

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2000

УДК 616.24-003.4-004.1-056.7

П.Б. Глазков, Е.Н. Миткина**, Т.Е. Гембицкая**, Т.Э. Иващенко*,
В.А. Сабезкий*, А.В. Орлов***, В.С. Баранов**

ВЗАИМООТНОШЕНИЯ ГЕНОТИП—ФЕНОТИП У БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ И РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОСНОВ ГЕНОТЕРАПИИ ЭТОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

* Институт акушерства и гинекологии им.Д.О.Отта РАМН, ** НИИ пульмонологии СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова, *** Детская городская больница им. Святой Ольги, г. Санкт-Петербург

Муковисцидоз (МВ) — наиболее распространенное, тяжелое, аутосомно-рецессивное наследственное заболевание человека, характеризующееся нарушением ионного транспорта в эпителии экзокринных желез. Причиной этих нарушений являются мутации гена трансмембранного регуляторного белка муковисцидоза (cystic fibrosis transmembrane regulator — CFTR). Белок CFTR в норме локализован в апикальной части плазмолеммы эпителиальных клеток, выстилающих выводные протоки всех экзокринных желез, и регулирует электролитный транспорт [14]. Частота МВ в России, по данным разных авторов, варьирует от 1 : 5465 до 1 : 12 300 новорожденных [1, 2, 4].

В настоящее время для коррекции основных дефектов при МВ стремительно развивается принципиально новое терапевтическое направление — генная терапия. Наличие плазмидных конструкций с комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислотой (кДНК) гена CFTR открывает возможности для разработки методов генотерапии этого тяжелого и зачастую смертельного заболевания. В настоящее время такие исследования проводятся во многих научных центрах, в 10 из которых они уже находятся на стадии клинических испытаний [7, 13]. Доставка экспрессирующих конструкций с кДНК гена CFTR осуществляется с помощью различных вирусных или невирусных (липосомных) носителей, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки [8, 10]. Поиск новых носителей, обеспечивающих эффективную и безопасную доставку кДНК гена CFTR в клетки дыхательного эпителия, остается весьма актуальным.

Целью настоящего исследования является изучение особенностей разности назальных потенциалов и иммуногистохимической окраски белка CFTR в биоптатах назального эпителия у больных муковисцидозом с различными мутациями в гене CFTR, а также

отработка условий доставки маркерных генов в эпителиальные клетки легких *in vivo* в условиях эксперимента.

Трансэпителиальную разность назальных потенциалов (РНП) измеряли по методу Knowels и соавт. [12]. Суть метода состоит в измерении разности потенциалов между электродами, один из которых располагается на поверхности слизистой оболочки носа, а второй — на коже предплечья, предварительно зачищенной с помощью скраба [3].

Обследовано 28 больных, у 13 из которых диагноз муковисцидоза был подтвержден клиническим обследованием, генетическим анализом на наличие мутаций в гене CFTR и измерением хлоридов потовой жидкости. Контрольную группу (15 человек) составили больные с хроническими неспецифическими заболеваниями легких (ХНЗЛ) — хроническим бронхитом, бронхоэктатической болезнью, бронхиальной астмой, облитерирующим бронхиолитом.

В обеих группах разницы величин назальных потенциалов в зависимости от пола зарегистрировано не было. Значения РНП у больных МВ составили в среднем $-44,7 \pm 2,2$ mV (пределы от $-32,5$ до $-68,9$ mV), в контрольной группе $-17,2 \pm 1,8$ mV (пределы от $-6,8$ до $-30,2$ mV), отличаясь с высокой достоверностью при $p < 0,0001$ (рис. 1).

Заслуживает внимания факт, что у 6 пациентов из группы больных МВ хлориды пота имели нормальные или пограничные значения (от 24 до 62 ммоль·л⁻¹), что затрудняло верификацию диагноза на начальном этапе. Значения РНП у этих больных были сравнимы с "РНП-профилем", характерным для МВ. После выполнения генетического исследования оказалось, что 1 больной имел delF508 в гомозиготном состоянии, у 4 delF508 в компаунде с 1366del5, 3849+10 kb C→T и unknown, 1 больной имел N1303K в компаунде с 2143delT, т.е. и у больных с более легким течением муковисцидоза РНП была

изменена так же, как у больных с типичной клиникой МВ.

В то же время у 3 пациентов из группы больных ХНЗЛ (2 больных с бронхиальной астмой и 1 с односторонними бронхоэктазами) были зарегистрированы повышенные значения хлоридов потовой жидкости ($66\text{--}74\text{ ммоль}\cdot\text{л}^{-1}$), однако значения РНП у них оставались низкими ($-6,8$, $-16,2$, $-22,0\text{ мВ}$).

