

**КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

Челышев Юрий Александрович

**СПИННОЙ МОЗГ:
ТРАВМАТИЧЕСКОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ
И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ МИШЕНИ**

Актовая речь

Прочитана 14 мая 2019 года на заседании Учёного совета
Казанского государственного медицинского университета

Казань

2019

УДК 616.832-001-08(042.5)

ББК 56.13

Ч-41

Печатается по решению Учёного совета
Казанского ГМУ Минздрава России

Чельшев Юрий Александрович –

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой
гистологии, цитологии и эмбриологии, заслуженный деятель науки
Республики Татарстан

Чельшев. Ю.А.

Ч-41 Спинной мозг: травматическое повреждение и терапевтические мишени / Ю.А. Чельшев. – Казань: Казанский ГМУ, 2019. – 28 с.

УДК 616.832-001-08(042.5)

ББК 56.13

© Чельшев Ю.А., 2019

© Казанский ГМУ, 2019

Дорогие коллеги!

Для меня большая честь выступить с речью в Актовый день Казанского медицинского университета. Основатель Казанской нейрогистологической школы, декан медицинского факультета, заслуженный ординарный профессор Карл Августович Арнштейн в день годовщины Императорского Казанского университета 5 ноября 1896 года произнёс речь на торжественном акте. В этой речи под названием «Морфология и медицина» красной нитью проходит мысль о том, что «морфология стоит в тесной, неразрывной связи не только с теоретической медициной, но и с искусством врачевания». Продолжая традиции Казанской нейрогистологической школы о разносторонних отношениях и плодотворном взаимодействии между нейроморфологией и научной медициной, мне хотелось бы привлечь ваше внимание к достижениям доклинических исследований клеточных и молекулярных механизмов нейродегенерации и нейрорегенерации. Я ограничусь их рассмотрением применительно к травме спинного мозга (ТСМ), тяжёлой патологии, не имеющей сегодня эффективного лечения. Работами последнего времени получено подтверждение принципиальной возможности регенерации в ЦНС. Сегодня для её стимулирования экспериментальные нейронауки предлагают множество способов, подходов и технологий. Для проверки их эффективности и безопасности как в модельных экспериментах, так и в ходе клинических испытаний потребуются не один год напряжённой работы в ведущих мировых лабораториях и центрах. Мне бы хотелось выделить те достижения, которые имеют наибольшую перспективу для трансляции в клинику.

Введение

Патологическая картина при травме спинного мозга

При ТСМ различают первичное (в момент травмы) и более опасное вторичное повреждение (2 – 7 сутки), при котором развивается:

- окислительный стресс;
- гибель клеток (некроз, апоптоз, аутофагия);
- локальный воспалительный ответ;
- глутаматергическая эксайтотоксичность (чрезмерная возбудимость);

- угнетение или выключение влияния по нисходящим двигательным и восходящим чувствительным трактам, гибель нейронов в нижележащих сегментах;
- демиелинизация и дефицит проведения импульсов;
- нарушение центрального генератора паттерна.

Молекулярные и клеточные механизмы каждого из этих компонентов при вторичном повреждении детально исследованы и в целом понятны. Но купирование их по отдельности или даже всех вместе оказалось недостаточным для эффективного восстановления функции. Этот вывод лёг в основу представления о существовании неких особых нейрональных ограничений для восстановления нервных связей. Выяснение этих специфических механизмов является областью наибольшего интереса в проблеме стимулирования нейрорегенерации в целом и при ТСМ в частности.

Современные исследования направлены на углубление нашего понимания механизмов четырёх основных компонентов восстановления спинного мозга (рис. 1):

- нейропротекция – защита выживших нейронов от дальнейшего повреждения и гибели;
- регенерация аксонов – стимулирование их роста и восстановление специфических связей с ранее иннервируемыми мишенями;
- замена повреждённых нервных и глиальных клеток;
- основанное на пластичности нейральных структур перепрограммирование ЦНС для восстановления функций.

