



## ГЕНЕТИКА

УДК 616.12-089.844

### АКТИВНОСТЬ ГЕНА ФАКТОРА РОСТА BDNF В КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ АМНИОТИЧЕСКОЙ ОБОЛОЧКЕ ПЛАЦЕНТЫ ЧЕЛОВЕКА, ИСПОЛЬЗУЮЩЕЙСЯ ПРИ АНТИГЛАУКОМАТОЗНЫХ ОПЕРАЦИЯХ

**В.В. РЯЗАНЦЕВ<sup>1</sup>**  
**Ю.А. ДЁМИН<sup>2</sup>**  
**И.Л. КАЗЬМИРУК<sup>2</sup>**

*<sup>1)</sup> Институт проблем криобиологии  
и криомедицины НАНУ, г. Харьков*

*<sup>2)</sup> Харьковская медицинская  
академия последипломного  
образования, г. Харьков*

*e-mail: vvryaz@i.ua*

В статье представлены данные об изучении в эксперименте активности гена нейротрофина BDNF при использовании криоконсервированного амниона (криоАМ) в послеоперационном периоде после антиглаукоматозной операции. Показан эффект экспрессии РНК гена фактора роста нервных клеток BDNF в криоконсервированном амнионе. Это возможно означает, что в крио АМ на протяжении длительного времени до 21 суток могут сохраняться процессы синтеза нуклеиновых кислот и секреторная активность ткани в отношении нейротрофинов, что по всей видимости является доказательством наличия в криоконсервированном амнионе жизнеспособных клеток.

Ключевые слова: тканевая инженерия, криоконсервирование амниона, ген фактора роста BDNF, антиглаукоматозная операция.

Амниотическая оболочка человека используется в медицине в различных целях с 1910г. С 1993г. был проявлен необычайный интерес к амниону как биологическому материалу в офтальмологии после сообщения [1]. Амнион использовался в новом состоянии после консервирования при помощи низких температур.

Способность ткани криоконсервированной амниотической оболочки (криоАМ) после размораживания сохранять уровень факторов роста в своих клетках связана в основном с целостностью мембран клеток эпителия амниотической оболочки. Целые неповрежденные клетки выступают в роли своеобразных поставщиков биологически активных веществ во внеклеточное пространство, которым является зона нахождения криоАМ, в частности, в месте оперативного вмешательства. С увеличением времени нахождения криоАМ в зоне операции, роль этой ткани как поставщика биоактиваторов роста клеток в прилежащие ткани глаза существенно снижается. Только жизнеспособные клетки выполняют функцию секреции клеточных факторов роста и особенно нейротрофинов [3]. Поэтому выяснение того, насколько жизнеспособными являются клетки эпителия после процедуры криоконсервирования, очень важно. Известно, что клетки АМ в процессе жизнедеятельности способны синтезировать и секретировать клеточные факторы роста во внешнюю среду [4, 5]. Эта клеточная функция может сохраняться в живых клетках длительное время. Наиболее характерным показателем процесса и секреции нейротрофинов является одна из первых стадий синтеза белков, это синтез специфической РНК для последующего синтеза молекулы белка нейротрофина.

**Целью работы** являлось изучение в эксперименте активности гена нейротрофина BDNF при использовании криоконсервированной АМ в послеоперационном периоде после антиглаукоматозной операции.

### Методика измерения экспрессии РНК нейротрофического фактора BDNF:

Экспрессия м-РНК ростового фактора BDNF в ткани АМ, использованной при АГО в различные сроки после операции, была исследована методом ПЦР на компьютеризированном амплификаторе-термоциклере «Терцик» (Россия). Суммарная фракция нуклеиновых кислот из гомогената ткани амниотической мембраны или тканей глаза была экстрагирована набором фирмы «Амплисенс» (Россия) в соответствии с инструкцией производителя. После выделения из суммарной РНК брали аликвоту, содержащую 1 мкг РНК и обрабатывали раствором ДНКазы тип 1 в концентрации 1 единица на 10 мкл среды инкубации при комнатной температуре 15 минут и затем использовали в одностадийной реакции обратной транскрипции с олигонуклеотидными праймерами и готовой тест-системой для обратной транскрипции производства фирмы «Амплисенс» (Россия). В процессе инкубации в течение 30 минут при 37°C получали к-ДНК, которая в дальнейшем использовалась в ПЦР с набором праймеров для гена BDNF – F:ATGACCATCCTTTTCCTTACTATGGT; R:TCTTCCCCTTTTAATGGTCAATGTAC с температурой отжига 52°C и продуктом реакции длиной 741 пар нуклеотидов [2]. Для проведения ПЦР использовали универсальную тест-систему с Taq-полимеразой производства фирмы «Амплисенс» (Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Полученные в реакции ампликоны визуализировали методом электрофоретического разделения и окраски этидием бромидом с последующим проявлением флуоресценции на трансиллюминаторе с длиной волны 340 нм.

