gel Kit (Biolone, Великобритания) согласно протоколу производителя. Для конструирования плазмиды использовали ферменты фирм Thermo Fisher Scientific (США) и New England Biolabs (США). Рестриктирование клонируемого фрагмента BDNF и плазмиды AAV-Syn-EGFP-kid2 осуществляли рестриктазами EcoRI и BamHI с образованием липких концов (рис. 1). Лигазную смесь в дальнейшем использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* TopTEN.

Трансформация бактериальных клеток *E. coli* плазмидной ДНК, наработка и выделение плазмидной ДНК. Для трансформации использовали компетентные клетки *E. coli* TopTEN. Бактериальные клетки для проведения трансформации выдерживали на льду 15–20 мин, после чего вносили полученную в результате плазмидного клонирования плазмиду AAV-Syn-BDNF-EGFP в объеме 1/10 от объема клеток и смесь инкубировали 20 мин на льду. Затем клетки подвергали тепловому шоку при 42°C в течение 45 с на водяной бане

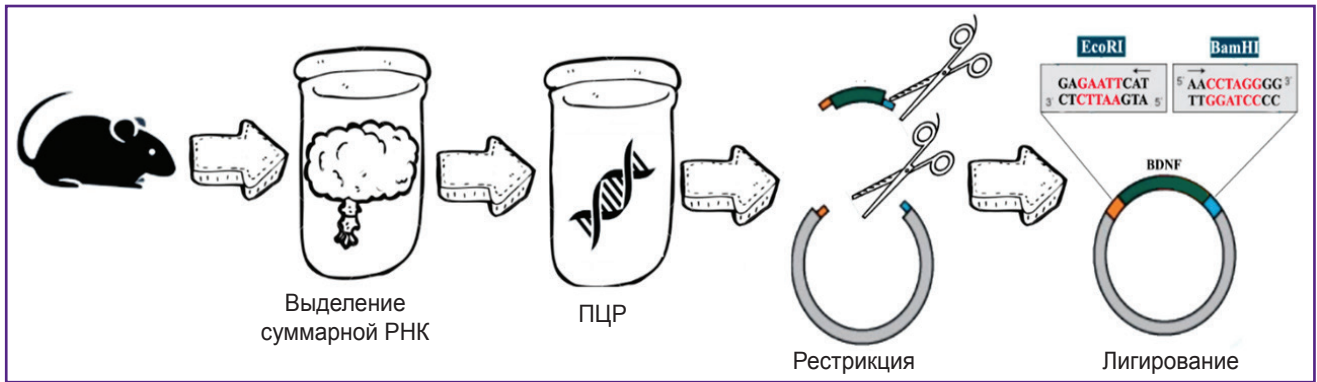


Рис. 1. Схема клонирования фрагмента гена *BDNF* в плазмиду-шаттл

и инкубировали на льду 3 мин. После 30–90-минутной инкубации при 37°C с непрерывным встряхиванием (200–300 об./мин) в трехкратном объеме среды SOB для культивирования прокариотических клеток трансформированные клетки рассевали на чашки Петри, содержащие LB-среду (Luria–Bertani), агар и ампициллин (100 мкг/мл). Культивирование на чашках проводили при 37°C 12–16 ч, после чего частью полученных колоний наращивали объем бактериальной массы в жидких мини- и максикультурах с дальнейшим выделением плазмидной ДНК с помощью коммерческих наборов ISOLATE II Plasmid Mini Kit (Bioline, Великобритания) и NucleoBond Xtra Midi/Maxi (MACHEREY-NAGEL, Германия) согласно протоколу производителя.

Культивирование клеточной линии эмбриональной почки человека НЕК 293Т и проведение трансфекции. Условия культивирования клеточной линии НЕК 293Т соответствовали указанным в паспорте культуры: среда — DMEM; сыворотка эмбриональная бычья — 10%; антибиотик гентомицин — 15 мкг/мл. Процедура посева — снятие клеток, с использованием трипсина 0,25% и раствора Версена 0,02% (1:2–1:3), кратность посева — 1:2–1:3, оптимальная плотность — $(3,0–5,0) \cdot 10^4$ кл./см². Культивирование осуществляли в CO₂-инкубаторе при 37°C, 5% CO₂, 80% влажности.

Для трансфекции клеточной линии использовали шаттл-плазмиду AAV-Syn-BDNF-EGFP и хелперные плазмиды рDP5, DJvector, рHelper. Экспрессирующую и хелперные плазмиды смешивали в эквимолярном количестве (20 мкг каждой) с культуральной средой DMEM. К смеси DNA/DMEM добавляли смесь PEI/DMEM и инкубировали 15 мин при комнатной температуре, после чего доводили объем DMEM до 15 мл. Культуральную среду НЕК 293Т заменяли на смесь PEI/DNA/DMEM на 4–5 ч при 37°C, 5% CO₂. После этого выполняли полную замену среды на DMEM, содержащую 2% сыворотки, и клетки инкубировали 3–5 дней при 37°C, 5% CO₂.

Выделение и очистка аденоассоциированных вирусных частиц. Клетки НЕК 293Т после трансфекции снимали с подложки с помощью фосфатно-солевого буферного раствора (PBS), не содержащего Ca²⁺,

Mg²⁺, центрифугировали при 1000 об./мин в течение 5 мин и растворяли осадок в 2 мл лизирующего буфера. Лизат трехкратно подвергали циклу замораживания/размораживания (–80°C). После последнего размораживания лизат клеток центрифугировали при 2000 об./мин в течение 5 мин. Затем проводили ферментативную обработку бензоназой для удаления нуклеотидов и нуклеиновых кислот, не защищенных вирусным капсидом, и центрифугировали при 2000–2500 об./мин в течение 5 мин для осаждения различных белковых гранул и обломков крупных молекул, после чего супернатант фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Дополнительную очистку и концентрацию вирусного препарата проводили на колонках Amicon Ultra-15 (Millipore, Великобритания).

