

УДК 57.063.8:591.465.12

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2026-1-86-95>

Оценка риска вертикального переноса аденоассоциированного вектора химерного серотипа РНР.eВ в ооциты мышей

Маликова А.Д.¹, Жанатаев А.К.¹, Есмагамбетов И.Б.², Анисина Е.А.¹, Плигина К.Л.¹, Чайка З.В.¹, Рябова Е.И.², Довгий М.А.², Хоссаин Р.М.², Дурнев А.Д.¹, Дорофеев В.Л.¹

¹ Федеральный исследовательский центр (ФИЦ) оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий
Россия, 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8

² Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии (НИЦЭМ) им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи
Россия, 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, 18

РЕЗЮМЕ

Цель. Оценить риск вертикального переноса аденоассоциированного вирусного вектора химерного серотипа РНР.eВ в половые клетки самок мышей на основе разработки оригинального способа получения ооцитов мышей, неконтаминированных соматическими клетками и свободными векторными частицами.

Материалы и методы. Исследуемый вектор вводили внутривенно самкам аутбредных мышей CD-1 в дозе 5×10^{10} векторных геномов на мышшь. Использовали оригинальную методологию, включающую гормональную суперовуляцию экспонированных животных, выделение ооцитов, их очистку от контаминирующих соматических клеток и прямую количественную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) на лизированных ооцитах. Содержание векторной ДНК в ткани головного мозга, яичников и в ооцитах оценивали на 1, 3, 7, 14, 30 и 90-е сут после введения вектора.

Результаты. С использованием разработанного подхода исследована способность к вертикальному переносу в ооциты мышей аденоассоциированного вирусного вектора химерного серотипа РНР.eВ. Установлено, что несмотря на персистенцию в ткани головного мозга и яичников до 3 мес, векторная ДНК не выявляется в ооцитах ни на одном из сроков после введения вектора.

Заключение. Полученные данные демонстрируют отсутствие вертикального переноса в ооциты мышей исследуемой генной конструкции. Выявление аденоассоциированного вектора в яичниках при его обнаружении в ооцитах подтверждает эффективность разработанной методики получения ооцитов мышей, неконтаминированных соматическими клетками.

Ключевые слова: аденоассоциированный вектор, химерный серотип РНР.eВ, вертикальный перенос, ооциты, мыши, прямая ПЦР

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках финансирования по теме «Технологии сбережения здоровья на основе методологии доклинических исследований безопасности лекарственных средств» (№ FGFG2025-0003).

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий (протокол № 3 от 21.02.2024).

Для цитирования: Маликова А.Д., Жанатаев А.К., Есмагамбетов И.Б., Анисина Е.А., Плигина К.Л., Чайка З.В., Рябова Е.И., Довгий М.А., Хоссаин Р.М., Дурнев А.Д., Дорофеев В.Л. Оценка риска вертикального переноса аденоассоциированного вектора химерного серотипа РНР.eВ в ооциты мышей. *Бюллетень сибирской медицины*. 2026;26(1):86–95. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2026-1-86-95>.

✉ Маликова Александра Дмитриевна, malikova_ad@academpharm.ru

Risk assessment of germline transmission of adeno-associated virul vector of chimeric serotype PHP.eB into mouse oocytes

Malikova A.D.¹, Zhanataev A.K.¹, Esmagambetov I.B.², Anisina E.A.¹, Pligina K.L.¹, Chaika Z.V.¹, Ryabova E.I.², Dovgiy M.A.², Hossain R.M.², Durnev A.D.¹, Dorofeev V.L.¹

¹ Federal State Budgetary Research Institution Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies
8 Baltiyskaya St., 125315 Moscow, Russian Federation

² Federal State Budgetary Institution Gamaleya National Center for Epidemiology and Microbiology
18 Gamaleya St., 123098 Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To assess the risk of germline transmission of an adeno-associated virul vector of the chimeric serotype PHP.eB into the germ cells of female mice based on the development of an original method for obtaining mouse oocytes devoid of somatic cells and free vector particles.

Materials and methods. The vector under study was administered intravenously to female outbred CD-1 mice at a dose of 5×10^{10} vector genomes/mouse using an original technique which included hormonal superovulation of exposed animals, oocyte isolation, their purification from contaminating somatic cells, and direct quantitative PCR on lysed oocytes. The vector DNA content in the brain tissue, ovaries, and oocytes was assessed on days 1, 3, 7, 14, 30, and 90 after vector administration.

Results. Using the developed technique, we examined the ability of the adeno-associated virus vector of the chimeric serotype PHP.eB to undergo germline transmission into mouse oocytes. It was established that, despite persistence in brain and ovarian tissue for up to 3 months, vector DNA was not detected in oocytes at any time after vector administration.

Conclusion. The obtained data demonstrate the absence of germline transmission of the studied genetic construct into mouse oocytes. The detection of the adeno-associated vector in the ovaries, despite its absence in oocytes, confirms the effectiveness of the developed technique for obtaining mouse oocytes uncontaminated with somatic cells.

Keywords: adeno-associated vector, chimeric serotype PHP.eB, germline transmission, oocytes, mice, direct PCR

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. This study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation as part of the research project "Health Preservation Technologies Based on the Methodology of Preclinical Studies of Drug Safety" (No. FGFG 2025-0003).

For citation: Malikova A.D., Zhanataev A.K., Esmagambetov I.B., Anisina E.A., Pligina K.L., Chaika Z.V., Ryabova E.I., Dovgiy M.A., Hossain R.M., Durnev A.D., Dorofeev V.L. Risk assessment of germline transmission of adeno-associated virul vector of chimeric serotype PHP.eB into mouse oocytes. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2026;26(1):86–95. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2026-1-86-95>.