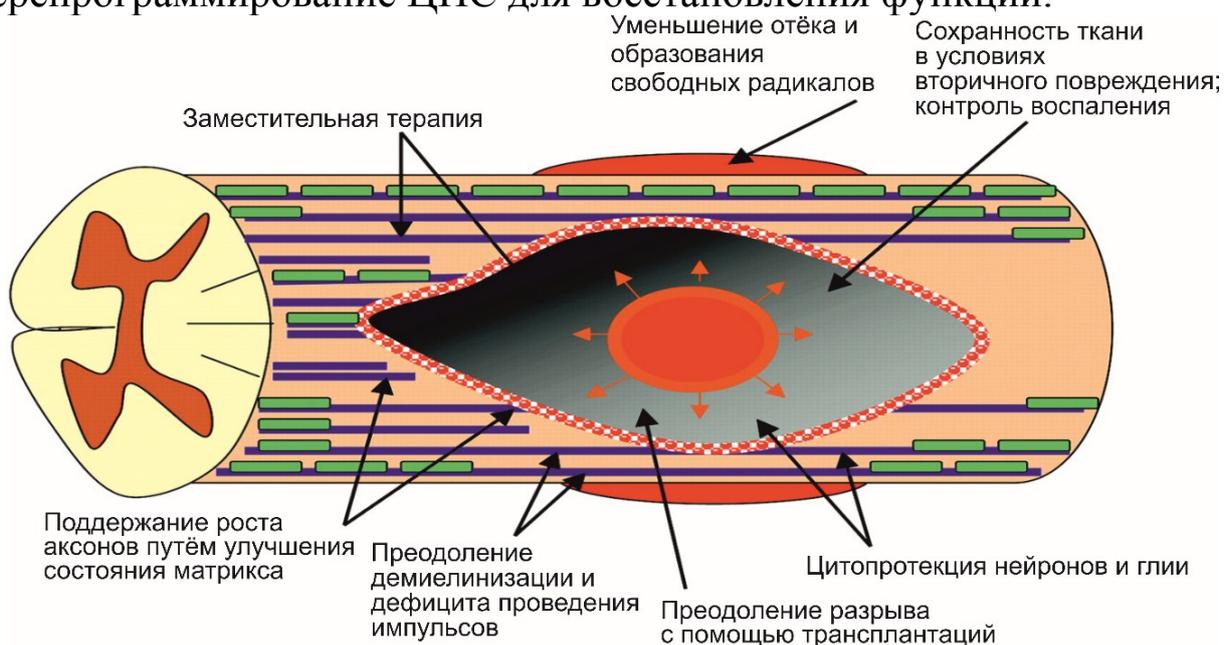


Рис. 1. Травма спинного мозга: задачи патогенетической терапии. (Hulsebosch, 2002)

Посттравматическое восстановление функции спинного мозга предполагает последовательную реализацию следующих событий: нейропротекция → регенерация аксонов → формирование синапсов → восстановление нервных связей.

Нейропротекция при травме спинного мозга

Стратегия нейропротекции направлена на предотвращение гибели клеток преимущественно в результате вторичного повреждения.

Клеточная терапия

По вопросу об эффективности трансплантации клеток при ТСМ, её потенциальных преимуществах и возможных осложнениях существуют противоречивые точки зрения. Исследователи начали работать в этой области с большим энтузиазмом в надежде заменить трансплантируемыми клетками повреждённые и погибшие нейральные клетки в спинном мозге. В результате этих работ идентифицированы многие сигнальные молекулы, контролирующие выживание, миграционный потенциал и дифференцировку стволовых клеток. Эти молекулы могут быть внутриклеточными или внеклеточными, действующими из микроокружения. В любом случае действие этих сигналов опосредуется через различные внутриклеточные сигнальные пути, причём на строго определённых этапах цитодифференцировки. Полученные результаты пока явно недостаточны, чтобы преодолеть сложности, связанные с применением стволовых клеток. Ожидается, что применение клеточной терапии в клинике будет возможно только после проведения гораздо большего количества работ. Результаты доклинических исследований ограничены, но показывают, что клеточные трансплантаты могут поддерживать рост аксонов и стимулировать формирование новых межнейронных связей.