Культивирование диссоциированных клеток гиппокампа. Материалом для исследований служили культуры диссоциированных клеток гиппокампа, полученных от 18-дневных эмбрионов мышей линии C57BL/6. Основные правила содержания и ухода за экспериментальными животными соответствовали «Правилам для проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Россия, 2010) и «Международным рекомендациям (этическому кодексу) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (CIOMS и ICLAS, 2012), при этом неукоснительно соблюдались этические принципы, установленные Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006). На проведение экспериментальных исследований на животных получено разрешение Этического комитета Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского.

Ферментативную диссоциацию клеток эмбрионального гиппокампа проводили при помощи его обработки 0,25% раствором трипсина (Gibco, США). Культивирование первичных культур осуществляли в нейробазальной среде Neurobasal™ (Thermo Fisher Scientific, США) в комплексе с биоактивной добавкой B27 (Thermo Fisher Scientific, США), L-глутамином

(Thermo Fisher Scientific, США), эмбриональной телячьей сывороткой («ПанЭко», Россия) согласно ранее разработанному протоколу [24] в течение 21 дня *in vitro* на стеклах, покрытых полиэтиленгликолем (Sigma, США) для повышения адгезии клеток на их поверхность. Исходная плотность культуры на матрице составляла 9000 кл./мм². Жизнеспособность культур поддерживалась в условиях CO₂-инкубатора MCO-18AIC (Sanyo, Япония) при температуре 35,5°C и газовой смеси, содержащей 5% CO₂.

Иммуноцитохимия. В работе использовались первичные поликлональные куриные антитела к BDNF и вторичные поликлональные антитела, конъюгированные с флуоресцентной меткой, — Goat anti-Chicken IgY H&L (Alexa Fluor 647) (Abcam, США). Культуры клеток фиксировали в 4% растворе параформальдегида в растворе PBS в течение 20 мин при комнатной температуре, для пермеабиллизации клеток использовали раствор 0,2% Triton X-100/PBS. Визуализацию препаратов проводили с помощью флуоресцентного конфокального микроскопа Zeiss 510 NLO (Carl Zeiss, Германия).

Моделирование гипоксии происходило на 14-й день культивирования путем замены на 10 мин культуральной среды на среду с низким содержанием кислорода. Вытеснение кислорода осуществляли путем насыщения культуральной среды аргоном. Эксперимент проводили в герметичной камере, в которой воздух также был замещен на аргон.

Оценка жизнеспособности клеток в диссоциированных культурах гиппокампа. Жизнеспособность клеток оценивали на 1, 3 и 7-е сутки после проведения инфицирования разработанным вирусным конструктором, а также на 7-е сутки после моделирования гипоксии. С этой целью подсчитывали число клеточных ядер, окрашенных пропидий иодидом (Sigma, США), — мертвые клетки, и ядер, окрашенных бисбензимином (Sigma, США), — все клетки культуры. Долю погибших клеток рассчитывали как процентное соотношение между бис-бензими-д-позитивными и пропидий иодид-позитивными клетками [24].

Функциональный кальциевый имиджинг. Исследование функциональной метаболической активности клеток первичных культур гиппокампа проводили с помощью кальциевого имиджинга, позволяющего регистрировать изменение концентрации цитоплазматического кальция. В качестве флуоресцентного зонда использовали специфический кальциевый краситель Oregon Green 488 BAPTA-1 AM — OGB1 (Invitrogen, США). Окрашивание выполняли по стандартному протоколу [25]. Регистрацию флуоресценции проводили с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 510 NLO (Carl Zeiss, Германия). Регистрировали временные серии изображений поля флуоресценции OGB1. Флуоресценция красителя возбуждалась излучением аргонового лазера на длине волны 488 нм, регистрировалась с помощью светофильтра с полосой 500–530 нм. Анализировали изменение

интенсивности флуоресценции (усл. ед.) выбранной области поля зрения, совпадающей с телом клетки. Выделение и анализ кальциевых осцилляций, полученных при помощи флуоресцентной конфокальной микроскопии, проводили с помощью оригинального программного пакета AstroScanner (свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2014662670). Также анализировали записи функции $F(t)$ средней интенсивности флуоресценции OGB1 выделенной области поля от времени. Учитывали следующие параметры: длительность (с), частоту (количество кальциевых событий/мин), процент работающих клеток в культуре [25].

Анализ биоэлектрической активности. Для исследования изменений спонтанной биоэлектрической активности использовали мультиэлектродные матрицы MEA 60 (Multichannel Systems, Германия) и набор программного обеспечения Conductor™ (Alpha Med Scientific, Япония). Регистрацию внеклеточных потенциалов действия осуществляли на 7-е сутки развития культуры *in vitro* перед добавлением вирусного препарата и далее — ежедневно на протяжении 7 сут. Детектирование спайков (внеклеточных потенциалов действия) проводили по следующему алгоритму: выбиралась граница, равная 8σ , где σ — среднеквадратичное отклонение. При условии превышения амплитудой спонтанной активности данного порога событие считалось спайком, без превышения активности распознавалось как шум и не учитывалось при анализе данных. Критерием малой сетевой пачки служило наличие спайков минимум на четырех различных электродах матрицы с межспайковым интервалом не более 100 мс. При анализе полученных данных оценивали два основных показателя: среднее количество малых сетевых пачек и среднее количество спайков в малой сетевой пачке. Полученные данные обрабатывали с использованием разработанного в программной среде MATLAB оригинального пакета алгоритмов MEAMAN [26].

