

Измайлов Андрей Александрович

**ВЛИЯНИЕ КОМБИНАЦИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНГИОГЕННЫХ
ФАКТОРОВ И НЕЙРОНАЛЬНОЙ МОЛЕКУЛЫ АДГЕЗИИ
НА ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В СПИННОМ МОЗГЕ КРЫСЫ
ПОСЛЕ МОДЕЛИРОВАНИЯ КОНТУЗИОННОЙ ТРАВМЫ**

3.3.3. Патологическая физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Исламов Рустем Робертович

Официальные оппоненты: **Салмина Алла Борисовна**, доктор медицинских наук, профессор; ФГБНУ «Научный центр неврологии» Минобрнауки России; главный научный сотрудник и заведующий лабораторией экспериментальной нейробиологии отдела исследований мозга;

Баклашев Владимир Павлович, доктор медицинских наук; Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России; заместитель генерального директора по научной работе и медицинским технологиям

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «___»_____2021 г. в часов на заседании диссертационного совета Д 208.094.03 при ФГБОУ ВО Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Б. Казачья, 112.

С диссертацией можно ознакомиться в читальном зале ФГБОУ ВО Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: г. Саратов, ул. 53-й Стрелковой Дивизии, 6/9, к. 5 – и на сайте (<http://www.sgmu.ru/sci/dissov>) организации.

Автореферат разослан «_____»_____2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

А. И. Кодочигова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Позвоночно-спинномозговая травма – тяжёлое, прогностически неблагоприятное повреждение костных структур позвоночника и спинного мозга, которое влечет за собой двигательные, чувствительные, вегетативно-трофические и психические расстройства [Прудникова О.Г., 2016]. Сегодня медицинская наука предлагает базовые паллиативные и поддерживающие методы лечения, которые сочетаются с длительной по времени и дорогой по стоимости реабилитацией. Очевидно, что для повышения качества жизни пациентов с повреждением и травмой спинного мозга (ТСМ) необходима разработка новых технологий лечения ТСМ [Новосёлова А.А., 2019; Якушин О.А., 2019].

Среди активно разрабатываемых стратегий сдерживания дегенерации и стимулировании нейрорегенерации при ТСМ наиболее перспективной представляется терапия с использованием генных конструкций, которая предполагает доставку в область эпицентра рекомбинантных генов, кодирующих нейротрофические факторы, например: нейтрофинов (нейротрофический фактор мозга (BDNF), нейротрофин-3 (NT-3), нейротрофин-4/5 (NT-4/5)), ростовых (фактор роста фибробластов (FGF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF), фактор роста нервов (NGF)), сосудистых факторов (сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), ангиогенин), молекул межклеточной адгезии (нейрональная молекула клеточной адгезии (NCAM)) [Choong C.J., 2016]. Нейротрофические факторы – это группа эндогенных и рекомбинантных экзогенных полипептидов, которые регулируют рост, выживание, дифференцировку и функционирование нейронов [Zhu J. et al., 2012]. Очевидна необходимость выбора нейротрофических рекомбинантных молекул, таргетно воздействующих на конкретные патогенетические механизмы ТСМ.

Многообещающими факторами, способствующими поддержанию жизни нейронов и клеток глии, считаются VEGF, ангиогенин (ANG) и NCAM. Молекулы VEGF и ANG служат нейропротекторами с хорошо изученными механизмами

сдерживания вступления клеток в апоптоз. Кроме того, VEGF и ANG играют важную роль в восстановлении микроциркуляции и гематоэнцефалического барьера в зоне ишемии после нейротравмы. Межклеточные взаимодействия, опосредуемые NCAM, в нейроонтогенезе и посттравматической регенерации обеспечивают не только выживание и миграцию нейронов, но и направленный рост аксонов и установление межклеточных контактов.

Наиболее перспективными с точки зрения доставки рекомбинантных генов, кодирующих нейротрофические факторы в центральную нервную систему (ЦНС), являются мононуклеарные клетки крови пуповины человека (МККП), так как они пригодны для алло- и аутотрансплантации у человека, характеризуются доступностью, низкой иммуногенностью, простотой получения и хранения. Сегодня МККП уже используются в некоторых клинических испытаниях, в частности для лечения ТСМ [Cossu G. et al., 2018]. Очевидно, что трансплантация генетически модифицированных МККП, сверхэкспрессирующих рекомбинантные нейротрофические факторы, будет наиболее эффективным средством для сдерживания патофизиологических и патоморфологических процессов и стимулирования нейрорегенерации.

Таким образом, для решения поставленных фундаментальных и прикладных задач необходимо комплексное изучение патофизиологических механизмов ТСМ, а также обоснованный выбор генных и генно-клеточных препаратов, обеспечивающих продукцию определенных нейротрофических факторов, и способа их доставки с целью восстановления спинного мозга после травматического повреждения.

Степень разработанности темы. До настоящего времени в практической медицине не существует эффективного клинически одобренного подхода для сдерживания патогенетических механизмов, приводящих к деструктивным изменениям в спинном мозге после ТСМ. Различные варианты клеточной, генной и генно-клеточной терапии широко используются в экспериментах для коррекции патоморфологических изменений и стимулирования нейрорегенерации [Choong C.J., 2016; Courtine G., 2019; Fehlings M. et al., 2020]. Однако несмотря на

полученные отдельные положительные результаты в опытах на животных, а также продолжающиеся клинические испытания генных и клеточных препаратов [Ginn S.L. et al., 2018], ни один метод не внедрен в медицинскую практику.