ВВЕДЕНИЕ

Генная терапия – передовой инновационный способ лечения наследственных, онкологических, сердечно-сосудистых, гематологических и других заболеваний путем восстановления в клетках функций дефектных генов или экспрессии новых генов с помощью генно-инженерных конструкций на основе рекомбинантных нуклеиновых кислот [1, 2]. Прове-

дение генной терапии, подобно любой лекарственной терапии, сопряжено с определенными рисками, специфичными природе действующего агента. Для генотерапевтических препаратов на основе ДНК, предназначенных к проведению терапии *in vivo*, одним из потенциальных и значимых с точки зрения безопасности является риск вертикального (непреднамеренного) переноса последовательностей векторной ДНК в половые клетки [3–5]. Обнаружение

способности к вертикальному переносу ограничивает применимость генотерапевтического препарата у лиц с репродуктивным потенциалом [6, 7].

Согласно нормативным руководствам, если при исследовании биораспределения векторная ДНК в гонадах выявляется в трех последовательных временных точках (персистирует), необходимо проведение дополнительных исследований с целью определения ее трансдукции непосредственно в половые клетки [7–9]. О необратимости трансдукции и, соответственно, высоком риске вертикального переноса свидетельствует персистенция векторной ДНК в сперматозоидах в течение более трех циклов сперматогенеза [8, 9]. Выявление векторной ДНК в ооцитах на любом из сроков экспозиции рассматривается как высокий риск вертикального переноса, поскольку воздействию подвергается весь не обновляемый овариальный резерв [8, 9].

Несмотря на строгие нормативные ограничения к проведению генной терапии при выявлении риска вертикального переноса, на сегодняшний день не существует научно обоснованной стандартизированной методологии его оценки. Проблема особенно актуальна для женских половых клеток, поскольку в отличие от мужских половых клеток оценка риска для них может основываться исключительно на данных доклинических исследований [9]. В руководстве ЕМА отдельно отмечено, что разработка и валидация экспериментальных моделей на животных для этих целей является актуальной задачей [9].

Для идентификации целевых последовательностей ДНК в половых клетках рекомендуется использование методов амплификации нуклеиновых кислот – полимеразной цепной реакции (ПЦР) или более чувствительной количественной ПЦР [9]. В качестве альтернативы допускается использование метода гибридизации *in situ* или иммуногистохимии при надлежащем подтверждении их чувствительности и надежности [9]. Однако эти методы затратны, трудоемки и плохо поддаются стандартизации. Основным недостатком методов, основанных на ПЦР, является высокий риск ложноположительных результатов вследствие контаминированности половых клеток при стандартных методах выделения свободными векторными частицами и (или) соматическими клетками – сперматозоидов клетками эпидидимиса и семявыводящих путей, ооцитов кумулюсными клетками ооцит-кумуляного комплекса. В случае ооцитов анализ усложняется также крайне малым количеством клеточного материала для анализа.

Целью настоящего исследования явилась оценка риска вертикального переноса аденоассоциирован-

ного вирусного вектора химерного серотипа РНР.еВ в половые клетки самок мышей на основе разработки оригинального способа получения ооцитов мышей, неконтаминированных соматическими клетками и свободными векторными частицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение векторных частиц

В работе был использован рекомбинантный аденоассоциированный вирус rAAV9RHPeB-CASI-Luc, представляющий собой ААВ химерного серотипа РНР.еВ, полученный в лаборатории доктора Вивияны Градинару [10] и несущий ген люциферазы светлячка под контролем модифицированного промотора куриного бета-актина (CASI).

Препарат rAAV9RHPeB-CASI-Luc получали с использованием плазмид rAAV-CASI-Luc, rAAV2/9-RHPeB и pHelper Vector (Cell Biolabs, США). rAAV-CASI-Luc получали при помощи синтеза последовательности промотора CASI вместе с сайтами клонирования и последовательностью WPRE и сигнала полиаденилирования в ЗАО «Евроген» (Россия) и последующим клонированием синтезированной последовательности в плазмиду rAAV-CMV-Vector (Cell Biolabs, США) между левым и правым ITR, заменяя имеющуюся экспрессионную кассету и дальнейшим клонированием кодон-оптимизированной последовательности гена люциферазы светлячка, использованного нами в предыдущем исследовании [11], между последовательностью промотора CASI и последовательностью элемента WPRE. Плаزمиды rAAV2/9-RHPeB была получена на основе плазмиды rREPCAP2/9 при помощи инсерционного мутагенеза методом ПЦР с использованием специфических праймеров, для внесения соответствующих аминокислотных замен в последовательность белков капсида ААВ серотипа 9 [10].

Для получения вектора использовали клеточную линию НЕК293 (из коллекции клеточных культур ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). Культивирование и трансфекцию проводили в адгезионных условиях при 37 °С и 5%-м CO₂, как описано ранее [12, 13]. Очистку вирусных препаратов проводили с использованием аффинной хроматографии (AC) на сорбенте POROS™ CaptureSelect™ AAVX Affinity Resin (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя. Дополнительную очистку и замену буфера проводили при помощи эксклюзионной хроматографии (SEC) на колонке XK 26/100, упакованной сорбентом Superdex 200 (Cytiva, США). Финальное формулирование вектора проводили на центрифужных концентраторах 100 кДа Amicon Ultra-15 (Merck, США). Оценку количе-

ства вирусных геномов в препарате проводили, как описано ранее [11–13].

Работа с лабораторными животными

Исследование проводилось на половозрелых самках аутбредных мышей CD-1 массой 20–22 г в возрасте 8–9 нед, полученных из питомника Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства, филиал «Андреевка». Животные содержались в условиях вивария ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий при 12-часовом световом цикле, свободном доступе к воде и стандартному полнорационному корму. Условия содержания животных и работы с ними соответствовали требованиям Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета ЕС о защите животных, используемых в научных целях, и рекомендацией № 33 Евразийской экономической комиссия от 14 ноября 2023 г. «Руководство по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований».

Введение вектора мышам

Суспензию векторных частиц в дозе 5×10^{10} векторных геномов на мышь в объеме 50 мкл вводили мышам в латеральную хвостовую вену со скоростью 70 мкл/мин с помощью шприцевой помпы MD-1001 BASi Bee Baby syringe drive (BASi Corporate Headquarters, США).