В настоящее время измерение хлоридов потовой жидкости остается практически единственно доступным методом диагностики МВ в ряде лечебных учреждений России. Принимая во внимание нередкие случаи нормальных или пограничных значений хлоридов потовой жидкости у больных со среднетяжелой клинической картиной МВ или повышений хлоридов пота у больных ХНЗЛ, возникает необходимость в дополнительных, более чувствительных диагностических методах.

РНП является легко выполнимым тестом и не требует дополнительных навыков. Благодаря этому методу удается исключить спорные вопросы при диагностике МВ в случаях, когда клиническое обследование, повторные измерения хлоридов потовой жидкости и ДНК-анализ не дают однозначных результатов [3].

Для анализа локализации белкового продукта гена CFTR в клетках назального эпителия были использованы моноклональные антитела MATG 1061 (Transgene), специфичные к последовательности NBF1 домена CFTR белка ($503\text{--}515\text{ а/к}$) [14]. Третьи антитела были конъюгированными с FITC, поэтому место локализации белка CFTR под микроскопом выявлялось по наличию специфического зеленого свечения. Материал для исследования был получен из средней части носовой полости пациентов под местным наркозом путем браш-биопсии участка назального эпителия размером примерно 1 мм. Нами было обследовано 13 больных МВ в возрасте от 5 до 23 лет (средний возраст 17 лет), из них 9 мужчин (мальчиков) и 4 женщины (девочки). Обследованные больные МВ имели следующие генотипы: 9 — $\text{delF508}/\text{delF508}$; 1 — $\text{delF508}/\text{W1282X}$; 1 — $\text{delF508}/1366\text{del}$, 1 — $\text{N1303K}/2143\text{delT}$, 1 — $\text{delF508}/3732\text{delA}$. Результаты иммуногистохимического анализа биоптатов назального эпителия в контроле и у больных МВ приведены на рис.2. (см цветную вклейку). В норме CFTR-белок четко локализован в апикальной мембране реснитчатых клеток назального эпителия (рис. 2,В). Локализации у больных МВ заметно отличается от таковой в контрольной группе. Во всех образцах назального эпителия пациентов с МВ белок CFTR присутствовал только в цитоплазме эпителиальных клеток, но не определялся в апикальной мембране (рис. 2,А,Б). При этом у больных МВ с генотипом $\text{delF508}/\text{delF508}$ и $\text{delF508}/\text{W1282X}$ отмечалось заметное снижение концентрации белка CFTR в назальном эпителии.

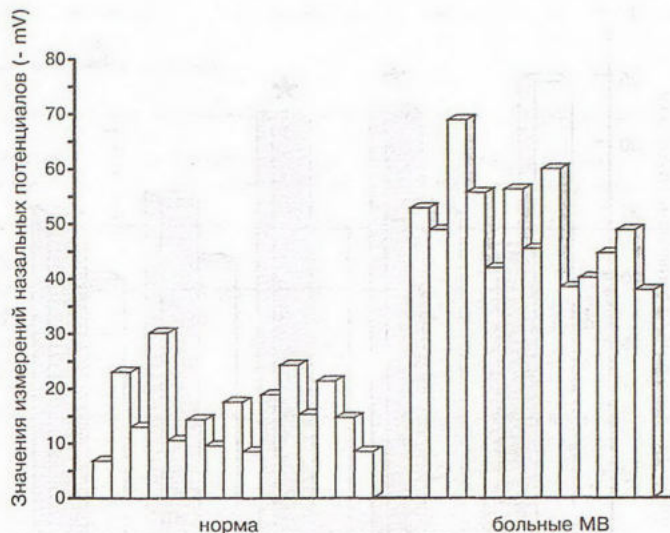


Рис.1. Распределение измерений назальных потенциалов в норме и у больных МВ с различными генотипами.

Примечание: получены статистически достоверные отличия (по Стьюденту) между контрольной группой и группой больных МВ ($p < 0,0001$).

Полученные результаты подтверждают данные о наличии четких морфологических отличий в локализации белкового продукта гена CFTR в назальном эпителии у больных МВ и здоровых [6, 9, 11, 14]. Более того, концентрация и распределение этого белка в цитоплазме эпителиальных клеток в известной мере коррелирует с типом мутационного повреждения гена CFTR.

Следовательно, согласно нашим данным, иммуногистохимический анализ белкового продукта гена CFTR в биоптатах назального эпителия, равно как и измерение разности назальных потенциалов, могут служить дополнительными и информативными лабораторными тестами для дифференциальной диагностики МВ.