Критерии адекватности трансплантационной клеточной терапии:

- экспрессия фенотипа, обеспечивающего продукцию в новых условиях микроокружения в ткани реципиента, важных для регенерации молекул;
- возможность экспансии *ex vivo* достаточного количества клеток;
- способность к длительному выживанию в ткани реципиента;

- способность к выраженной миграции для поддержания выживания нейронов и роста аксонов реципиента в наибольшем удалении от места введения в мозг трансплантируемых клеток;
- онкогенная безопасность;
- инфекционная безопасность;
- малоинвазивная процедура забора материала.

При ТСМ проведены доклинические исследования с трансплантацией клеток многих типов. По критериям эффективности и безопасности можно выделить некоторые из них:

- *предшественники олигодендроцитов человека*. Миелинизация является одним из важнейших компонентов нейрорегенерации. При ТСМ миелинообразующие клетки, олигодендроциты, вступают в апоптоз, а пролиферативная активность выживших клеток резко снижается, что приводит к демиелинизации, нарушению проведения по аксонам и значительному функциональному дефициту. При ТСМ в модельных экспериментах на животных, а также в клинике у человека сохраняется приблизительно 10 – 15% белого вещества. Сохранение и восстановление функционирующих миелинизированных волокон является критическим условием для регенерации при ТСМ. Трансплантация предшественников олигодендроцитов человека при ТСМ способствует ремиелинизации и восстановлению функции. Исследования продолжаются с целью установления оптимального окна для трансплантации клеток данного типа и оценки потенциальных рисков, связанных с образованием опухолей и воспалительными реакциями.
- *Шванновские клетки* формируют миелин в периферических нервных проводниках. Они окружают и изолируют аксоны периферических нервов и часто вырастают в спинной мозг после травмы. Эти клетки продуцируют компоненты для внеклеточного матрикса, синтезируют и секретируют нейротрофические факторы (НТФ) и не вырабатывают, как олигодендроциты, ингибиторов роста аксонов. Эти свойства шванновских клеток делают их привлекательными для трансплантации в мозг с целью стимулирования процесса ремиелинизации. На модели контузионной ТСМ в шейном отделе установлено, что трансплантация шванновских клеток поддерживает регенерацию аксонов не только в восходящих

чувствительных трактах, но и в протяжённых нисходящих двигательных путях. Трансплантация аутологичных шванновских клеток выявила высокую эффективность ремиелинизации аксонов при ТСМ у обезьян. К сожалению, трансплантируемые при ТСМ шванновские клетки живут не более двух недель. Существенным недостатком трансплантации шванновских клеток в ЦНС является также и то, что они не воспроизводят полностью паттерн миелинизации, характерный для олигодендроцитов. Недавно проведённый мета-анализ эффективности трансплантаций шванновских клеток на 529 животных-грызунах показал лишь умеренное улучшение двигательной функции.