Было сформировано семь групп по 5–6 мышей в каждой: I (контрольная), II (1 сут после введения), III (3 сут после введения), IV (7 сут после введения), V (14 сут после введения), VI (1 мес после введения) и VII (3 мес после введения). Мышам группы II за 48 ч до инъекции вектора вводили гонадотропин сыворотки жеребых кобыл (ГСЖК, Folligon, MSD Animal Health, Голландия) в дозе 5 МЕ/мышь. Через 7 ч после инъекции вектора мышам вводили хорионический гонадотропин человека (ХГЧ, PG600, MSD Animal Health, Голландия) в дозе 5 МЕ/мышь и подвергали эвтаназии через 17 ч. Мышам группы III ГСЖК вводили одновременно с инъекцией вектора. Через 55 ч мышам вводили хорионический гонадотропин (ХГЧ) и подвергали эвтаназии через 17 ч. Мышам групп I, IV, V, VI и VII за 65 и 17 ч до эвтаназии вводили, соответственно, ГСЖК и ХГЧ.

Выделение и очистка ооцитов

Животных умерщвляли дислокацией шейных позвонков. Яичники с яйцеводами переносили в нанесенные на чашку Петри капли среды M2 (Sigma-Aldrich, США) и под стереомикроскопом (Stemi DV4, Carl Zeiss, Германия) с помощью препаровальной

иглы вскрывали ампулы яйцеводов. Для денудации вышедшие в ооцит-кумуляном комплексе ооциты микрокапиллярной пипеткой (EZ-Grip, RI, Великобритания) переносили в каплю (100 мкл) среды, содержащую 150 МЕ/мл гиалуронидазы Тип II (Sigma, США), и инкубировали 20 мин при комнатной температуре. Ооциты отмывали от фермента и кумулюсных клеток путем последовательного переноса через 6–8 капель свежей среды M2. Для удаления зоны пеллюцида ооциты инкубировали в 0,025%-м растворе коллагеназы Тип I (Sigma-Aldrich, США) в течение 20 мин с последующей последовательной отмывкой от фермента в 6–8 каплях среды M2.

Для финальной очистки от кумулюсных клеток ооциты переносили в нижнюю часть капли Percoll (Sigma-Aldrich, США) различной концентрации (10–70%) на чашке Петри и аккуратно круговыми движениями кончика микрокапилляра перемешивали (рис. 1). После всплытия на поверхность капли (в течение ~10 мин) ооциты отбирали и переносили в свежую каплю Percoll и процедуру повторяли. После ооциты отмывали в капле фосфатно-солевого буфера (рН 7,4), переносили в минимальном объеме буфера в микропробирки, замораживали и хранили при -20°C до проведения ПЦР в реальном времени. Для определения контаминированности соматическими клетками часть ооцитов фиксировали, окрашивали и микроскопировали в соответствии с ранее описанной методикой [14].

Из яичников с яйцеводами после высвобождения ооцит-кумуляных комплексов выделяли тотальную ДНК с использованием набора D-Tissues (компания «Биолабмикс», Россия). Концентрацию выделенной ДНК в пробах определяли с помощью набора dsDNA BR kit на минифлуориметре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США). ДНК замораживали и хранили при -20°C до проведения ПЦР в реальном времени (рис. 1).

Проведение ПЦР в реальном времени

Для детекции последовательностей ДНК использовали метод прямой ПЦР на лизированных ооцитах [15]. Для этого микропробирки с суспензией ооцитов размораживали, вносили равный объем лизирующего раствора (500 мкг/мл полиадениловой кислоты, 20 мМ EDTA- Na_2 , 500 мМ дитиотреитола и 1% N-лаурилсаркозина) и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. После лизата тщательно ресуспендировали и использовали для ПЦР. Для определения эффективности прямой ПЦР на лизированных ооцитах проводили реакцию на последовательность генов ядерной (*Ptger2*) и митохондриальной ДНК (*Cox-1*) мыши. Последовательности праймеров приведены в табл. 1.

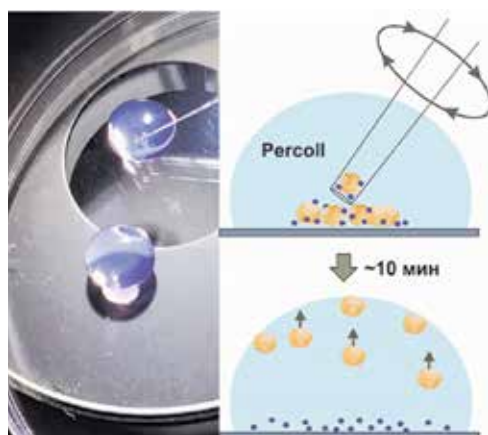


Рис. 1. Сепарация ооцитов и кумулюсных клеток в капле Percoll. На чашку Петри из полистирола наносится капля (100 мкл) раствора Percoll, в нижнюю часть которой переносят ооциты. Кончиком микрокапилляра, расположив его под углом ~60°, аккуратно круговыми движениями ооциты распределяют по всей нижней части капли. Через ~10 мин с поверхности капли отбирают всплывшие ооциты

На амплификаторе QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США) проводили ПЦР в реальном времени. Реакционная смесь включала 1X смеси qPCRmix-NS LowROX (ЗАО «Евроген», Россия), 2 мкМ SYBR

Green I, по 500 нМ прямого и обратного праймеров (ДНК-синтез, Россия), 5 мкл суспензии лизированных ооцитов или 4 нг выделенной из яичников ДНК (контроль ПЦР).

Температурно-временной профиль реакции: 98 °С – 1 мин; 35 циклов (98 °С – 10 с, 61°С – 30 с, 72°С – 15 с); кривая плавления 65–95°С – 1 мин (режим HRM – 20 чтений на 1°С). Эффективность ПЦР (E , %) рассчитывали по формуле:

$$E = (10^{(-1/a)} - 1) \times 100,$$

где a – наклон линии регрессии, описывающей зависимость порогового цикла C_q от логарифма количества ооцитов в реакции (5, 10, 20, 40, 80 и 160 ооцитов в реакции).