В клеточной трансплантологии пуповинную кровь рассматривают как важный источник стволовых клеток для лечения не только гематологических, но и соматических заболеваний, в том числе и нейротравм. В последние несколько лет использование МККП для лечения дегенеративных и ишемических состояний было одобрено для клинических исследований [Allan D.S., 2020; Berglund S. et al. 2017]. Сегодня существует несколько методик клинических трансплантаций МККП и специфических клеточных популяций, выделенных из пуповинной крови с предполагаемой терапевтической эффективностью у пациентов с хронической ТСМ [Yao L.Q. et al., 2013; Zhu H. et al., 2016].

Цель исследования: установление механизмов морфо-функциональных нарушений у крысы с контузионной травмой спинного мозга и оценка эффективности интратекальной доставки в ЦНС рекомбинантных генов сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), ангиогенина (ANG) и нейрональной молекулы клеточной адгезии (NCAM) с помощью аденовирусных векторов и моноклеарных клеток крови пуповины человека на посттравматическую регенерацию спинного мозга.

Задачи исследования:

1. Изучить морфо-функциональные нарушения у крысы с контузионной травмой спинного мозга с помощью:

- поведенческих тестов Basso – Beattie – Bresnahan (BBB), Ротарод и Тредмил;
- электрофизиологических методов (вызванных моторных потенциалов в ответ на электрическую стимуляцию периферического нерва и на магнитную стимуляцию спинного мозга);
- гистологических методов (сохранности белого и серого вещества роstralнее и каудальнее места травмы, экспрессии маркеров клеток нейроглии и мотонейронов).

2. Получить генные и генно-клеточные препараты для коррекции патофизиологических и патоморфологических сдвигов в спинном мозге после травматического повреждения:

– получить генный препарат, содержащий смесь рекомбинантных репликативно-дефектных аденовирусов человека 5-го серотипа, несущих по отдельности гены *vegfl65*, *ang* и *ncam1*;

– получить генетически модифицированные мононуклеарные клетки крови пуповины человека, сверхэкспрессирующие VEGF, ANG и NCAM;

– провести анализ экспрессии полученных препаратов *in vitro* и *in vivo*.

3. Оценить эффективность интратекальной доставки в ЦНС рекомбинантных генов, кодирующих VEGF, ANG и NCAM с помощью аденовирусных векторов на морфо-функциональное восстановление спинного мозга у крысы после моделирования контузионной травмы.

4. Оценить эффективность интратекальной доставки в ЦНС рекомбинантных генов, кодирующих VEGF, ANG и NCAM с помощью мононуклеарных клеток крови пуповины человека на морфо-функциональное восстановление спинного мозга у крысы после моделирования контузионной травмы.

Научная новизна. В настоящем исследовании были получены новые комплексные данные о патогенезе ТСМ у крысы через 30 суток после моделирования контузионной травмы спинного мозга. Впервые показано снижение двигательной активности (произвольной и вынужденной активности, объема движения в суставах) у животных в сочетании с патологическими изменениями М- и Н-ответов *m. gastrocnemius* при стимуляции седалищного нерва, образованием полостей в сером веществе и снижением относительной площади миелина в белом веществе спинного мозга, снижением экспрессии синаптических белков (синаптофизина и белка постсинаптической плотности PSD95) в нейронах, повышением экспрессии молекул клеточного стресса (белка теплового шока Hsp27), астроглиозом (увеличением количества GFAP-позитивных астроцитов и Iba1-позитивных клеток микроглии), снижением

миелинизации нервных отростков.

Впервые установлено, что интратекальное введение аденовирусных векторов, несущих кДНК генов *veg*f, *ang* и *ncam* или генетически модифицированных моноклеарных клеток крови пуповины человека, сверхэкспрессирующих рекомбинантные VEGF, ANG и NCAM, улучшает двигательную активность у крыс (высокие значения объема движения голеностопного сустава, высокие значения баллов в тесте Basso – Beattie – Bresnahan (BBB), увеличение времени на Ротароде), восстанавливает электрофизиологические характеристики вызванных потенциалов скелетных мышц задних конечностей в ответ на магнитную стимуляцию спинного мозга и электрическую стимуляцию *n. ischiadicus*. Данные генный (1/3Ad5-VEGF + 1/3Ad5-ANG + 1/3Ad5-NCAM) и генно-клеточный (МККП + 1/3Ad5-VEGF + 1/3Ad5-ANG + 1/3Ad5-NCAM) препараты оказывают позитивное влияние на ремоделирование спинного мозга, характеризующееся более выраженной сохранностью серого и белого вещества, повышением экспрессии синаптических белков в нейронах, снижением иммуноэкспрессии молекул клеточного стресса, астроглиоза и поддержанием миелинизации нервных отростков.

Впервые были получены данные об адресной миграции генетически модифицированных моноклеарных клеток крови пуповины в область нейротравмы после ксенотрансплантации, а также количественной оценки выживаемости трансплантированных клеток и их способности к экспрессии рекомбинантных генов *veg*f, *ang* и *ncam* в спинном мозге крысы с ТСМ.