С целью разработки экспериментальных основ генной терапии муковисцидоза нами была изучена способность синтетических микросфер (МФ-2) служить средством доставки генетических конструкций в клетки дыхательного эпителия легких мышей после однократного внутриназального введения. Опыты проведены с двумя типами плазмид, содержащих маркерный ген LacZ — с цитоплазматической (pCMV-LacZ) и ядерной (pCMV-nlsLacZ) локализацией β -галактозидазы — продукта экспрессии этого гена. Наличие β -галактозидазы в цитоплазме (pCMV-LacZ) либо только в ядрах (pCMV-nlsLacZ) определяли по появлению специфического синего окрашивания после инкубации анализируемого материала с реагентом X-gal [5, 9, 15]. На рис.3 представлены количественные показатели уровня экспрессии маркерного гена LacZ на 1, 7, 14, 21 и 60-й дни после внутриназального введения "несвязанной" плазмиды pCMV-LacZ (контроль) или комплекса

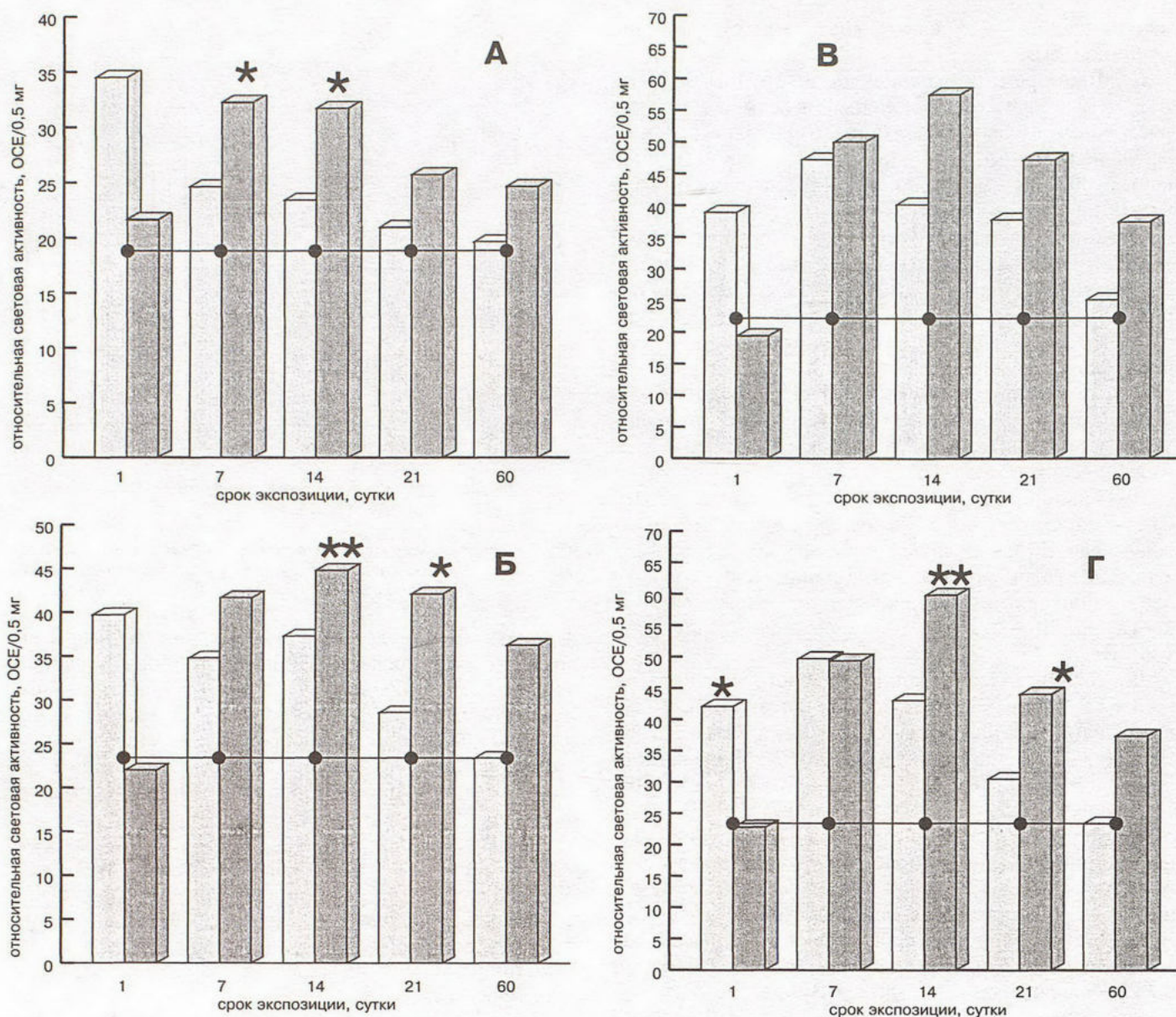


Рис. 3. Количественная зависимость экспрессии маркерного гена pCMV-LacZ в различных органах (А-нос; Б-трахея; В-левая доля легкого; Г-правая доля легкого) через различные периоды времени после однократного внутриназального введения.