Для выявления векторной ДНК в яичниках и ооцитах использовали праймеры, специфичные к последовательности клонированного в вектор гена люциферазы (см. табл. 1).

Реакционная смесь включала 1X смеси BioMaster UDG HS-qPCR Lo-ROX SYBR (2×) (компания «Биолабмикс», Россия), по 600 нМ прямого и обратного праймеров («ДНК-синтез», Россия), 4 нг выделенной из яичников ДНК или 5 мкл суспензии лизированных ооцитов.

Таблица 1

Использованные в исследовании праймеры для ПЦР в реальном времени			
Ген		Последовательности праймеров	Длина продукта, п.о.
<i>Ptger2</i>	прямая	5'-CCTGCTGCTTATCGTGGCTG-3'	186
	обратная	5'-GCCAGGAGAATGAGGTGGTC-3'	
<i>Cox-1</i>	прямая	5'-ATTACAGCCGACTGCTCCTAT-3'	150
	обратная	5'-CCCAAAGAATCAGAACAGATGC-3'	
<i>Luc</i>	прямая	5'-GAGGCGAACTGTGTGTGAGA-3'	149
	обратная	5'-GTGTTCGTCTTCGTCCCAGT-3'	

Температурно-временной профиль реакции: антиконтаминационная обработка – 2 мин; 95 °С – 5 мин; 40 циклов: (95 °С – 15 с, 62 °С – 15 с, 72 °С – 15 с); кривая плавления 65 – 95 °С – 1 мин (режим HRM – 20 чтений на 1°С). Количество копий векторного генома на мкг тотальной ДНК (яичники) или на гаплоидный геном (ооциты) определяли на основе калибровочной кривой, построенной с использованием контрольных растворов с известной концентрацией вектора. Эффективность ПЦР вычисляли по формуле, приведенной выше. Влияние матрицы (matrix effect) и показатель извлечения (recovery) определяли в соответствии с рекомендациями [16]. Амплификацию целевой последовательности ДНК подтверждали по кривой плавления продукта.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У лабораторных мышей в зависимости от линии и возраста за один эстральный цикл овулирует 8–12 ооцитов [17]. Для получения большего количества

ооцитов проводят гормональную суперовуляцию последовательным введением ГСЖК, стимулирующего рост фолликул, и ХГЧ, возобновляющего мейотическое деление ооцитов и вызывающего овуляцию [15]. У самок мышей CD-1 в условиях суперовуляции количество овулировавших ооцитов составило $20,1 \pm 6,4$ на мышшь.

При стандартной процедуре выделения после денудации суспензии ооцитов с сохранной зоной пеллюцида содержат большое количество кумулюсных клеток (рис. 2, а). Удаление зоны пеллюцида с последующей многократной отмывкой значительно снижает контаминацию, однако полностью очистить суспензию от кумулюсных клеток не удается (рис. 2, б), поскольку отбор и перенос ооцитов микрокапилляром производится в небольшом количестве среды или буфера. В работе Н. Okada и соавт. [18] для очистки оплодотворенных *in vitro* ооцитов и двухклеточных эмбрионов мыши от кумулюсных клеток и сперматозоидов был предложен метод цен-

трифугирования в 22,5%-м растворе Percoll. Данный подход оказался неприменим в случае неоплодотворенных ооцитов с удаленной зоной пеллюцида – центрифугирование в Percoll приводило к потере >90% ооцитов вследствие их механического разрушения (собственные данные).

В настоящей работе был апробирован подход, предполагающий сепарацию ооцитов и кумулюсных клеток за счет различий в плавучести в капле Percoll (см. рис. 1). В 10%, 20%, 30% и 40%-м Percoll ооциты оставались в нижней части капли, тогда как в 50%, 60% и 70%-м Percoll в течение ~10 мин всплывали

и удерживались на поверхности капли. Кумулюсные клетки во всех растворах Percoll оставались в нижней части капли. Отбор ооцитов с поверхности капли микрокапилляром оказался наиболее удобным при использовании 70%-го Percoll, что обусловлено снижением поверхностного натяжения раствора Percoll с увеличением его плотности. Для оценки контаминации провели серию из четырех экспериментов с очисткой ооцитов в 70%-м Percoll (суммарно на 119 ооцитах). Ни в одном случае на микропрепаратах ооцитов после их очистки кумулюсные клетки не обнаруживались (рис. 2, с).

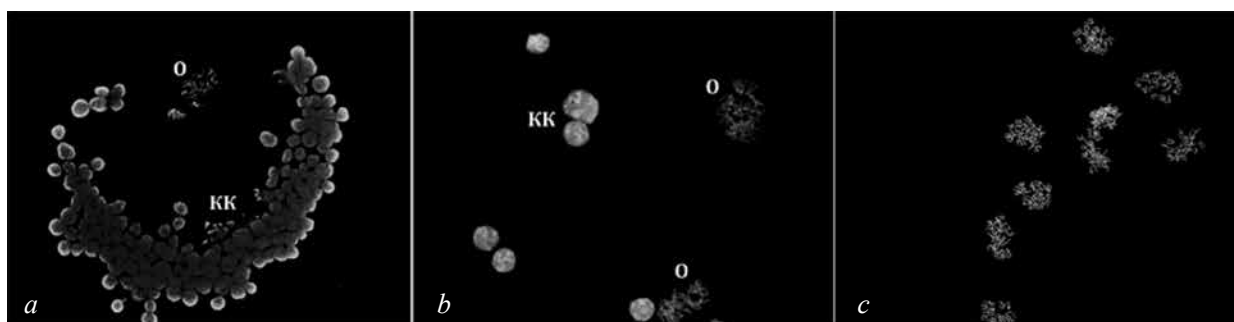


Рис. 2. Цитогенетические препараты ооцитов мыши: *a* – без удаления зоны пеллюцида, *b* – после удаления зоны пеллюцида, *c* – после отмывки в 70%-м растворе Percoll; О – ооцит (метафаза МII), КК – кумулюсные клетки. Окраска Hoechst 33258; ×400

Ввиду ограниченного количества материала традиционные методы выделения ДНК для проведения ПЦР в случае ооцитов мало применимы. Подходом для определения последовательностей ДНК (или РНК) в ооцитах может служить проведение прямой ПЦР непосредственно на лизированных клетках. Такой подход позволяет анализировать весь пул выделенных клеток без потерь, что повышает точность и чувствительность детекции. Был использован предложенный S. Tsuchiya и соавт. [15] «spanning» протокол, предусматривающий лизирование клеток и депротеинизацию ДНК детергентом N-лаурилсаркозином в концентрации, не ингибирующей ПЦР.