Статистическая обработка данных. Полученные данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Достоверность различий между экспериментальными группами определяли с помощью пакета ANOVA в программе SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., США). Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

На первом этапе работы для увеличения экспрессии нейротрофического фактора BDNF нейронами были выполнены конструирование и сборка плазмидного вектора, несущего кодирующую последовательность гена *BDNF*, с использованием методов молекулярного клонирования. Конструируемый плазмидный вектор по сути является основой для вируса. В состав плазмидного вектора вошли следующие последовательности (рис. 2): 1) человеческий промотор

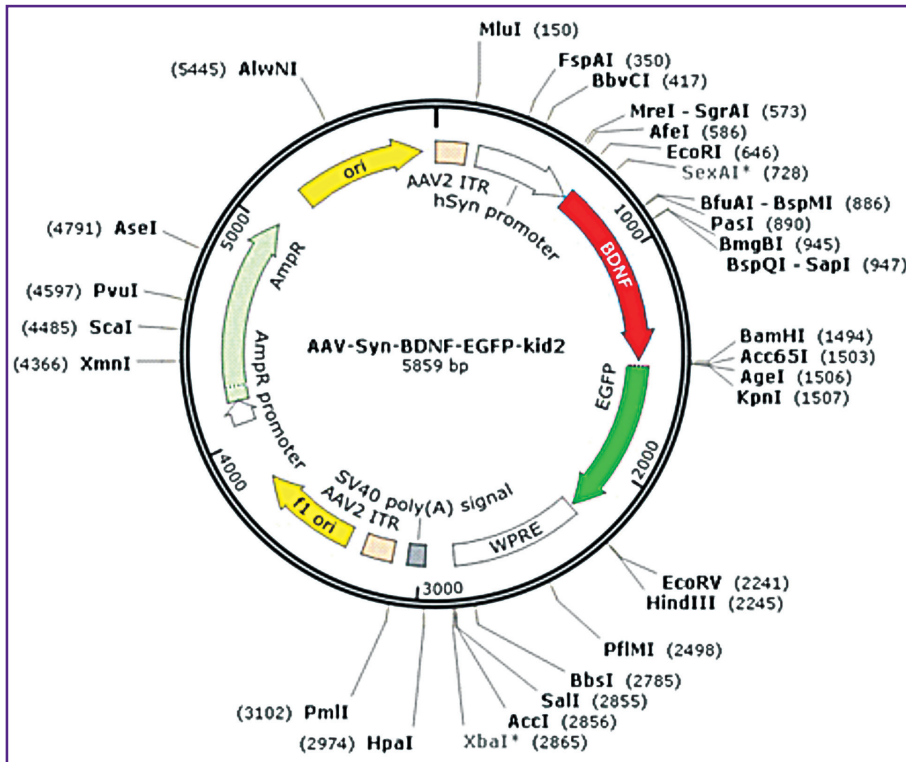


Рис. 2. Карта плазмиды AAV-Syn-BDNF-EGFP-kid2 (построена с помощью программы SnapGene Viewer 3.1.2)

белка синапсина hSyn — сильный промотор, позволяющий экспрессировать необходимый ген только в нейрональных клетках; 2) WPRE-энхансер (woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element) — регуляторный элемент, значительно усиливающий работу промотора синапсина hSyn; 3) мультилинкер для клонирования ORF (open reading frame) встраиваемого гена; 4) ген *EGFP*, который при необходимости вырезается соответствующими рестриктазами; 5) SV40 poly(A) сигнальная последовательность, фланкированная ITR-повторами — из AAV серотипа 2; 6) кассета генов, кодирующих устойчивость к ампициллину, необходимую для положительного отбора колоний, которые несут данную плазмиду (AmpR-промотор и *AmpR*-ген) и 7) последовательность, соответствующая нуклеотидной последовательности, которая кодирует функциональный белок BDNF.

В ходе работы для использования при амплификации нейротрофического фактора BDNF была подобрана система праймеров mBDNF-EcoRI-fw и mBDNF-BamHI-rv (5'-ATTGAATTCATGGGCCACATGCTGTCC-3' и 5'-AATGGATCCAATCTCCCTTTAATGGTCAGTG-3'), в состав которых внесены сайты рестрикции для последующей рестрикции и лигирования в конструируемый вектор.

Также были подобраны температура и время реакции, позволяющие амплифицировать олигонуклеотидную последовательность нейротрофического фактора BDNF. Начальная денатурация проводилась при температуре 95°C в течение 1 мин. Затем следовал рабочий цикл из трех процедур, повторяющийся 30 раз: 95°C — 15 с — денатурация, 65°C — 10 с — отжиг

праймеров, 72°C — 40 с — элонгация. И после этого происходила финальная достройка цепей при температуре 72°C в течение 7 мин. В результате была получена последовательность, кодирующая нейротрофический фактор BDNF.

Сконструированная плазмиды была наработана из клеток *E. coli*, правильность сборки подтверждена с помощью реакции рестрикции и ПЦР на клонируемый фрагмент гена BDNF, электрофоретически проведена проверка длин полученных фрагментов (рис. 3).

Следующим этапом работы явилось тестирование полученного вирусного вектора в первичных культурах клеток гиппокампа. С помощью конфокальной микроскопии была подтверждена экспрессия зеленого флуоресцентного белка EGFP в культурах, инфицированных разработанным вирусным конструктором. Для подтверждения эффективности инфицирования было проведено иммуоцитохимическое окрашивание культур с помощью моноклональных антител к BDNF (рис. 4). Отмечено, что в культурах, инфицированных разработанным вирусным конструктором, уровень продукции BDNF значительно повышается по сравнению с интактными культурами. Это означает, что разработанный вирусный конструктор эффективно инфицирует нейрональные клетки и вызывает увеличение экспрессии BDNF.