Теоретическая и практическая значимость работы. Фундаментальное значение имеют данные о патофизиологических и патоморфологических изменениях спинного мозга при контузионной травме. Анализ кинематики суставов, электрофизиологических данных игольчатой миографии и магнитной стимуляции на 30-е сутки после контузионной травмы у крыс представляет интерес для понимания патогенеза нейродегенеративных процессов в спинном мозге. Выявленные гистологические изменения в части сохранности серого и

белого вещества спинного мозга, экспрессии синаптических белков (синаптофизина и PSD95) в нейронах, молекул клеточного стресса (Hsp27), миелинизации нервных отростков и астроглиоза (увеличения количества астроцитов и клеток микроглии) дополняют существующее представление о механизмах нейродегенерации в спинном мозге. Результаты исследования о влиянии полученных генных (1/3Ad5-VEGF + 1/3Ad5-ANG + 1/3Ad5-NCAM) и генно-клеточных (МККП + 1/3Ad5-VEGF + 1/3Ad5-ANG + 1/3Ad5-NCAM) препаратов на патогенез ТСМ у крыс могут быть использованы в качестве основы для создания клинического протокола эффективного способа нейрореабилитации пациентов с ТСМ. Также полученные результаты могут послужить базой для разработки лечения ряда социально значимых заболеваний человека, к которым относятся нейродегенеративные заболевания и ишемические инсульты мозга.

Положение, выносимое на защиту. Доставка комбинации рекомбинантных генов, кодирующих VEGF, ANG и NCAM, в равном соотношении с помощью аденовирусных векторов или моноклеарных клеток крови пуповины человека оказывает положительное влияние на морфо-функциональное восстановление спинного мозга после контузионной травмы.

Степень достоверности и апробация результатов. Методы, выбранные для исследования, а также технические способы их решения современны, они соответствуют принятым на мировом уровне и помогают выполнить поставленные задачи. Используемые в работе молекулярно-генетические, иммунофлуоресцентные, морфометрические, гистологические и статистические методы исследования подтверждают достоверность полученных данных. Результаты диссертационного исследования были доложены на 82-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых «Вопросы теоретической и практической медицины» (Уфа, 2017), IX Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2017), III Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2017), 42nd FEBS Congress «From Molecules to Cells and Back»

(Jerusalem, 2017), X Международной научной конференции «Бабухинские чтения» (Орел, 2017), IV Всероссийском научном медицинском форуме студентов и молодых ученых с международным участием «Белые цветы» (Казань, 2017), на 76-й Международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2018), 26th Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT) (Lausanne, Switzerland, 2018), VI Всероссийском медицинском форуме студентов и молодых учёных с международным участием «Белые цветы» (Казань, 2019), 53rd Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation «The Clocks of Metabolism and Disease» (Portugal, 2019), IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2019), VII Всероссийском медицинском форуме «Белые цветы» (Казань, 2021).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ, из них три статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных библиографических базах Scopus и WoS. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 16-15-00010).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа содержит 168 страниц печатного текста, состоит из пяти глав, а именно введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов, заключения, выводов, списка литературы и списка сокращений. Диссертация иллюстрирована 12 таблицами, 36 рисунками. Список литературы содержит 263 источника, среди которых 10 отечественных и 253 зарубежных источников.

Личный вклад автора. Диссертант принимал личное участие в планировании и проведении экспериментальной работы. Все имеющиеся результаты, выводы и положения, выносимые на защиту, выполнены при личном участии автора. Соискатель лично подготавливал к печати тезисы и статьи по теме диссертации, текст работы написан автором самостоятельно.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Моделирование контузионной травмы спинного мозга. Оперативные вмешательства на крысах линии Wistar ($n = 34$, вес 250–300 г) выполнены в операционной, соответствующей надлежащим санитарным нормам и с разрешения локального этического комитета Казанского государственного медицинского университета. Крыс наркотизировали внутривенно раствором Золетила 100 (3 мг/кг) и Ксилы (4,8 мг/кг). Контузионную травму спинного мозга (КТСМ) моделировали после ламинэктомии с помощью импактора на уровне Th₈-Th₉.

Поведенческие тесты использовали для оценки восстановления двигательной активности у животных в послеоперационный период. Тест BBB проводили через день, начиная с 7-х и до 30-х суток после моделирования КТСМ. Тест Ротарод начинали на 20-е сутки и проводили через день до 30-х суток эксперимента. Кинематику суставов оценивали при ходьбе на Тредмиле. На 30-е сутки после операции у животного в проекциях гребня подвздошной кости, большого вертела бедренной кости, коленного, голеностопного суставов и пальцев левой задней конечности наносили цветные метки. Затем крысу помещали на беговую дорожку (скорость 10 см/сек), а грудь и передние конечности фиксировали манжетой. Видеофиксацию цветных меток во время ходьбы подопытного животного осуществляли с помощью фотоаппарата Canon PowerShot S5 IS (Япония). Полученные видеоматериалы использовали для анализа объема движений в тазобедренном, коленном и голеностопном суставах. Видеоанализ кинематики суставов проводили с помощью программного обеспечения Kinovea 0.8.23.

Электрофизиологические исследования выполнены на 30-е сутки после моделирования КТСМ. Крыс наркотизировали раствором хлоралгидрата (80 мг/мл, 0,4 мл внутривенно) и с помощью игольчатой миографии регистрировали вызванные моторные потенциалы симметричных икроножных мышц правой и левой конечностей в ответ на электрическую стимуляцию

седалищного нерва или магнитную стимуляцию шейно-грудного отдела спинного мозга.

Гистологические методы исследования спинного мозга. На 30-е сутки после операции подопытных животных наркотизировали с помощью хлоралгидрата (80 мг/мл, 0,4 мл внутривенно), транскардиально перфузировали 4% забуференным раствором параформальдегида (4 С°, рН = 7,4) и забирали груднопоясничный участок позвоночного столба, который далее постфиксировали в 4% параформальдегиде. Через сутки спинной мозг выделяли из позвоночного столба и делили на три фрагмента: ростральный (10 мм), эпицентр травмы (10 мм), каудальный (10 мм).