Авторами была показана высокая эффективность и низкая доля (%) ложных реакций при использовании протокола для амплификации участков ДНК в единичных бластомерах и лимфоцитах.

Эффективность амплификации для лизата ооцитов составила 98,2 и 90,3%, соответственно, для генов митохондриальной (*Cox-1*) и ядерной ДНК (*Ptger2*). Более высокая эффективность и ранние пороговые циклы амплификации гена *Cox-1* обусловлены большим количеством копий митохондриальной ДНК (200–400 тыс.) в зрелых ооцитах [19]. ПЦР на ген *Ptger2* была линейной ($R^2 = 0,975$) при количестве ооцитов в реакции от 5 до 160 (рис. 3).

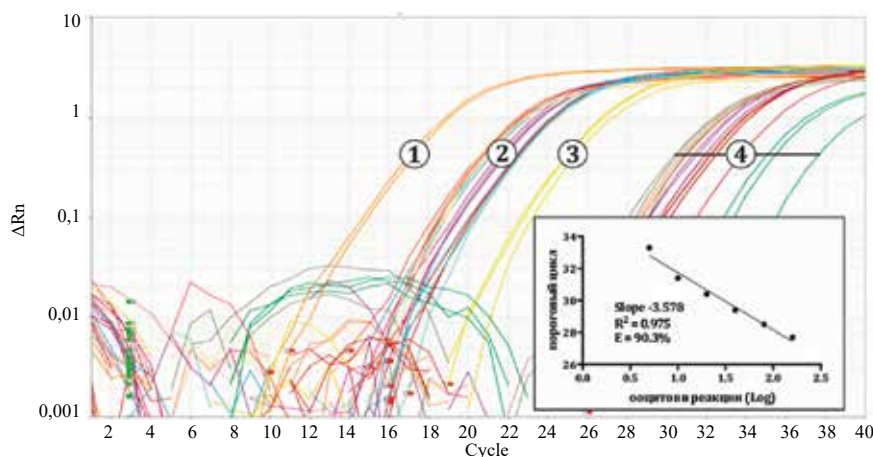


Рис. 3. Кривые амплификации ДНК из яичников на ген *Ptger2* (1), лизата ооцитов на ген *Cox-1* (2), ДНК из яичников на ген *Cox-1* (3), лизата ооцитов на ген *Ptger2* (4): по оси X – цикл амплификации (cycle), по оси Y – нормированное изменение флуоресцентного сигнала на каждом цикле амплификации (ΔRn). Во врезке кривая зависимости порогового цикла от логарифма количества ооцитов в реакции для гена *Ptger2* (приведены наклон линии регрессии (slope), коэффициент корреляции (R^2) и эффективность реакции (E))

При количестве ооцитов менее 5 линейность реакции значительно снижалась, хотя идентифицируемый по кривой плавления продукта сигнал выявлялся при трех ооцитах в реакции, что соответствует теоретически достижимой чувствительности метода количественной ПЦР [16, 20].

Содержание векторной ДНК на различных сроках после введения вектора было схожим в ткани яичников и головного мозга мышей (рис. 4). На 1-е и 3-и сут копии векторных геномов выявлялись у всех экспонированных животных, на 7-е сут – у 5 из 6. Персистенция вектора в обеих тканях наблюдалась вплоть до 3 мес после введения. Ни у одного из животных векторная ДНК в ооцитах не обнаруживалась.

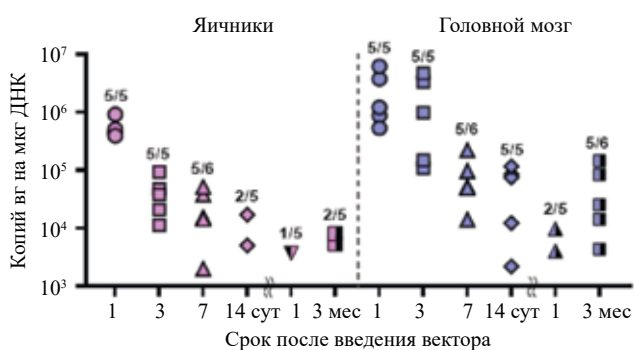


Рис. 4. Содержание векторных геномов (vg) в яичниках и головном мозге мышей: цифрами указано количество мышей, у которых обнаружена векторная ДНК, к общему количеству мышей в группе

ОБСУЖДЕНИЕ

Незрелые ооциты в примордиальных фолликулах яичников защищены от потенциально опасных агентов регулируемым транспортом через базальную мембрану и слой гранулезных клеток, а также отсутствием прямой васкуляризации [21]. По мере созревания ооцитов, сопровождающегося структурными и транспортными изменениями фолликул, происходит последовательное формирование гематофолликулярного барьера, включающего зону пеллюцида и кумулюсные клетки ооцита, гранулезные и текальные клетки антрума [21]. Теоретически «молекулярное сито» гематофолликулярного барьера непроницаемо для вирусных векторов в виду их значительных размеров (полная масса вириона >5 МДа) [22]. Вместе с тем установлено, что ААВ могут проходить через зону пеллюцида и трансдуцировать предимплантационные зародыши [23, 24]. При инъекции в строму яичников ААВ способны проходить через гематофолликулярный барьер путем транцитоза и трансдуцировать окружающие ооцит кумулюсные клетки [25]. В антральных фолликулах межклеточный обмен между ооцитом и соматиче-

скими клетками, помимо трансзональных проекций, осуществляется посредством циркулирующих в фолликулярной жидкости внеклеточных везикул (EVs), которые могут переносить в ооцит крупные молекулы и вирусы [21, 26]. Так, способность к вертикальному переносу в ооциты и эмбрионы человека установлена для вируса гепатита В [27]. Указанное в совокупности свидетельствует о потенциальном риске вертикального переноса в женские половые клетки вирусных и невирусных векторов и определяет необходимость разработки методологических подходов к его оценке. Для этой цели нами разработана и апробирована оригинальная методология, включающая гормональную суперовуляцию экспонированных вектором животных, выделение ооцитов, их очистку в капле Percoll и прямую количественную ПЦР лизированных ооцитов.