Поскольку многие вирусы вызывают гибель нейрональных культур либо изменение функциональной активности нейронных сетей, на следующем этапе исследований проведена оценка жизнеспособности первичных культур клеток гиппокампа в течение 7 сут после инфицирования. Выявлено, что количество

Рис. 3. Качественный анализ результатов ПЦР и рестрикции методом горизонтального электрофореза в агарозном геле:

а — ПЦР: 1 — маркер длин ДНК; 2 — BDNF; *б* — рестрикция: 1 — маркер длин ДНК; 2 — рестрикция AAV-Syn-BDNF-EGFP ферментом EcoRI; 3 — рестрикция AAV-Syn-BDNF-EGFP ферментами EcoRI и BamHI

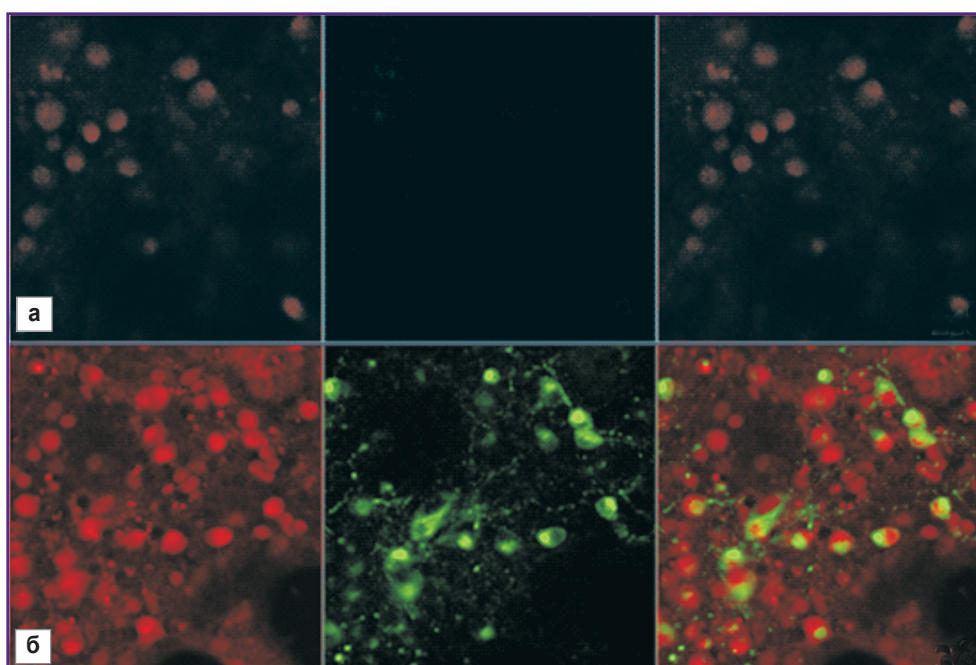
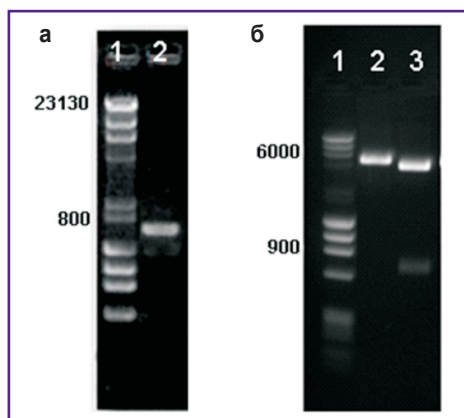


Рис. 4. Иммуноцитохимическое маркирование белка BDNF в первичной культуре клеток гиппокампа, инфицированной вирусным вектором AAV-Syn-BDNF-EGFP:

красный канал — окрашивание антителами с флюоресцентной меткой Alexa Fluor 647, *зеленый канал* — флюоресценция зеленого белка EGFP; *а* — интактная культура; *б* — культура, инфицированная вирусом AAV-Syn-BDNF-EGFP; 7-е сутки после инфицирования; $\times 40$

мертвых клеток в экспериментальной группе культур статистически значимо (ANOVA) не отличалось от показателей интактных культур на протяжении всего периода наблюдения (табл. 1).

Для оценки влияния вирусного конструкта на нейросетевую активность первичных культур клеток гиппокампа были проанализированы основные параметры функциональной кальциевой и биоэлектрической активности культур в течение 7 сут после проведения вирусного инфицирования (экспериментальная группа) и интактных культур.

Т а б л и ц а 1

Доля живых клеток в диссоциированных культурах гиппокампа после инфицирования культуры вирусом AAV-Syn-BDNF-EGFP, % (M \pm SEM)

Сутки после инфицирования	Интактные культуры	Культуры, инфицированные AAV-Syn-BDNF-EGFP
1-е (8 DIV)	96,44 \pm 1,89	92,39 \pm 2,27
3-и (10 DIV)	92,35 \pm 2,13	93,29 \pm 1,45
7-е (14 DIV)	90,28 \pm 3,32	93,71 \pm 1,56

Примечание. Различия статистически значимы по сравнению с интактными культурами, ANOVA ($p < 0,05$).