Сохранность серого вещества исследовали на поперечных срезах спинного мозга из рострального и каудального фрагментов, окрашенных гематоксилином и эозином. На оцифрованных микропрепаратах при 10-кратном увеличении микроскопа в программе ImageJ (NIH) [Madabhushi A., Lee G., 2016] оценивали площадь патологических полостей и сохранность серого вещества относительно всей площади серого вещества спинного мозга.

Относительную площадь миелина в эпицентре травмы изучали на полутонких поперечных срезах спинного мозга, окрашенных метиленовым синим. На поперечных срезах оцифрованных микропрепаратов при 20-кратном увеличении микроскопа в программе AxioVision Rel. 4.8 подсчитывали относительную площадь миелиновых оболочек нервных волокон в квадрате площадью 0,08 мм² в передних, боковых и задних канатиках белого вещества на обеих сторонах спинного мозга.

Иммунофлуоресцентное окрашивание проводили на поперечных свободно плавающих срезах каудального фрагмента спинного мозга. Астроциты окрашивали при помощи антител против глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) (Santa Cruz, 1 : 200), клетки олигодендроглии – антителами к NG2 (Santa Cruz, 1 : 100), клетки микроглии – при помощи антител к Iba1 (Abcam, 1 : 200). Для анализа экспрессии молекул клеточного стресса использовали антитела против белка теплового шока с молекулярной массой 27 кДа (Hsp27)

(Abscam,1 : 200). Экспрессию синаптических белков оценивали с помощью антител против синаптофизина (Abscam,1 : 100) и белка постсинаптической плотности с молекулярной массой 95 кДа (PSD95) (Abscam,1 : 200). Для визуализации ядер клеток срезы дополнительно окрашивали в течение 10 минут при комнатной температуре раствором DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндола, Abscam, 1 : 5000). Анализ окрашенных срезов проводили с помощью конфокального сканирующего микроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия). Для оценки экспрессии белков-мишеней в спинном мозге были выбраны вентральные рога серого вещества. Иммунопозитивные клетки подсчитывали в квадрате площадью 0,05 мм² с изображения z-стека, состоящего из шести срезов с интервалом 0,5 мкм. Цифровые изображения срезов спинного мозга анализировали с помощью программы ImageJ (NIH). При подсчете количества иммунопозитивных клеток учитывали присутствие в клетках ядер, окрашенных DAPI. Плотность специфической флуоресценции в процентах вычисляли как отношение суммы ненулевых пикселей в снимке данного канала флуоресценции к площади изображения в пикселях.

Генные и генно-клеточные препараты. Рекомбинантные репликативно-дефектные вирусные векторы были созданы на основе аденовируса человека 5-го серотипа (Ad5) с использованием клеточной культуры НЕК 293 (Human Embryonic Kidney 293) в ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (Москва) по методу, описанному ранее [Islamov R.R. et al., 2017b]. В настоящем исследовании были использованы Ad5, несущие ген зеленого флуоресцирующего белка *gfp* (Ad5-GFP), ген ангиогенина *ANG* (Ad5-ANG), ген нейрональной молекулы клеточной адгезии *ncam1* (Ad5-NCAM) и сосудистого эндотелиального фактора роста *vegfl65* (Ad5-VEGF).

Для доставки в ЦНС трех рекомбинантных генов (*vegfl65*, *ANG* и *ncam1*) готовили генный препарат, содержащий три аденовирусных вектора в равном соотношении: Ad5-VEGF (1/3), Ad5-ANG (1/3) и Ad5-NCAM (1/3) [Islamov R.R et al., 2017a]. Для интратекальной инфузии генный препарат

содержал 2×10^7 вирусных частиц (Ad5-VEGF + Ad5-ANG + Ad5-NCAM или Ad5-GFP) в 20 мкл физиологического раствора. При создании генно-клеточного препарата для доставки в спинной мозг рекомбинантных генов (*vegfl65*, *ANG* и *ncam1*) в качестве клеточного носителя были использованы МККП.

Уровень мРНК генов *vegfl65*, *ang*, *ncam1* в трансдуцированных МККП определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Эффективность продукции рекомбинантного белка в генетически модифицированных МККП оценивали в клетках после трансдукции аденовирусом Ad5-GFP. Через 72 часа культивирования МККП + Ad5-GFP *in vitro* культуру клеток изучали с помощью инвертированного люминесцентного микроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия).

Производство рекомбинантных молекул VEGF, GDNF и NCAM *in vivo* изучали в ростральном фрагменте спинного мозга через 30 суток после интратекальной инфузии генного препарата или трансплантации генетически модифицированных МККП методом иммунофлуоресцентного окрашивания с помощью специфических антител к белкам-мишеням. Ростральный фрагмент был выбран с целью подтверждения способности аденовирусных векторов и МККП проникать от места инъекции (поясничный отдел) через эпицентр в ростральную часть спинного мозга. Экспрессию рекомбинантных молекул в МККП выявляли путем двойного иммунофлуоресцентного окрашивания антителами против VEGF (Abcam, 1 : 200), ангиогенина (Abcam, 1 : 200), NCAM (Abcam, 1 : 200) и человеческого ядерного антигена HNA (Millipore, 1 : 150). Для визуализации ядер клеток срезы дополнительно окрашивали раствором пропидия иодида (PI, Invitrogen, 1 : 1000) или DAPI (Abcam, 1 : 5000). При подсчете количества иммунопозитивных клеток учитывали наличие в клетках ядер, окрашенных DAPI.