Проведение гормональной суперовуляции является важным этапом осуществления исследования. Эстральный цикл у мышей длится 4–5 сут и завершается овуляцией 8–12 ооцитов [15]. При гормональной стимуляции овуляция синхронизируется, позволяя получить в узком временном промежутке увеличенное количество ооцитов. Для максимальной эффективности рекомендуется спланировать эксперимент так, чтобы на момент индукции суперовуляции животные находились в фазе диэструса, когда яичники наиболее восприимчивы к гормональной стимуляции [28]. Помимо повышенного выхода ооцитов при суперовуляции происходит более чем 2-кратное увеличение размеров яичников и яйцеводов, что значительно упрощает их визуальную идентификацию и изъятие при некропсии.

Зрелые ооциты содержат значительное количество липидов в виде триглицеридов липидных капель и фосфолипидов мембран, суммарно составляющих от 10 до 30% сухой массы ооцита [29]. Это свойство, наряду с низкой плотностью цитоплазмы и большим размером, обеспечивает ооцитам плавучесть в растворах Percoll высоких концентраций, в которых соматические клетки и свободные частицы остаются неподвижными. Очистка в капле Percoll полностью удаляет контаминирующие ооциты кумулюсные клетки. Как отмечено выше, векторы способны трансдуцировать кумулюсные клетки, что может приводить к ложноположительным результатам. Проведение прямой количественной ПЦР без этапа выделения ДНК позволяет избежать потерь материала, что повышает точность и чувствительность анализа и снижает вероятность ложноотрицательных результатов [15, 16].

С использованием разработанной методологии был исследован ААВ химерного серотипа РНР.eВ,

способный эффективно преодолевать гематоэнцефалический барьер и трансдуцировать клетки головного и спинного мозга мышей. Выбор синтетического капсида ААВ был обусловлен тем, что в настоящее время инженерия ААВ активно развивается и с каждым годом появляется все больше вариантов искусственно созданных химерных серотипов ААВ, обладающих направленным тропизмом к определенным клеткам и тканям [30], а в 2024 г. препарат BEQVEZ™ (fidanacogene elaragovvec-dzkt) на основе химерного серотипа rh74var был одобрен для терапии гемофилии Б.

Таким образом, исследование тропизма и биораспределения химерных серотипов ААВ представляет особый научный интерес. Накоплено достаточно много данных об эффективности химерных капсидов семейства РНР для проникновения через гематоэнцефалический барьер у различных видов животных и даже линий мышей [31], однако данных о возможности таких химерных серотипов ААВ трансдуцировать ооциты и осуществлять вертикальный перенос не представлено. В настоящем исследовании исследуемый вектор персистировал до 3 мес как в целевой ткани головного мозга, так и в яичниках, однако в ооцитах векторная ДНК не выявлялась ни на одном сроке экспозиции. Данные свидетельствуют о низком риске вертикального переноса в женские половые клетки ААВ химерного серотипа РНР.eВ.

ААВ обладают высоким тропизмом к ткани яичников [32]. J. Zhao и соавт. исследовали биораспределение ААВ серотипа 9 у мышей методом высокоточной *in situ* гибридизации RNAscope® [33]. После внутривенного введения векторная ДНК обнаруживалась в мозговом веществе и желтом теле яичников, в текальных клетках фолликулов, но не в ооцитах. Вводимый внутривенно или в селезенку ААВ серотипа 2 детектировался в яичниках и семенниках мышей, но не передавался их потомству [34]. ААВ серотипа 8 персистировал в яичниках мышей в течение 150 сут после внутривенного введения [35]. Методом гибридизации *in situ* векторная ДНК была выявлена в ооцитах. Вместе с тем исследование потомства экспонированных вектором самок не подтвердило риска вертикального переноса, что ставит вопрос о точности и надежности для его оценки метода *in situ* гибридизации.