**Результаты и их обсуждение.** На начальных этапах эксперимента мы ограничились изучением образования специфической м-РНК--BDNF в замороженной АМ по 2-х этапному режиму замораживания. Для сравнения была взята та же нативная ткань АМ до замораживания.

Установлено, что уровень экспрессии гена BDNF достаточно высокий в нативной ткани АМ как свежесыведенной, так и замороженной по 2-х этапной программе (рис 1). Эффективной, как нами установлено, оказалась программа состоящая из 2-х этапов. На первом этапе АМ охлаждалась со скоростью от 3 до 5°C в минуту, после охлаждения до температуры -30°C ткань АМ далее замораживалась погружением в жидкий азот.



Рис. 1. Данные электрофореза ПЦР-продукта гена BDNF нативной АМ (А) и крио АМ (Б), замороженной по 2-х этапной программе, и до (2) и после инкубации в течение 3 суток (3) в среде Хэнкса, холостая проба на наличие в среде инкубации примесей РНК (1)

Известно, что метод ПЦР в применении к оценке активности гена в основном является качественным, поскольку оценивает наличие или отсутствие продукта работы гена м-РНК по синтезу к-ДНК, поэтому в полной мере количественно оценить прямую пропорциональную зависимость активности гена и его продуктов м РНК не представляется возможным. С другой стороны, существует безусловная пропорциональная зависимость активности гена и его продукта м-РНК и окраски полос к-ДНК в геле, то есть чем более активен ген и синтез м-РНК, тем более интенсивная окраска к-ДНК наблюдается в геле после оценки продуктов полимеразной цепной реакции. Таким образом, результат является в основном качественным, и свидетельствует о том, что в ткани амниона имеются живые клетки, в которых происходит процесс синтеза нуклеиновых кислот и белков, а в дальнейшем возможна секреция нейротрофинов во внеклеточную среду. Важно отметить, что у замороженно-отогретой АМ уровень экспрессии гена BDNF несколько снижается, но остается на достаточно высоком уровне. Для эффективного использования криоАМ после АГО в тканях глаза наиболее значимым является сохранение жизнеспособных клеток в ткани на протяжении длительного времени в течение нескольких суток. Было установлено, что в криоконсервированной АМ после размораживания сохраняется активность гена нейротрофинов, в условиях, которые в какой-то степени моделируют нахождение криоконсервированной АМ в тканях глаза. КриоАМ после размораживания инкубировалась длительное время в растворе Хэнкса (условия моделирующие операцию *in vitro*). При этом в ней сохраняется в значительной степени активность гена BDNF (рис. 1). Это свидетельствует о возможности поступления из жизнеспособных клеток криоАМ в ткань глаза нейротрофических факторов на протяжении 21 суток. Таким образом, применение криоАМ обеспечивает выделение факторов роста и нейротрофинов сразу после деконсервации, а также на протяжении длительного периода. Полученные данные позволили обосновать использование АМ при экспериментальной АГО с нейропротекторной целью.

Данные по измерению содержания факторов роста в различных тканях глаза на протяжении 14 суток косвенно указывают на то, что применение криоконсервированной АМ, помещённой на рваную поверхность после АГО, содержит жизнеспособные клетки, которые могут секретировать значимые количества BDNF и TGFb. Для живых клеток одним из наиболее показательных является наличие синтеза белков, начальным этапом которого есть синтез РНК. Нами были проделаны в динамике до 21 суток исследования методом RT-PCR по обнаружению в криоАМ в месте АГО, матричной РНК, специфичной для нейронального фактора роста BDNF (рис. 2).



Рис. 2. Экспрессия мРНК нейротрофического фактора роста (BDNF) в тканях глаза после применения криоконсервированной АМ при АГО в разные сроки послеоперационного периода:  
 1– нативная АМ (контроль); 2– криоконсервирование по 2-х этапной программе в 10% ДМСО;  
 3– криоконсервирование погружением в жидкий азот

По наличию м-РНК—BDNF показано, что имеет место синтез этого фактора роста. Причём имеется зависимость от сроков применения криоконсервированной АМ при АГО. Так при сроках 1-7 суток интенсивность полосы РНК в контроле и криоконсервированной АМ соизмерима, что свидетельствует о достаточно активных процессах синтеза. Однако, к 21 суткам интенсивность полосы РНК существенно снижается, особенно в отрицательном контроле (неоптимально замороженная крио АМ), что демонстрирует процесс прекращения синтеза факторов роста и их секреции.