Доставка рекомбинантных генов в спинной мозг крысы после моделирования КТСМ. Через 4 часа после нанесения КТСМ животным выполняли ламинэктомию на уровне L₄–L₅, далее интратекально вводили генные или генно-клеточные препараты. Согласно дизайну эксперимента животные были разделены на пять экспериментальных групп (табл.).

Экспериментальные группы животных

Группа	Инtrateкальная инъекция препарата в 20 мкл физиологического раствора
КТСМ (контроль, n = 4)	20 мкл физиологического раствора (NaCl 0,9%)
КТСМ/Ad5-GFP (контроль, n = 8)	2×10^7 вирусных частиц Ad5-GFP
КТСМ/МККП+Ad5-GFP (n = 6)	2×10^6 МККП, трансдуцированных Ad5-GFP,
КТСМ/Ad5-VEGF-ANG-NCAM (n = 4)	2×10^7 вирусных частиц, несущих Ad5-VEGF (1/3), Ad5-ANG (1/3) и Ad5-NCAM (1/3)
КТСМ/МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM (n = 7)	2×10^6 МККП, трансдуцированных Ad5-VEGF (1/3), Ad5-ANG (1/3) и Ad5-NCAM (1/3)

Статистический анализ. Выявление различий между группами проводили с помощью теста Краскела – Уоллиса (нулевая гипотеза: все группы принадлежат одной совокупности, при $p < 0,05$, нулевая гипотеза отвергалась). В качестве апостериорного критерия для теста Краскела – Уоллиса использовали U-тест Манна-Уитни, с помощью которого выявляли различия между каждой экспериментальной и контрольной группами, поправку на множественность не вводили. Данные поведенческих тестов, объемов кинематики суставов, моторных вызванных потенциалов, сохранности серого вещества и относительной площади миелина, подсчета генно-модифицированных МККП в спинном мозге представлены в виде медианы [1 квартиль; 3 квартиль]. Результаты иммунофлуоресцентного анализа клеточный маркеров, ПЦР-РВ представлены в виде средней \pm стандартное отклонение. Анализ полученных данных проводили с использованием базовых пакетов языка R. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты.

Морфо-функциональные изменения спинного мозга после моделирования КТСМ. На 30-е сутки у подопытных животных анализ поведенческих тестов ВВВ и Ротарод обнаружил снижение двигательной активности. У крыс с КТСМ значение теста ВВВ составило 8,5 балла [7,75, 9], при максимальном значении 21 балл ($p < 0,05$), а время тестирования на Ротароде снизилось с 2–3 минут до 9,2 сек [8,4; 9,6] ($p < 0,05$).

Кинематику тазобедренного, коленного и голеностопного суставов задней левой конечности оценивали по величине угловых значений. Объем движения у интактных животных в тазобедренном суставе составил 22° [9; 24], в коленном – 71° [69; 71] и в голеностопном 88° [87; 102]. У крыс с контузионной травмой наблюдалось незначительное снижение величины угла в тазобедренном суставе (19° [19; 21]) и резкое выраженное уменьшение объема движений в коленном и голеностопном суставах – 11° [11; 26] и 69° [57; 72] соответственно ($p < 0,05$).

На 30-е сутки после моделирования нейротравмы анализ электромиограммы икроножной мышцы не выявил статистически значимых отличий в значениях порога, амплитуды, латентного периода и длительности М-ответа у крыс с КТСМ при сравнении с интактными животными ($p > 0,05$). При исследовании Н-ответа икроножной мышцы было обнаружено статистически значимое увеличение порога, снижение амплитуды и сокращение латентного периода у крыс с КТСМ при сравнении с интактными животными. При этом длительность Н-ответа у этих животных не отличалась ($p > 0,05$).

При исследовании электромиограммы икроножной мышцы в ответ на магнитную стимуляцию шейно-грудного отдела спинного мозга было обнаружено увеличение порога, снижение амплитуды, увеличение латентного периода и длительности вызванных моторных потенциалов у крыс с КТСМ ($p < 0,05$).

Выявленные функциональные нарушения согласуются с данными морфологического исследования спинного мозга. У интактных животных относительная площадь серого вещества на уровне нижних грудных сегментов составляет 98% [97,1; 98,8]. У крыс с КТСМ роstralнее эпицентра травмы площадь серого вещества снизилась до 81,2% [74,8; 87,6], а каудальнее – до 89% [87,2; 90,7] ($p < 0,05$). Анализ сохранности белого вещества обнаружил незначительное снижение относительной площади миелина в переднем канатике (68,9% [66; 72,2]) при сравнении с интактными животными (71,8% [70,5; 73]) ($p > 0,05$). При этом статистически значимое снижение относительной площади миелина документировано в боковом (58,2% [57; 64,3]) и заднем (59,5% [53; 63,4]) канатиках относительно значений у интактных животных – 72,9% [72,6; 74,1] и

80,2% [79; 80,8] соответственно ($p < 0,05$).

Молекулярные и клеточные изменения в спинном мозге после нейротравмы изучали иммунофлуоресцентным методом. Так, в передних рогах спинного мозга у интактных животных количество Hsp27-позитивных клеток – $9,3 \pm 2,5$, средняя интенсивность флуоресценции синаптофизина составила $37,0 \pm 2,5$, PSD95 – $33,8 \pm 2,7$, количество GFAP-позитивных астроцитов достигло $8,5 \pm 2,8$, NG2-позитивных олигодендроглиальных клеток – $26,2 \pm 4,4$, клеток микроглии – $6,3 \pm 0,8$. На 30-е сутки после КТСМ количество Hsp27-позитивных клеток в каудальном фрагменте спинного мозга статистически значимо увеличивалось до $29,5 \pm 3,8$, а экспрессия синаптофизина и PSD95 снижалась до $16,8 \pm 1,3$ и $14,3 \pm 2,8$ соответственно ($p < 0,05$). Количество NG2-позитивных олигодендроглиальных клеток незначительно уменьшалось до $21,1 \pm 4,1$, при этом количество астроцитов увеличивалось более чем в два раза – $19,2 \pm 3,0$, а Iba1-позитивных клеток – до $17 \pm 0,8$ ($p < 0,05$).