Таким образом, на сегодняшний день имеются лишь единичные исследования по оценке риска вертикального переноса вирусных и невирусных векторов в женские половые клетки, что очевидно связано с методологическими сложностями проведения таких исследований. Для этих целей может быть использована разработанная и описанная нами в настоящей работе методология.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и с использованием ААВ химерного серотипа РНР.eВ апробирована оригинальная методология доклинической оценки риска вертикального (непреднамеренного) переноса генетических конструкций в половые клетки самок мышей. Методология основана на методе прямой количественной ПЦР, обладает высокой чувствительностью, точностью и относительно низкой трудоемкостью, не требует специализированного оборудования и материалов. Может быть интегрирована в исследование биораспределения и при соответствующей адаптации использована в экспериментах на других видах млекопитающих.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Arabi F., Mansouri V., Ahmadbeigi N. Gene therapy clinical trials, where do we go? An overview. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022;153:113324. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113324.
2. Макаревич П.И. Три десятилетия развития генной терапии: вехи и перспективы. *Регенерация органов и тканей*. 2023;1(1):16–24. DOI: 10.60043/2949-5938-2023-1-16-24.
3. Bittlinger M., Hoffmann D., Sierawska A.K., Mertz M., Schambach A., Strech D. Risk assessment in gene therapy and somatic genome-editing: An expert interview study. *Gene and Genome Editing*. 2022;3–4:100011. DOI: 10.1016/j.ggedit.2022.100011.
4. Астапова О.В., Берчатов А.А. Генотерапевтические препараты: аспекты доклинического изучения безопасности. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2023;11(1):73–96. DOI: 10.30895/2312-7821-2023-11-1-329.
5. Moffit J.S., Blanset D.L., Lynch J.L., MacLachlan T.K., Meyer K.E., Whiteley L.O. et al. Regulatory consideration for the nonclinical safety assessment of gene therapies. *Hum. Gene Ther.* 2022;33(21–22):1126–1141. DOI: 10.1089/hum.2022.090.
6. ICH guideline S12 on nonclinical biodistribution considerations for gene therapy products (EMA/CHMP/ICH/318372/2021).
7. Quality, preclinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products – Scientific guideline. (EMA/CAT/80183/2014. EMA, 2018).
8. ICH Considerations. General principles to address the risk of inadvertent germline integration of gene therapy vectors (CHMP/ICH/469991/2006).
9. Non-clinical testing for inadvertent germline transmission of gene transfer vectors – Scientific guideline. (EMA/273974/2005. EMA, 2006).
10. Chan K.Y., Jang M.J., Yoo B.B., Ravi N., Wu W.L., Sanchez-Guardado L. et al. Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems. *Nat. Neurosci.* 2017;20(8):1172–1179. DOI: 10.1038/nn.4593.
11. Esmagambetov I.B., Ryabova E.I., Derkaev A.A., Shchelyakov D.V., Dolzhikova I.V., Favorskaya I.A. et al. rAAV expressing recombinant antibody for emergency prevention and long-term prophylaxis of COVID-19. *Front. Immunol.* 2023;14. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1129245.

12. Derkaev A.A., Ryabova E.I., Esmagambetov I.B., Shcheblyakov D.V., Godakova S.A., Vinogradova I.D. et al. rAAV expressing recombinant neutralizing antibody for the botulinum neurotoxin type A prophylaxis. *Front. Microbiol.* 2022;13:960937. DOI: 10.3389/fmicb.2022.960937.
13. Рябова Е.И., Деркаев А.А., Есмагамбетов И.Б., Щебляков Д.В., Довгий М.А., Бырихина Д.В. и др. Сравнение различных технологий получения рекомбинантного аденоассоциированного вируса в лабораторном масштабе. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2021;21(4):266–278. DOI: 10.30895/2221-996X-2021-21-4-266-278.
14. Плигина К.Л., Жанатаев А.К., Чайка З.В., Дурнев А.Д. Методика цитогенетического анализа ооцитов мышей. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2013;156(7):128–132. DOI: 10.1007/s10517-013-2292-0.
15. Tsuchiya S., Sueoka K., Matsuda N., Tanigaki R., Asada H., Hashiba T. et al. The “spanning protocol”: a new DNA extraction method for efficient single-cell genetic diagnosis. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2005;22(11–12):407–414. DOI: 10.1007/s10815-005-7482-x.
16. Ma H., Bell K.N., Loker R.N. qPCR and qRT-PCR analysis: Regulatory points to consider when conducting biodistribution and vector shedding studies. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2021;20:152–168. DOI: 10.1016/j.omtm.2020.11.007.
17. Martín-Coello J., Gonzalez R., Crespo C., Gomendio M., Roldan E.R.S. Superovulation and in vitro oocyte maturation in three species of mice (*Mus musculus*, *Mus spretus* and *Mus spicilegus*). *Theriogenology.* 2008;70(6):1004–1013. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.06.002.
18. Okada H., Hirose Y., Manonmani P., Ito M., Sankai T. Zona-float method for separating mouse eggs from other cells. *Exp. Anim.* 2004;53(4):355–359. DOI: 10.1538/expanim.53.355.
19. Mahrous E., Yang Q., Clarke H.J. Regulation of mitochondrial DNA accumulation during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse. *Reproduction.* 2012;144(2):177–185. DOI: 10.1530/REP-12-0113.
20. Forootan A., Sjöback R., Björkman J., Sjögreen B., Linz L., Kubista M. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomol. Detect. Quantif.* 2017;12:1–6. DOI: 10.1016/j.bdq.2017.04.001.
21. Andrade G.M., del Collado M., Meirelles F.V., da Silveira J.C., Perecin F. Intrafollicular barriers and cellular interactions during ovarian follicle development. *Anim. Reprod.* 16(3):485–496. DOI: 10.21451/1984-3143-AR2019-0051.
22. Zhou H., Ohno N., Terada N., Saitoh S., Fujii Y., Ohno S. Involvement of follicular basement membrane and vascular endothelium in blood follicle barrier formation of mice revealed by “in vivo cryotechnique.” *Reproduction.* 2007;134(2):307–317. DOI: 10.1530/REP-07-0062.
23. Krivonogova A.S., Bruter A.V., Makutina V.A., Okulova Y.D., Ilichuk L.A., Kubekina M.V. et al. AAV infection of bovine embryos: Novel, simple and effective tool for genome editing. *Theriogenology.* 2022;193:77–86. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2022.09.007.
24. Sato M., Sato-Yamamoto N., Wakita A., Haraguchi M., Shimonishi M., Okuno H. Direct Injection of recombinant AAV-containing solution into the oviductal lumen of pregnant mice caused *in situ* infection of both preimplantation embryos and oviductal epithelium. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(9):4897. DOI: 10.3390/ijms23094897.
25. Kanatsu-Shinohara M., Lee J., Miyazaki T., Morimoto H., Shinohara T. Adeno-associated-virus-mediated gene delivery to ovaries restores fertility in congenital infertile mice. *Cell Rep. Med.* 2022;3(5):100606. DOI: 10.1016/j.xcrm.2022.100606.
26. Urbanelli L., Buratta S., Tancini B., Sagini K., Delo F., Porcellati S. et al. The role of extracellular vesicles in viral infection and transmission. *Vaccines (Basel).* 2019;7(3):102. DOI: 10.3390/vaccines7030102.
27. Hu X.L., Zhou X.P., Qian Y.L., Wu G.Y., Ye Y.H., Zhu Y.M. The presence and expression of the hepatitis B virus in human oocytes and embryos. *Hum. Reprod.* 2011;26(7):1860–1867. DOI: 10.1093/humrep/der103.
28. Ajayi A.F., Akhigbe R.E. Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. *Fertil. Res. Pract.* 2020;6:5. DOI: 10.1186/s40738-020-00074-3.
29. Aizawa R., Ibayashi M., Mitsui J., Tsukamoto S. Lipid droplet formation is spatiotemporally regulated in oocytes during follicular development in mice. *J. Reprod. Dev.* 2024;70(1):18–24. DOI: 10.1262/jrd.2023-055.
30. Pupo A., Fernández A., Low S.H., François A., Suarez-Amaran L., Samulski R.J. AAV vectors: The Rubik’s cube of human gene therapy. *Mol. Ther.* 2022;30(12):3515–3541. DOI: 10.1016/j.ymthe.2022.09.015.
31. Batista A.R., King O.D., Reardon C.P., Davis C., Shankaracharya, Philip V. et al. Ly6a differential expression in blood-brain barrier is responsible for strain specific central nervous system transduction profile of AAV-PHP.B. *Hum. Gene Ther.* 2020;31(1–2):90–102. DOI: 10.1089/hum.2019.186.
32. Walkey C.J., Snow K.J., Bulcha J., Cox A.R., Martinez A.E., Ljungberg M.C. et al. A comprehensive atlas of AAV tropism in the mouse. *Mol. Ther.* 2025;33(3):1282–1299. DOI: 10.1016/j.ymthe.2025.01.041.
33. Zhao J., Yue Y., Patel A., Wasala L., Karp J.F., Zhang K. et al. High-resolution histological landscape of AAV DNA distribution in cellular compartments and tissues following local and systemic injection. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2020;18:856–868. DOI: 10.1016/j.omtm.2020.08.006.
34. Sarkar R., Xiao W., Kazazian H.H. A single adeno-associated virus (AAV)-murine factor VIII vector partially corrects the hemophilia A phenotype. *J. Thromb. Haemost.* 2003;1(2):220–226. DOI: 10.1046/j.1538-7836.2003.00096.x.
35. Ferla R., Alliegro M., Marteau J.B., Dell’Anno M., Nusco E., Pouillot S. et al. Non-clinical safety and efficacy of an AAV2/8 vector administered intravenously for treatment of mucopolysaccharidosis type VI. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2017;6:143–158. DOI: 10.1016/j.omtm.2017.07.004.