Спонтанную биоэлектрическую активность регистрировали непосредственно перед инфицированием (7-е сутки культивирования (7 DIV)) и далее после инфицирования ежедневно на протяжении 7 сут (до 14 DIV). Согласно ранее опубликованным данным

[27–29], этот период развития является ключевым этапом формирования сетевой активности нейронных сетей диссоциированных культур *in vitro*. Анализ биоэлектрической активности показал, что применение разработанного конструкта не оказывает угнета-

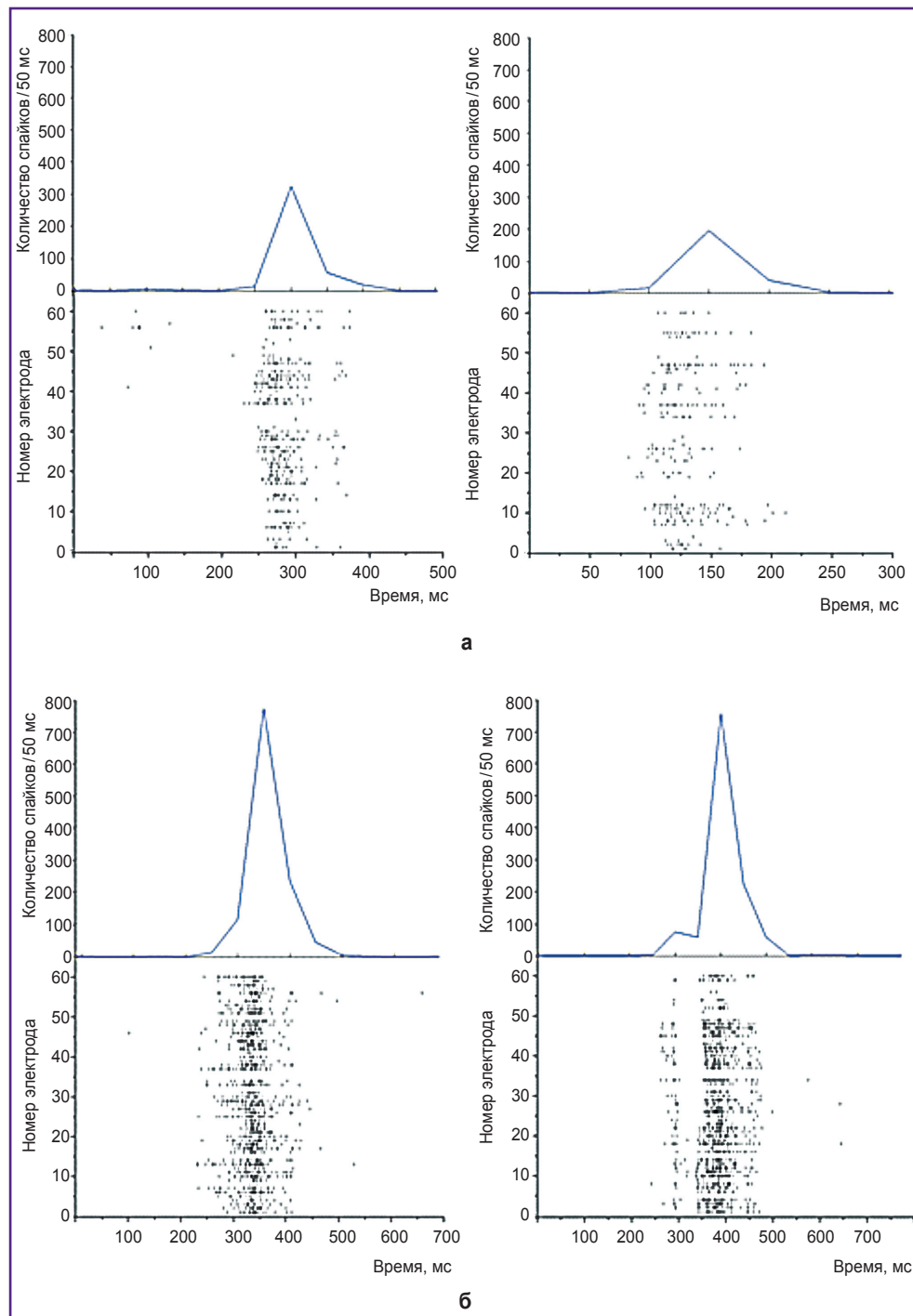


Рис. 5. Растровые диаграммы спонтанной биоэлектрической активности диссоциированной культуры гиппокампа в постгипоксическом периоде: а — 1-е сутки после инфицирования (7 DIV); б — 7-е сутки после инфицирования (14 DIV); слева — интактная культура; справа — культура, инфицированная вирусом AAV-Syn-BDNF-EGFP

ющего действия на спонтанную биоэлектрическую активность первичных культур клеток гиппокампа. Как в интактных, так и в инфицированных культурах на протяжении всего периода наблюдения регистрировалась спонтанная пачечная активность, характерная для данных сроков развития нейронных сетей *in vitro*.

Установлено, что после инфицирования AAV-Syn-BDNF-EGFP на 7-е сутки развития культур *in vitro* спонтанная биоэлектрическая активность статистически значимо не изменялась ни по одному из исследуемых параметров (количество малых сетевых пачек, количество спайков в пачке) на протяжении 6 сут после инфицирования (рис. 5).

К 7-м суткам после инфицирования (14 DIV) отмечена тенденция к интенсификации сетевой активности в культурах с гиперэкспрессией BDNF по сравнению с интактными культурами по параметру числа спайков в сетевой пачке (интактные — $281,5 \pm 82,7$; после инфицирования AAV-Syn-BDNF-EGFP — $402,3 \pm 111,3$). Количество пачек за 10 мин в интактных и инфицированных культурах статистически значимо не отличалось (интактные культуры — $31,8 \pm 8,5$; инфицированные вирусом AAV-Syn-BDNF-EGFP — $37,20 \pm 9,30$).

Для оценки структурно-функционального состояния нейронных сетей на клеточном уровне наиболее

информативным является многофакторный анализ различных показателей кальциевого гомеостаза в нервной ткани. Динамика концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме нервных клеток позволяет оценить метаболическую активность как нейронов, так и глии [25].

Были проанализированы такие параметры кальциевой активности нейрональных культур, как количество клеток, проявляющих спонтанную кальциевую активность, частота и длительность кальциевых осцилляций.