Анализ экспрессии рекомбинантных генов. Эффективность экспрессии трансгенов в составе Ad5-GFP, МККП + Ad5-GFP, Ad5-VEGF-ANG-NCAM и МККП + Ad5-VEGF-ANG-NCAM была подтверждена *in vitro* и *in vivo*. Методом ПЦР-РВ в МККП + Ad5-VEGF-ANG-NCAM было установлено значительное повышение содержания мРНК генов *vegfl65*, *ang* и *ncam1*. Иммунофлуоресцентным анализом была подтверждена продукция рекомбинантных молекул VEGF, ANG и NCAM в клетках серого и белого вещества роstralнее эпицентра травмы в спинном мозге крысы с КТСМ после интратекальной доставки генного препарата Ad5-VEGF-ANG-NCAM. Также выше эпицентра травмы были обнаружены МККП, продуцирующие VEGF, ANG и NCAM, после интратекальной инъекции крысам с КТСМ генно-клеточного препарата МККП + Ad5-VEGF-ANG-NCAM.

Оценка эффективности доставки рекомбинантных генов *vegfl65*, *ang* и *ncam1* на морфо-функциональное восстановление спинного мозга крыс с КТСМ. При сравнении с контрольными животными интратекальная доставка рекомбинантных генов, кодирующих VEGF, ANG и NCAM, с помощью

аденовирусных векторов вызывает следующие положительные изменения:

- 1) способствует восстановлению двигательных функций (улучшению параметров поведенческих тестов и увеличению объема движений в голеностопном суставе);
- 2) снижает амплитуду и латентный период вызванных моторных потенциалов икроножной мышцы в ответ на магнитную стимуляцию спинного мозга;
- 3) увеличивает сохранность серого вещества и относительную площадь миелина в боковых и задних канатиках белого вещества;
- 4) снижает экспрессию молекулы клеточного стресса (Hsp27) и повышает экспрессию синаптического белка синаптофизина;
- 5) сдерживает развитие астроглиоза (снижается количество GFAP-позитивных астроцитов и Iba1-позитивных клеток микроглии) и способствует миелинизации нервных отростков (увеличивается количество NG2-позитивных олигодендроглиальных клеток).

На фоне интратекальной доставки *vegfl65*, *ang* и *ncam1* с помощью МККП, также при сравнении с крысами с КТСМ, было установлено улучшение параметров поведенческих тестов и кинематики голеностопного сустава. Данные электрофизиологических исследований икроножной мышцы свидетельствовали о восстановлении порога, амплитуды и латентного периода Н-ответа при электрической стимуляции седалищного нерва и значения латентного периода вызванного моторного потенциала в ответ на магнитную стимуляцию шейно-грудного отдела спинного мозга. При гистологическом изучении спинного мозга было установлено положительное влияние генно-клеточного препарата на сохранность серого и белого вещества, которое сочеталась со снижением астроглиоза, экспрессии Hsp27 в клетках серого вещества и повышением экспрессии синаптического белка синаптофизина в нейронах.

При сравнительном анализе прямой и клеточно-опосредованной доставки *vegfl65*, *ang* и *ncam1* установлено, что генный (Ad5-VEGF-ANG-NCAM) и генно-клеточный (МККП + Ad5-VEGF-ANG-NCAM) препараты в целом оказывают аналогичное положительное действие на морфо-функциональное восстановление спинного мозга после нейротравмы. При этом следует учитывать, что при прямой доставке рекомбинантных генов происходит бесконтрольная

трансдукция аденовирусными векторами различных клеточных типов в ЦНС и эффективность действия генного препарата обусловлена продукцией рекомбинантных молекул VEGF, ANG и NCAM клетками мозга. Нейротрансплантация генетически модифицированных МККП *ex vivo* предполагает продукцию рекомбинантных молекул VEGF, ANG и NCAM только трансплантированными клетками. Такой подход исключает прямое воздействие вирусного вектора на организм реципиента и позволяет контролировать уровень трансдукции клеток. Кроме того, положительное действие генно-клеточного препарата на посттравматическую регенерацию спинного мозга может быть также обусловлено непосредственным влиянием МККП, о чем свидетельствуют более выраженные положительные изменения некоторых изученных параметров после интратекального введения МККП + Ad5-VEGF-ANG-NCAM.

Результаты, полученные в данном исследовании, позволяют предположить, что интратекальная доставка в ЦНС одновременно трех рекомбинантных генов *vegfl65*, *ang* и *ncam1* является эффективным способом сдерживания нейродегенерации и стимулирования нейрорегенерации в ЦНС. Доставка комбинации генов *vegfl65*, *ang* и *ncam1* с помощью МККП представляет собой новый потенциально успешный подход к лечению пациентов со спинномозговой травмой.