Вклад авторов

Маликова А.Д. – разработка концепции и дизайна исследования, введение вектора животным, подбор экспериментальных условий, анализ и интерпретация данных, написание первоначального текста. Жанатаев А.К., Есмагамбетов И.Б. – идея исследования, анализ результатов и источников, написание первоначального текста, научное редактирование. Анисина Е.А. – работа с лабораторными животными, проведение ПЦР, обработка первичного экспериментального материала, доработка текста. Плигина К.Л. – работа с лабораторными животными, выделение ооцитов, обработка первичного экспериментального материала, доработка текста. Чайка З.В. – выделение ДНК, обработка первичного экспериментального материала, доработка текста. Рябова Е.И., Довгий М.А., Хоссаин Р.М. – получение и очистка векторных частиц, доработка текста. Дурнев А.Д. – концептуализация, анализ результатов, доработка текста, критическое рецензирование рукописи. Дорофеев В.Л. – критическое рецензирование рукописи и окончательное утверждение для публикации.

Информация об авторах

Маликова Александра Дмитриевна – мл. науч. сотрудник, лаборатория генетической и репродуктивной токсикологии, ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий, г. Москва, malikova_ad@academpharm.ru, <https://orcid.org/0009-0001-2417-6620>

Жанатаев Алий Курманович – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник, зав. лабораторией генетической и репродуктивной токсикологии, ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий, г. Москва, zhanataev_ak@academpharm.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7673-8672>

Есмагамбетов Ильяс Булатович – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник, зав. лабораторией стромальной регуляции иммунитета, НИЦЭМ им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи, г. Москва, iesmagambetovib@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2063-2449>

Анисина Елена Александровна – ст. науч. сотрудник, лаборатория генетической и репродуктивной токсикологии, ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий, г. Москва, anisina_ea@academpharm.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7542-5658>

Плигина Кира Львовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория генетической и репродуктивной токсикологии, ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий, г. Москва, pligina_kl@academpharm.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2026-5260>

Чайка Злата Владимировна – научный сотрудник, лаборатория генетической и репродуктивной токсикологии, ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий, г. Москва, chajka_zv@academpharm.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5366-4917>

Рябова Екатерина Игоревна – мл. науч. сотрудник, лаборатория иммунобиотехнологии, НИЦЭМ им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи, г. Москва, ryabovaei96@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2687-5185>

Довгий Михаил Андреевич – мл. науч. сотрудник, лаборатория иммунобиотехнологии, НИЦЭМ им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи, г. Москва, imhail@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0017-7784>

Хоссаин Роза Махбубовна – мл. науч. сотрудник, лаборатория стромальной регуляции иммунитета, НИЦЭМ им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи, г. Москва, xossain2013@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0009-4483-2697>

Дурнев Андрей Дмитриевич – д-р мед. наук, профессор, академик РАН, руководитель отдела лекарственной токсикологии, ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий, г. Москва, durnev_ad@academpharm.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0912-7684>

Дорофеев Владимир Львович – д-р фарм. наук, профессор, и.о. генерального директора ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий, г. Москва, dorofeev_vl@academpharm.ru, <https://orcid.org/0009-0004-3584-3742>

✉ **Маликова Александра Дмитриевна**, malikova_ad@academpharm.ru

Поступила в редакцию 16.10.2025;
одобрена после рецензирования 27.10.2025;
принята к публикации 30.10.2025