Таким образом, согласно наличию полосы м-РНК, соответствующей фактору роста BDNF, в образцах ткани глаза в месте нахождения АМ в зоне лимба можно заключить, что на протяжении всего срока наблюдения до 21 суток имеются жизнеспособные клетки АМ, которые способны к секреции ростовых факторов. Важно отметить, что интенсивность синтеза этих факторов у криоконсервированной АМ всё-таки ниже, чем в контрольной АМ. При использовании АМ после неоптимального режима замораживания процесс синтеза и секреции BDNF существенно снижен, особенно по сравнению с благоприятным 2-х этапным режимом замораживания в 10% ДМСО, который обеспечивает, судя по интенсивности полосы м-РНК BDNF хорошую сохранность клеток АМ на протяжении по крайней мере 21 суток.

КриоАМ при нахождении в месте послеоперационного дефекта может способствовать восстановлению нервных клеток путём использования репаративных нейротрофинов: NGF и BDNF. Показано экспериментально, что АМ содержит большое количество NGF и BDNF, что имеет приоритетное значение в NGF-сигнальной системе для лимбальных эпителиальных клеток в культуре. Особенно важен этот эффект при постоянной секреции месте нахождения крио АМ нейротрофинов в динамике на протяжении нескольких недель, как показано нами на экспрессии м-РНК-BDNF.

Отмеченный нами эффект влияния криоАМ на синтез нуклеиновых кислот уже был отмечен рядом авторов. Показано, что АМ может усиливать экспрессию м-РНК ИЛ-1 рецепторного антагониста и ИЛ-10 [5]. Также показано, что АМ существенно снижает путем ингибирования транскрипции специфической РНК иммуномодуляторов ИЛ-1a и ИЛ-1b ингибитором, выделяемым из амниона [6].

Таким образом, нами доказан эффект экспрессии м-РНК – BDNF в криоАМ и это в определенной степени означает, что в криоАМ на протяжении длительного времени до 21 суток сохраняется секреторная активность ткани в отношении нейротрофинов, что является по всей видимости доказательством наличия в криоАМ жизнеспособных клеток. Вопросы, относящиеся к проблеме наличия живых клеток в криоконсервированной АМ всё ещё подвергаются дискуссиям. По мнению ряда авторов криоконсервированная АМ имеет 50% живых клеток, отмечается, что более 50% клеток в криоконсервированной АМ остаются живыми до 2 месяцев и растут в культуре [7].

Способность жизнеспособных клеток криоАМ к продукции нейротрофических факторов является обоснованием нейротрофического репаративного действия криоАМ при антиглаукоматозных операциях.



### Литература

1. Kim J.C., Tseng S.C. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas // *Cornea*. — 1995. — Sep; 14(5). — P. 473-484.
2. Kanuga N., Winton H.L., Beauchene L., et al Characterization of genetically modified human retinal pigment epithelial cells developed for in vitro and transplantation studies // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2002. — V. 43. — P. 546-555.
3. Милюдин Е. С. Амниопластическая хирургия в комплексном лечении эпителиальной патологии переднего отдела глаза: дисс. док. мед. наук, автореферат. — Самара, 2007. — С. 50.
4. Solomon A., Touhami A., Sandoval H., et al. Neurotrophic keratopathy: basic concepts and therapeutic strategies // *Comp. Ophthalmol.* — Update 2000. — P. 165-174.
5. Yam H.F., Pang C.P., Fan D.S., Fan B.J., Yu E.Y., Lam D.S. Growth factor changes in ex vivo expansion of human limbal epithelial cells on human amniotic membrane // *Cornea*. — 2002. — Jan, v. 21(1). — P. 101-105.
6. Abraham S., Rosenblatt M., Monroy D., et al Suppression of interleukin 1 $\beta$  and interleukin 1 $\alpha$  in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix // *Br. J Ophthalmol.* — 2001. — V. 85. — P. 444-449.
7. Kubo M., Sonoda Y., Muramatsu R., Usui M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation // *Invest. Ophthalmol. Vis Sci.* — 2001. — V. 42. — P. 1539-1546.

## ACTIVITY GROWTH FACTOR GENE BDNF IN CRYOPRESERVED AMNIOTIC MEMBRANE OF HUMAN PLACENTA USE AT ANTIGLAUCOMATOUS OPERATIONS

**V.V. RYAZANTSEV<sup>1</sup>**

**YU.A. DEMIN<sup>2</sup>**

**I.L. KAZMIRUK<sup>2</sup>**

*<sup>1)</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine NASU, Kharkov*

*<sup>2)</sup>Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education, Kharkov*

*e-mail: vvryaz@i.ua*

The article presents the study of gene neurotrophin BDNF activity in the experiment using cryopreserved amnion in the postoperative period after antiglaucoma surgery. Shows the effect of RNA expression of the brain growth factor gene (BDNF) in cells cryopreserved amnion. This means that in cryo AM over time up to 21 days may be saved processes of nucleic acid synthesis and secretory activity of the tissue against the neurotrophins, that is likely to prove the presence of live cells cryopreserved amnion.

Keywords: tissue engineering, cryopreservation amnion, brain growth factor gene (BDNF), glaucoma surgery.