Установлено, что применение разработанного вируса не влияет на основные показатели функциональной кальциевой активности первичных культур клеток гиппокампа (табл. 2), однако отмечена тенденция к увеличению частоты кальциевых событий в группе культур, инфицированных вирусом (контроль — $1,42 \pm 0,16$ осц./мин, инфицированные культуры — $1,79 \pm 0,15$ осц./мин). Доля клеток, проявляющих активность, изменялась незначительно.

На заключительном этапе работы выполнено исследование нейропротекторного действия разработанного вирусного конструкта и проведено сравнение эффективности использования рекомбинантного белка BDNF (Merck, Франция) и увеличения экспрессии BDNF с помощью разработанного вируса при моделировании гипоксии — одного из факторов ишемии.

Таблица 2

Основные параметры спонтанной кальциевой активности на 7-е сутки (14 DIV) после инфицирования культуры вирусом AAV-Syn-BDNF-EGFP ($M \pm SEM$)

Параметр	Интактные культуры	Культуры, инфицированные AAV-Syn-BDNF-EGFP
Количество работающих клеток, %	$73,54 \pm 10,23$	$83,10 \pm 11,55$
Длительность Ca^{2+} -осцилляций, с	$7,80 \pm 0,55$	$7,60 \pm 0,82$
Частота Ca^{2+} -осцилляций, осц./мин	$1,42 \pm 0,16$	$1,79 \pm 0,15$

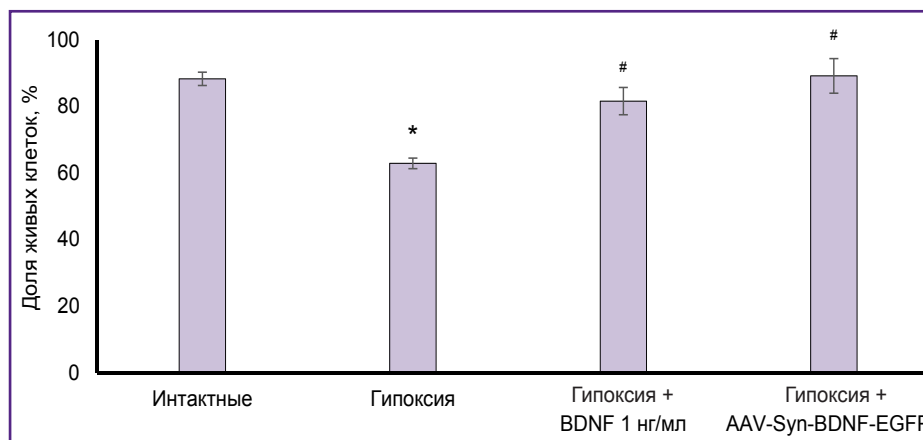


Рис. 6. Доля живых клеток в диссоциированных культурах гиппокампа на 7-е сутки после моделирования гипоксии (14 DIV)

* — различия статистически значимы по сравнению с контролем; # — по сравнению с гипоксией, ANOVA ($p < 0,05$)

Моделирование гипоксии проводили через 7 сут после инфицирования культур (14 DIV). Рекombинантный BDNF в концентрации 1 нг/мл добавляли в культуральную среду контрольных культур за 20 мин до моделирования гипоксии. Установлено, что гипоксия вызывает достоверное (ANOVA, $p < 0,05$) снижение количества живых клеток в культуре к 7-м суткам постгипоксического периода (интактные — $88,3 \pm 2,3\%$; гипоксия — $62,9 \pm 1,8\%$). Исследование показало, что как превентивная аппликация рекombинантного BDNF, так и стимуляция экспрессии BDNF с помощью разработанного вирусного конструкта позволяют предотвратить снижение жизнеспособности клеток в культуре в постгипоксическом периоде (доля живых клеток в группе «гипоксия + BDNF» — $81,6 \pm 4,1\%$; «гипоксия + AAV-Syn-BDNF-EGFP» — $89,2 \pm 5,2\%$) (рис. 6).

Обсуждение

В литературе показано [1, 4, 6, 11], что BDNF обладает выраженным нейропротекторным действием при моделировании различных факторов ишемии, в том числе гипоксии. Применение рекombинантного BDNF повышает устойчивость нервных клеток к действию повреждающих факторов ишемии как *in vitro* [14, 24], так и *in vivo* [2, 14, 29, 30]. Это делает перспективным использование нейротрофических факторов в клинической терапии ишемических повреждений головного мозга. Существуют исследования, подтверждающие участие данного нейротрофина в регенерации ЦНС после гибели значительной части функционально значимых нейронов [31]. Однако системное применение рекombинантных белков всегда приводит к временному эффекту, который требует их постоянного приема. Целенаправленная доставка генов к конкретным областям нервной системы в зоне повреждения может быть намного более эффективным подходом к долгосрочному лечению повреждений ЦНС [19, 20].

В результате проведенного исследования нами был разработан вирусный конструкт, содержащий последовательность гена *BDNF*, для повышения экспрессии BDNF нейронами головного мозга и изучены его возможности.

Как известно, при культивировании нейронные сети проходят несколько характерных стадий формирования морфофункциональной активности [26–28]. Наше исследование *in vitro* показало, что гиперэкспрессия BDNF не оказывает значимого эффекта на формирование как биоэлектрической, так и кальциевой активности и, таким образом, безопасна для применения в целях восстановления нормальной функциональной активности при ишемическом повреждении головного мозга. Показано также отсутствие цитотоксичности вирусного препарата при исследовании жизнеспособности культур клеток гиппокампа.