Примечание: при сравнении МФ-2/pCMV-LacZ с pCMV-LacZ (* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$). Светлые столбики — pCMV-LacZ ("несвязанная"); темные столбики — pCMV-LacZ/МФ-2; —●— интактный контроль.

МФ-2/pCMVLacZ. Количественные показатели уровня экспрессии маркерного гена LacZ представлены в единицах относительной световой активности (ОСА), полученных на спектрофотометре. Как следует из приведенных данных, максимумы экспрессии трансгена LacZ во всех изученных тканях этой серии соответствуют 7-му и 14-му дням, когда показатели β -галактозидазной активности на 25-30% превышают контрольный уровень (введение "несвязанной" плазмиды pCMV-LacZ). В дальнейшем, однако, они прогрессивно снижаются, но даже на 60-й день для левой доли легкого они остаются достовер-

но выше фона ($p < 0,01$). Существенно, что наиболее высокие показатели β -галактозидазной активности (до 60 ОСА) зарегистрированы в обоих легких подопытных мышей на 14-й день после введения, достоверно ($p < 0,05$) отличаясь от контроля (введение "несвязанной" плазмиды pCMV-LacZ) и с высокой достоверностью ($p < 0,001$) отличаясь от интактного контроля.

Гистохимическая локализация экспрессии гена LacZ проведена на замороженных срезах легких через 14 дней после введения. Как видно на рис.4, (см. цветную вклейку), яркая окраска, свидетельствующая

Относительное количество трансфицированных LacZ клеток в легких мышей

Генетическая конструкция	Число проанализированных срезов	Среднее количество альвеол на срезе	Среднее количество LacZ+ альвеол на срезе	Средний процент LacZ+ альвеол на срезе
МФ-2/pCMV-nlsLacZ	75	3069	70,07 ± 19,97	2,28 ± 0,65
МФ-2/pCMV-nlsLacZ	88	3124	84,36 ± 24,55	2,70 ± 0,79
МФ-2/pCMV-nlsLacZ	67	2782	94,36 ± 26,94	3,39 ± 0,96
МФ-2/pCMV-luc	72	3250	0	0
МФ-2/pCMV-luc	59	2375	0	0

шая о высокой концентрации маркерного белка β-галактозидазы, в цитоплазме эпителиальных клеток бронхиол и альвеол обнаруживается только на криостатных срезах легких после внутриназального введения МФ-2/pCMVLacZ (рис.4,А). Она не выявляется на срезах легких после введения комплекса МФ-2 частиц с геном люциферазы (контроль) — рис.4,Б.

Наличие специфической синей окраски зарегистрировано и на тотальных препаратах легких подопытных мышей при том же сроке экспозиции (14 дней) — рис.5, см. цветную вклейку. Видно четкое специфически синее окрашивание как после введения pCMV-LacZ (рис.5,А), так и после доставки pCMV-nlsLacZ (рис.5,Б). На рис.5,В представлено изображение тотального препарата легкого мыши после введения генетической конструкции pCMV-luc/МФ-2 (контроль).

Еще более четкие результаты получены в экспериментах с плазмидой pCMV-nlsLacZ, характеризующейся специфической внутриядерной локализацией β-галактозидазы. Единичные ядра альвеолярных клеток, активно экспрессирующих ген LacZ на 14-й день после введения комплекса МФ-2/pCMVnlsLacZ, показаны на рис.4,В.

Результаты подсчета числа альвеол, содержащих положительные по окраске на β-галактозидазу ядра, приведены в таблице. В подопытной группе (комплекс МФ-2/pCMVnlsLacZ) проанализировано в общей сложности 230 поперечных срезов легких от 3 мышей и в контрольной (комплекс МФ-2/pCMVluc) — 131 срез. Среднее количество альвеол на срезе для 3 мышей составило 2782, 3069 и 3124. При этом среднее количество альвеол, экспрессирующих β-галактозидазу, равняется 70,07±19,97, 84,36±24,55 и 94,36±26,94 на срезе и в среднем составляет около 3%.