ВЫВОДЫ:

1. На 30-е сутки после моделирования контузионной травмы спинного мозга у крысы установлено: 1) снижение двигательной активности; 2) уменьшение объема движений в суставах задних конечностей; 3) патологические изменения вызванных моторных потенциалов икроножной мышцы; 4) уменьшение относительной площади серого вещества и миелина в белом веществе спинного мозга; 5) повышение экспрессии молекулы клеточного стресса (белка теплового шока Hsp27); 6) снижение экспрессии синаптических белков (синаптофизина и PSD95) в нейронах; развитие астроглиоза (увеличение количества GFAP-позитивных астроцитов и Iba1-позитивных клеток микроглии).

2. Инtrateкальная доставка в ЦНС рекомбинантных генов *vegfl65*, *ang*, *ncam1* с помощью аденовирусных векторов (Ad5) обеспечивает трансдукцию клеток мозга и продукцию в них рекомбинантных молекул в течение 30 суток.
3. Комбинация из трех репликативно-дефектных аденовирусов человека 5-го серотипа (Ad5), несущих гены *vegfl65*, *ang* и *ncam1*, эффективно трансдуцирует мононуклеарные клетки крови пуповины человека *ex vivo*, обеспечивает в них синтез мРНК трансгенов и продукцию рекомбинантных молекул VEGF, GDNF и NCAM. После инtrateкальной инъекции генетически модифицированные МККП мигрируют в ткань мозга в область повреждения, где они сохраняют способность продуцировать рекомбинантные молекулы в течение 30 суток.
4. Инtrateкальная доставка сочетания рекомбинантных генов *vegfl65*, *ang* и *ncam1* в спинной мозг крысы после контузионной травмы с помощью аденовирусных векторов или мононуклеарных клеток крови пуповины человека имеет выраженный позитивный эффект на: 1) восстановление двигательной активности у животных; 2) увеличение объема движений в суставах задних конечностей; 3) улучшение электрофизиологических показателей икроножной мышцы; 4) сохранность серого и белого вещества спинного мозга; 5) увеличение экспрессии синаптических белков (синаптофизина) в нейронах; 6) снижение иммуноэкспрессии молекул клеточного стресса (уменьшение количества Hsp27-позитивных клеток); 7) сдерживание развития астроглиоза (уменьшение количества GFAP-позитивных астроцитов); 8) поддержание миелинизации нервных отростков (увеличение количества NG2-позитивных олигодендроглиальных клеток).
5. Инtrateкальная доставка сочетания рекомбинантных генов *vegfl65*, *ang* и *ncam1* в спинной мозг крысы после контузионной травмы с помощью мононуклеарных клеток крови пуповины человека в целом имеет более выраженный положительный эффект на морфо-функциональное

восстановление спинного мозга при сравнении с доставкой трансгенов с помощью аденовирусных векторов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ
ДИССЕРТАЦИИ

1. Адресная доставка терапевтических генов, кодирующих белки-стимуляторы нейрорегенерации, в ЦНС с помощью моноклеарных клеток пуповинной крови / А.А. Измайлов, Ф.О. Фадеев, Ф.В. Баширов // *Гены & Клетки*. – 2017. – Т. XII, № 3. – С. 105–106.
2. Доклинические испытания клеточно-опосредованной генной терапии контузионной травмы спинного мозга у крыс / А.А. Измайлов, М.Е. Соколов, Ф.О. Фадеев, В.А. Маркосян, М.С. Кузнецов, А.Н. Лисюков, Р.Р. Гарифулин // *Биотехнология: состояние и перспективы развития: IX Междунар. конгресс*. – М., 2017. – Т. 2. – С. 446–449.
3. Сравнительный анализ поведенческих тестов у крыс с контузионной травмой спинного мозга при прямой и клеточно-опосредованной генной терапии / Р.Р. Гарифулин, М.Е. Соколов, А.А. Измайлов, Ф.О. Фадеев, В.А. Маркосян // *Вестник Башкирского государственного медицинского университета*. – 2017. – Прил. 1. – С. 709–714.
4. Стимулирование посттравматической регенерации спинного мозга у крыс с помощью генноклеточной терапии / Р.Р. Гарифулин, А.А. Измайлов, М.С. Кузнецов // *Белые цветы: IV Всерос. науч. мед. форум студентов и молодых ученых с междунар. участием*. – Казань, 2017. – С. 454–455.
5. Стимуляция регенерации спинного мозга крысы аденовирусами, содержащими гены, кодирующие GDNF, NCAM1, VEGF165 / Г.Ф. Шаймарданова, С.Д. Башанкаев, А.А. Измайлов, Ф.О. Фадеев, М.Е. Соколов, Р.Р. Исламов // *Морфология*. – 2017. – Т. 151, № 3. – С. 115.
6. Efficacy of triple gene therapy based on adenoviral vector- or cell-mediated intrathecal delivery for spinal cord injury treatment in rat model / R.R. Islamov, A.A. Izmailov, F.V. Bashirov M.E. Sokolov, F.O. Fadeev, V.A. Markosyan, R.R. Garifulin // *The FEBS Journal*. – 2017. – Vol. 284 (Supl. 1). – P. 247–248.