Проведенные эксперименты свидетельствуют, что повышенная экспрессия BDNF позволяет снизить ги-

бель нервных клеток при моделировании гипоксии *in vitro*. Продемонстрированный нейропротекторный эффект сопоставим с действием экзогенно вводимого рекombинантного BDNF. Полученные результаты могут явиться фундаментальной базой для разработки метода генной терапии тяжелого ишемического повреждения головного мозга, а также нейродегенеративных заболеваний, одним из патогенетических компонентов которых является гипоксия.

Заключение

Разработан аденоассоциированный вирусный вектор AAV-Syn-BDNF-EGFP, несущий последовательность гена *BDNF*, предназначенный для увеличения экспрессии нейротрофического фактора головного мозга. Применение разработанного вектора для инфицирования первичных культур клеток гиппокампа мыши приводит к увеличению продукции BDNF клетками культуры, при этом не оказывает негативного влияния на жизнеспособность и функциональную активность нейронных сетей первичных культур гиппокампа. Продемонстрированы нейропротекторные свойства гиперэкспрессии BDNF при моделировании гипоксии *in vitro*.

Финансирование исследования. Исследование выполнено при поддержке государственного задания (проекты 17.3335.2017/ПЧ и 6.6379.2017/БЧ) в части получения вирусного конструкта и при поддержке Российского научного фонда (проект 17-75-10149) в части исследования его нейропротекторных свойств.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов, о которых необходимо сообщить.

Литература/References

1. Chen A., Xiong L.J., Tong Y., Mao M. The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury. *Biomed Rep* 2013; 1(2): 167–176, <https://doi.org/10.3892/br.2012.48>.
2. Harris N.M., Ritzel R., Mancini N.S., Jiang Y., Yi X., Manickam D.S., Banks W.A., Kabanov A.V., McCullough L.D., Verma R. Nano-particle delivery of brain derived neurotrophic factor after focal cerebral ischemia reduces tissue injury and enhances behavioral recovery. *Pharmacol Biochem Behav* 2016; 150–151: 48–56, <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2016.09.003>.
3. Kotłęga D., Peda B., Zembroń-Lacny A., Gołąb-Janowska M., Nowacki P. The role of brain-derived neurotrophic factor and its single nucleotide polymorphisms in stroke patients. *Neurol Neurochir Pol* 2017; 51(3): 240–246, <https://doi.org/10.1016/j.pjnns.2017.02.008>.
4. Zhao H., Alam A., San C.Y., Eguchi S., Chen Q., Lian Q., Ma D. Molecular mechanisms of brain-derived neurotrophic factor in neuro-protection: recent developments. *Brain Res* 2017; 1665: 1–21, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.03.029>.