- *Стромальные клетки костного мозга и мезенхимные стволовые клетки.* В ряде исследований было показано, что трансплантация стромальных клеток костного мозга способствует восстановлению функции после ТСМ. Активно исследуют эффекты интратекального введения мезенхимных стволовых клеток. Мета-анализ экспериментальных работ с трансплантацией мезенхимных стволовых клеток также указывает на недостаточное восстановление двигательной функции.
- *Глиальные клетки обонятельных структур.* Эти клетки из обонятельных нервов или наружных областей обонятельной луковицы не являются миелинообразующими, но формируют миелин при трансплантации в ЦНС. Глиальные клетки обонятельных структур, выделенные из слизистой оболочки носа, представляют собой особый тип глиальных клеток, которые способствуют регенерации аксонов и ремиелинизации в месте повреждения. Трансплантированные клетки поддерживают рост аксонов как в периферической, так и в центральной нервной системах и улучшают функциональные результаты. Согласно нашим данным, трансплантация клеток обонятельной выстилки человека в область контузионной ТСМ крысы в грудном отделе приводит к уменьшению объёма разрушенного серого и белого вещества, уменьшению патологических полостей и увеличению количества регенерирующих миелинизированных волокон.
- *Нейральные стволовые клетки.* Отработан оптимальный протокол трансплантаций этих клеток, показано улучшение

функции, причём оно было более выражено при введении клеток в острой фазе, а также на моделях ТСМ с полной перерезкой и контузией. При трансплантации нейральных стволовых клеток было установлено, что применение иммунодепрессантов отрицательно сказывается на восстановлении двигательной функции. Трансплантация клеток в сочетании с тканеинженерными конструкциями эффективно повышает восстановление функции. Недавно опубликованы результаты многообещающего исследования по трансплантации предоставленных фирмой NeuralStem Inc нейральных стволовых клеток из спинного мозга 8-недельного эмбриона человека при ТСМ у приматов. Введение клеток в область гемисекции спинного мозга в шейном отделе к 9 месяцу после травмы заметно улучшало двигательную функцию в передних конечностях, стимулировало регенерацию аксонов и формирование синапсов.

- Мононуклеарные клетки крови пуповины (МККП) человека вырабатывают колониестимулирующий фактор 1 (CSF-1), тромбопоэтин, интерлейкин-11 (IL-11), фактор роста нервов (NGF), сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), что делает их привлекательными для стимулирования нейрорегенерации. Согласно нашим данным, МККП человека хорошо выживают после трансплантации в спинной мозг крысы и характеризуются выраженным миграционным потенциалом. Они присутствуют в спинном мозге крысы после их введения в область контузионной травмы до 30 суток. На 30 сутки после нанесения травмы и введения МККП, трансфицированных плазмидой с геном зелёного флуоресцентного белка в качестве метки, трансплантируемые клетки (МККП+pEGFP-N2) обнаружены на расстоянии 1 см от точки инъекции, что свидетельствует об их выраженном миграционном потенциале.
- *Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC).* При ТСМ трансплантация нейральных клеток-предшественников (NPC) способствует восстановлению функции. В этих работах применяли NPC, которые были в основном получены из эмбриональных стволовых клеток или ткани плода, что вызывает этическую озабоченность. Shinya Yamanaka и его коллеги создали iPSC (Нобелевская премия 2012 г. по физиологии и медицине), которые могут быть

получены из соматических клеток, и эта инновационная разработка была использована для стимулирования регенерации при ТСМ. Трансплантация NPC, полученных из iPSC, продемонстрировала положительные эффекты на моделях ТСМ. Однако технология iPSC пока имеет существенные недостатки в виде генетических и эпигенетических аномалий, а также потенциальной онкогенности. Если их удастся преодолеть, то можно ожидать получения направленно дифференцированных клеток любого типа для аутологичных трансплантаций.



Shinya Yamanaka
Нобелевская премия 2012 года
по физиологии и медицине.
Получение индуцированных
плюрипотентных стволовых
клеток.

Клеточная терапия – клинические испытания

Типы стволовых клеток в проектах, достигших фазы II клинических испытаний:

- нейральные стволовые клетки взрослого человека;
- стволовые клетки спинного мозга человека;
- глиальные клетки обонятельных структур;
- аутологичные шванновские клетки;
- моноклеарные клетки крови пуповины (МККП);
- мезенхимные стволовые клетки взрослого организма;
- аутологичные стволовые клетки из костного мозга.