7. **Evaluation of direct and cell-mediated triple-gene therapy in spinal cord injury in rats / R.R. Islamov, A.A. Izmailov, M.E. Sokolov F.O. Fadeev, F.V. Bashirov, A.A. Ereemeev, G.F. Shaymardanova, M.M. Shmarov, B.S. Naroditskiy, Y.A. Chelyshev, I.A. Lavrov, A. Palotás // Brain Research Bulletin. – 2017. – Vol. 132, № 2. – P. 44–52.**
8. **Spinal cord molecular and cellular changes induced by adenoviral vector- and cell-mediated triple gene therapy after severe contusion / A.A. Izmailov, T.V. Povysheva, F.V. Bashirov, M.E. Sokolov, F.O. Fadeev, R.R. Garifulin, B.S. Naroditsky, D.Y. Logunov, I.I. Salafutdinov, Y.A. Chelyshev, R.R. Islamov, I.A. Lavrov // Frontiers in pharmacology. – 2017. – Vol. 8. – P. 1--17. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29180963> (дата обращения: 30.12.2017).**
9. **Комбинированная генная и электротерапия спинного мозга после контузионной травмы в моделях на крысах / А.А. Измайлов, Ф.О. Фадеев, А.А. Еремеев, В.А. Маркосян, М.Е. Соколов, М.С. Кузнецов, Р.Р. Гарифулин, А.Н. Лисюков // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины: 76-я Междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых и студентов. – Волгоград, 2018. – С. 519–520.**
10. **Сравнительный анализ эффективности прямой и клеточно-опосредованной генной терапии крыс с контузионной травмой спинного мозга / А.А. Измайлов, М.Е. Соколов, Ф.В. Баширов Ф.О. Фадеев, В.А. Маркосян, Р.Р. Гарифулин, А.Н. Лисюков, М.С. Кузнецов, Р.Р. Исламов // Гены & клетки. – 2017. – Т. XII, № 4. – С. 53–59.**
11. **Cell mediated gene therapy for neurodegenerative diseases, neurotrauma and stroke / F.V. Bashirov, M.E. Sokolov, A.A. Izmailov, V.A. Markosyan, F.O. Fadeev, E.S. Koshpaeva, I.I. Salafutdinov, Z.Z. Safiulloev, A.A. Rizvanov, R.R. Islamov // Human Gene Therapy. – 2018. – Vol. 29, № 12. – P. P139.**
12. **Genetically engineered umbilical cord blood mononuclear cells for therapy of spinal cord injury in combination with epidural stimulation / F.O. Fadeev,**

- F.V. Bashirov, A.A. Izmailov M.E. Sokolov, V.A. Markosyan, M.S. Kuznetsov, I.A. Pahalina, A.A. Ereemeev, A.A. Rizvanov, R.R. Islamov // *Human Gene Therapy*. – 2018. – Vol. 29, № 12. – P. P208.
13. Изучение эффективности клеточно-опосредованной генной терапии в сочетании с эпидуральной электростимуляцией на морфо-функциональное восстановление спинного мозга мини-свиньи с контузионной травмой / Р.Р. Исламов, Ф.О. Фадеев, Ф.В. Баширов, В.А. Маркосян, М.Е. Соколов, А.А. Измайлов, М.А. Давлеева, Р.В. Шевченко, Т.Ф. Минекаев, Д.Р. Ибрагимов, А.Т. Халитова, Ю.А. Калистратова // *Гены & Клетки*. – 2019. – Т. XIV, № 4-1. – С. 103.
14. Морфометрический анализ сохранности серого вещества при травме спинного мозга у мини свиней на фоне клеточно-опосредованной генной терапии электростимуляции / К.А. Сысоева, И.С. Минязева, З.Р. Бахтеева, А.А. Измайлов // *Белые цветы: VI Всерос. науч. мед. форум студентов и молодых ученых с междунар. участием*. – Казань, 2019. – С. 753–754.
15. Histological study of the post-injured mini-pig spinal cord following gene therapy combined with epidural stimulation / I.I. Salafutdinov, A.A. Izmailov, F.O. Fadeev, F.V. Bashirov, A.M. Gibadullin, G.G. Kundakchyan, R.R. Garifulin, I.S. Minyazeva, M. Osipov, A.R. Khamitov, R.R. Islamov // *European Journal of Clinical Investigation*. – 2019. – Vol. 49 (Suppl. 1). – P. 101–221.
16. Реакция клеток глии при травме спинного мозга на фоне терапии лейкоконцентратом, обогащенного генетическим материалом / В.П. Петрова, И.С. Минязева, Р.В. Шевченко, А.А. Измайлов // *Белые цветы: VIII Всерос. науч. мед. форум студентов и молодых ученых с междунар. участием*. – Казань, 2021. – С. 787.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
- КТСМ – контузионная травма спинного мозга
- МККП – моноклеарные клетки крови пуповины
- мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
- ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени
- Тест BBB – тест Basso – Beattie – Bresnan
- ТСМ – травма спинного мозга
- ЦНС – центральная нервная система
- Ad – аденовирусы
- ANG – ангиогенин
- BDNF – нейротрофический фактор мозга
- DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол
- FGF – фактор роста фибробластов
- GDNF – глиальный нейротрофический фактор
- GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок
- GFP – зелёный флуоресцентный белок
- FGF – фактор роста фибробластов
- Hsp – белок теплового шока
- Iba1 – ионизированная кальций-связывающая адаптерная молекула 1
- NCAM – нейрональная молекула клеточной адгезии
- NG2 – нейрональный глиальный антиген 2
- NGF – фактор роста нервов
- NT-3 – нейротрофин-3
- NT-4/5 – нейротрофин-4/5
- PSD95 – белок постсинаптической плотности 95 кДа
- VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста

Научное издание

Измайлов Андрей Александрович

Влияние комбинации рекомбинантных ангиогенных факторов и нейрональной молекулы адгезии на патофизиологические аспекты морфо-функциональных изменений в спинном мозге крысы после моделирования контузионной травмы

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Подписано в печать 30.09.2021 г.

Формат 60 × 84 ¹/₁₆. Гарнитура Таймс.

Объем 1 усл.п.л. Тираж 100 экз.

Заказ №

Отпечатано в типографии