5. Douglas-Escobar M., Rossignol C., Steindler D., Zheng T., Weiss M.D. Neurotrophin-induced migration and neuronal differentiation of multipotent astrocytic stem cells in vitro. *PLoS One* 2012; 7(12): e51706, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051706>.
6. Skaper S.D. Neurotrophic factors: an overview. *Methods Mol Biol* 2018; 1727: 1–17, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7571-6_1.
7. Martin J.L., Finsterwald C. Cooperation between BDNF and glutamate in the regulation of synaptic transmission and neuronal development. *Commun Integr Biol* 2011; 4(1): 14–16, <https://doi.org/10.4161/cib.13761>.
8. Rose C.R., Blum R., Kafitz K.W., Kovalchuk Y., Konnerth A. From modulator to mediator: rapid effects of BDNF on ion channels. *BioEssays* 2004; 26(11): 1185–1194, <https://doi.org/10.1002/bies.20118>.
9. Cunha C., Brambilla R., Tomas K.L. A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci* 2010; 3: 1, <https://doi.org/10.3389/fnmo.2010.001.2010>.
10. Kowiański P., Lietzau G., Czuba E., Waśkow M., Steliga A., Moryś J. BDNF: a key factor with multipotent impact on brain signaling and synaptic plasticity. *Cell Mol Neurobiol* 2018, 38(3): 579–593, <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0510-4>.
11. Vedunova M.V., Sakharnova T.A., Mitroshina E.V., Shishkina T.V., Astrakhanova T.A., Mukhina I.V. Antihypoxic and neuroprotective properties of BDNF and GDNF in vitro and in vivo under hypoxic conditions. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2014; 6(4): 38–47.
12. Zhang Y., Pardridge W.M. Neuroprotection in transient focal brain ischemia after delayed intravenous administration of brain-derived neurotrophic factor conjugated to a blood-brain barrier drug targeting system. *Stroke* 2001; 32(6): 1378–1384, <https://doi.org/10.1161/01.str.32.6.1378>.
13. Neumann J.T., Thompson J.W., Raval A.P., Cohan C.H., Koronowski K.B., Perez-Pinzon M.A. Increased BDNF protein expression after ischemic or PKC epsilon preconditioning promotes electrophysiologic changes that lead to neuroprotection. *J Cereb Blood Flow Metab* 2015; 35(1): 121–130, <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.185>.
14. Huang W., Meng F., Cao J., Liu X., Zhang J., Li M. Neuroprotective role of exogenous brain-derived neurotrophic factor in hypoxia-hypoglycemia-induced hippocampal neuron injury via regulating TrkB/MiR134 signaling. *J Mol Neurosci* 2017; 62(1): 35–42, <https://doi.org/10.1007/s12031-017-0907-z>.
15. Berretta A., Tzeng Y.C., Clarkson A.N. Post-stroke recovery: the role of activity-dependent release of brain-derived neurotrophic factor. *Expert Rev Neurother* 2014; 14(11): 1335–1344, <https://doi.org/10.1586/14737175.2014.969242>.
16. Mang C.S., Campbell K.L., Ross C.J., Boyd L.A. Promoting neuroplasticity for motor rehabilitation after stroke: considering the effects of aerobic exercise and genetic variation on brain-derived neurotrophic factor. *Phys Ther* 2013; 93(12): 1707–1716, <https://doi.org/10.2522/ptj.20130053>.
17. Liu S., Sandner B., Schackel T., Nicholson L., Chtarto A., Tenenbaum L., Puttagunta R., Müller R., Weidner N., Blesch A. Regulated viral BDNF delivery in combination with Schwann cells promotes axonal regeneration through capillary alginate hydrogels after spinal cord injury. *Acta Biomater* 2017; 60: 167–180, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.07.024>.
18. Kimura A., Namekata K., Guo X., Harada C., Harada T. Neuroprotection, growth factors and BDNF-TrkB signalling in retinal degeneration. *Int J Mol Sci* 2016; 17(9): 1584, <https://doi.org/10.3390/ijms17091584>.
19. Igarashi T., Miyake K., Kobayashi M., Kameya S., Fujimoto C., Nakamoto K., Takahashi H., Igarashi T., Miyake N., Iijima O., Hirai Y., Shimada T., Okada T., Takahashi H. Tyrosine triple mutated AAV2-BDNF gene therapy in a rat model of transient IOP elevation. *Mol Vis* 2016; 22: 816–826.
20. Katsu-Jiménez Y., Loría F., Corona J.C., Díaz-Nido J. Gene transfer of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) prevents neurodegeneration triggered by FXN deficiency. *Mol Ther* 2016; 24(5): 877–889, <https://doi.org/10.1038/mt.2016.32>.
21. Iwasaki Y., Negishi T., Inoue M., Tashiro T., Tabira T., Kimura N. Sendai virus vector-mediated brain-derived neurotrophic factor expression ameliorates memory deficits and synaptic degeneration in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 2012; 90(5): 981–989, <https://doi.org/10.1002/jnr.22830>.
22. Dekeyster E., Geeraerts E., Buyens T., Van den Haute C., Baekelandt V., De Groef L., Salinas-Navarro M., Moons L. Tackling glaucoma from within the brain: an unfortunate interplay of BDNF and TrkB. *PLoS One* 2015; 10(11): e0142067, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142067>.
23. Yu S.J., Tseng K.Y., Shen H., Harvey B.K., Airavaara M., Wang Y. Local administration of AAV-BDNF to subventricular zone induces functional recovery in stroke rats. *PLoS One* 2013; 8(12): e81750, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081750>.
24. Vedunova M.V., Mishchenko T.A., Mitroshina E.V., Mukhina I.V. TrkB-mediated neuroprotective and antihypoxic properties of brain-derived neurotrophic factor. *Oxid Med Cell Longev* 2015; 2015: 453901, <https://doi.org/10.1155/2015/453901>.
25. Zakharov Yu.N., Korotchenko S.A., Kalintseva Ya.I., Potanina A.V., Mitroshina E.V., Vedunova M.V., Mukhina I.V. Fluorescence analysis of the metabolic activity patterns of a neuronal-glia network. *Journal of Optical Technology* 2012; 79(6): 348–351, <https://doi.org/10.1364/jot.79.000348>.
26. Pimashkin A., Kastalskiy I., Simonov A., Koryagina E., Mukhina I., Kazantsev V. Spiking signatures of spontaneous activity bursts in hippocampal cultures. *Front Comput Neurosci* 2011; 5: 46, <https://doi.org/10.3389/fncom.2011.00046>.
27. Shirokova O.M., Frumkina L.E., Vedunova M.V., Mitroshina E.V., Zakharov Y.N., Khaspekov L.G., Mukhina I.V. Morphofunctional patterns of neuronal network developing in dissociated hippocampal cell cultures. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2013; 2: 6–13.
28. Агрба Е.А., Мухина И.В. Пространственно-временная характеристика нейросетевой активности первичных культур гиппокампа. Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского 2013; 4(1): 139–144. Агрба Е.А., Мухина И.В. Spatio-temporal characteristics of neuronal network activity of primary hippocampal cultures. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo* 2013; 4(1): 139–144.
29. Митрошина Е.В., Ведунова М.В., Широкова О.М., Захаров Ю.Н., Калинин Я.И., Мухина И.В. Оценка динамики функционального состояния диссоциированной культуры гиппокампа in vitro. Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского 2011; 2(2): 283–286. Mitroshina E.V., Vedunova M.V., Shirokova O.M., Zakharov Yu.N., Kalintseva Ya.I., Mukhina I.V. Assessment of functional state dynamics of dissociated hippocampal

cell culture in vitro. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo* 2011; 2(2): 283–286.

30. Ramos-Cejudo J., Gutiérrez-Fernández M., Otero-Ortega L., Rodríguez-Frutos B., Fuentes B., Vallejo-Cremades M.T., Hernanz T.N., Cerdán S., Díez-Tejedor E. Brain-derived neurotrophic factor administration mediated oligodendrocyte differentiation and myelin formation in subcortical ischemic stroke. *Stroke* 2015; 46(1): 221–228, <https://doi.org/10.1161/strokeaha.114.006692>.

31. Hernandez-Torres V., Gransee H.M., Mantilla C.B., Wang Y., Zhan W.Z., Sieck G.C. BDNF effects on functional

recovery across motor behaviors after cervical spinal cord injury. *J Neurophysiol* 2017; 117(2): 537–544, <https://doi.org/10.1152/jn.00654.2016>.

32. Ведунова М.В., Мищенко Т.А., Шишкина Т.В., Мухина И.В. Способ частичного восстановления функциональной активности нейронных сетей in vitro в условиях их значительного повреждения. Патент РФ 2594065. 2016. Vedunova M.V., Mishchenko T.A., Shishkina T.V., Mukhina I.V. *Method of partial restoration of functional activity of neural networks in vitro in conditions of considerable damage*. Patent RU 2594065. 2016.