Полученные результаты по локализации и продолжительности экспрессии маркерных генов LacZ в составе синтетических микросфер свидетельствуют о перспективности использования МФ-2 для доставки генетических конструкций с целью лечения муковис-

цидоза, а возможно, и других тяжелых хронических заболеваний легких.

Выводы

1. Показатели разности назальных потенциалов у больных МВ достоверно отличаются от таковых у больных, страдающих ХНЗЛ.

2. Концентрация и распределение белка CFTR в цитоплазме эпителиальных клеток коррелирует с типом мутационного повреждения гена CFTR.

3. Иммуногистохимический анализ белкового продукта гена CFTR в биоптатах назального эпителия и измерение разности назальных потенциалов могут служить дополнительными и информативными лабораторными тестами для диагностики МВ.

4. Результаты по изучению и продолжительности экспрессии маркерных генов LacZ свидетельствуют о перспективности использования МФ-2 для доставки генетических конструкций с целью лечения муковисцидоза и, возможно, других хронических заболеваний легких.

ЛИТЕРАТУРА

1. Желенина Л.А. Муковисцидоз у детей (клинико-генетические особенности, инфекционный процесс в легких, лечение): Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — СПб., 1998.
2. Капранов Н.И., Каширская Н.Ю. Актуальные проблемы муковисцидоза на современном этапе в России // Пульмонология. — 1997. — № 4. — С.7—16.
3. Миткина Е.Н., Гембицкая Т.Е., Фокина А.А., Куприна Е.А., Орлов А.В., Глазков П.Б. Измерение разности назальных потенциалов — новый информативный тест для диагностики муковисцидоза // Пульмонология. 1999. № 3. С. 48—51.
4. Чучалин А.Г., Воронина Л.М., Кронина Л.А., Самсонова М.В. Муковисцидоз у взрослых: этиология, патогенез, перспективы лечения // Там же. — 1994. — №3. — С.17—23.
5. Bout A., Valerio D., Scholte B. In vivo transfer and expression of the lacZ gene in the mouse lung // Exp. Lung Res. — 1993. — Vol. 19. — P.193—202.
6. Dupuit F., Kalin N., Brezillon S. et al. CFTR and differentiation markers expression in non-CF and delta F 508 homozygous CF nasal epithelium // J. Clin. Invest. — 1995. — Vol.96. — P. 1601—1612.
7. Grabb B., Pickles R., Yankaskas J. et al. Inefficient gene trans-

- fer by adenovirus vector to cystic fibrosis airway epithelia of mice and humans // *Nature*. — 1994. — Vol.371. — P. 802—806.
8. Griesenbach U., Chonn A., Cassady R. et al. Comparison between intratracheal and intravenous administration of liposome—DNA complexes for cystic fibrosis lung gene therapy // *Gene Ther.*—1998.—Vol.5.— P.181—188.
 9. Kaplan J.M., Armentano D., Sparer T.E. et al. Characterization of factor involved in modulating persistence of transgene expression from recombinant adenovirus in the mouse lung // *Hum. Gene Ther.*— 1997.— Vol.8.— P.45—56.
 10. Kaplan J., Pennington S., George J. et al. Potentiation of gene transfer to the mouse lung by complexes of adenovirus vector and polycations improves therapeutic potential // *Ibid.*— 1998.—Vol.9.—P.1469—1479.
 11. Kartner N., Augustinas O., Jensen T. et al. Mislocalization of delF508 CFTR in cystic fibrosis sweat gland // *Nature Genet.*— 1992.— Vol.1.— P.321—327.
 12. Knowles M., Gatz J., Boucher R. Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis // *N. Engl. J. Med.*— 1981.— Vol.305.— P.1489—1495.
 13. Knowles M.R., Hohneker K.W., Zhou Z. et al. A controlled study of adenoviral vector—mediated gene transfer in the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis // *Ibid.* — 1995. — Vol.333.— P. 823—831.
 14. Puchelle E., Gaillard D., Ploton D. et al. Differential localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal and cystic fibrosis airway epithelium // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* — 1992. — Vol. 7. — P. 485—491.
 15. Weiss D., Liggitt D., Clark J. In situ histochemical detection of β -galactosidase activity in lung: assessment of X—gal reagent in distinguishing lacZ gene expression and endogenous β -galactosidase activity // *Hum. Gene Ther.*— 1997.— Vol.8.— P. 1545—1554.
 16. Wilson D. C., Ellis L., Zielenski J. et al. Uncertainty in the diagnosis of cystic fibrosis: Possible role of in vivo nasal potential difference measurements // *J. Pediat.*— 1998.— Vol. 132., №4.— P.596—599.

Поступила 16.12.99