При ТСМ общее количество зарегистрированных в мире клинических испытаний с биологическими интервенциями, т.е. на основании результатов доклинических исследований молекулярных и клеточных эффектов, достигает ~50, из них на долю клинических

испытаний с трансплантацией клеток приходится немалое количество – 20. Из этих 20 значимые результаты получены только для 7 испытаний, и только одно из них считается завершённым. В подавляющем большинстве (6 проектов) клинических испытаний со значимыми результатами были применены клетки мезенхимного генеза – мезенхимные стволовые клетки (3 испытания) и клетки костного мозга (3 испытания). При этом 4 испытания из 7 проводили на аутологичных клетках (рис. 2).

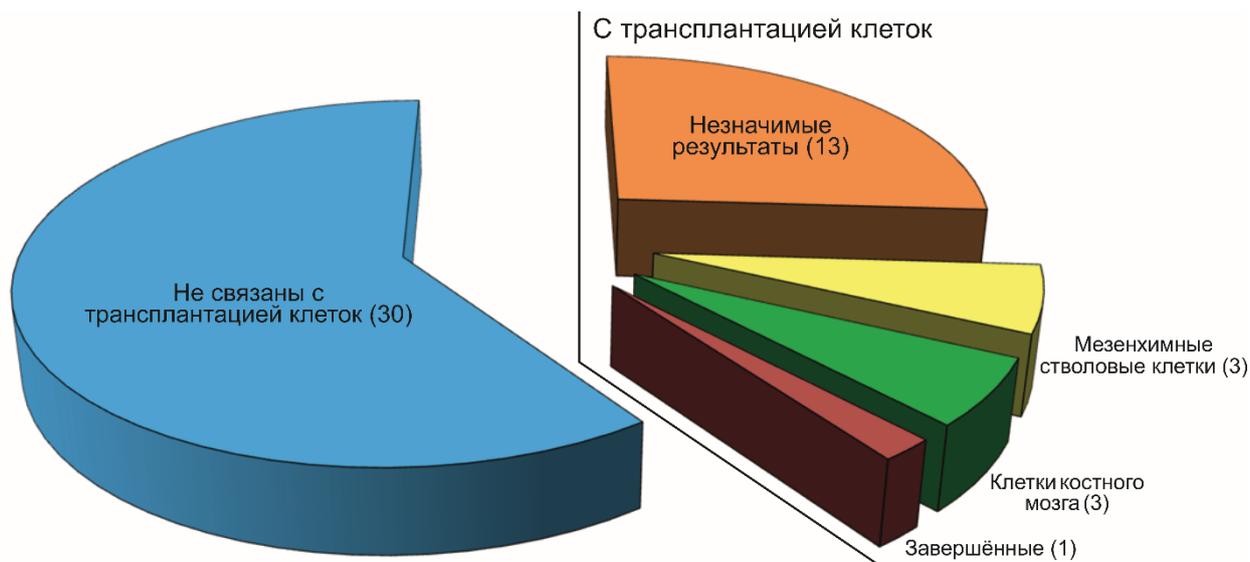


Рис. 2. Клинические испытания применения биологических интервенций в лечении пациентов с травмой спинного мозга.

Генные и генно-клеточные технологии стимулирования регенерации при травме спинного мозга

После идентификации многочисленных эндогенных пептидов-стимуляторов нейрорегенерации встал вопрос об увеличении их присутствия в области повреждения путём прямого введения в ткань.

Нейропротекторную активность при ТСМ связывают с действием следующих белков:

- НТФ – CNTF, NGF, NT3, BDNF, GDNF, IGF-I, VEGF;
- молекулы адгезии клеток (NCAM, L1);
- противоапоптозные молекулы (Bcl-2);
- регуляторы транскрипции (MASH1, noggin, neurogenin-2);
- эритропоэтин;
- колониестимулирующий фактор гранулоцитов (G-CSF).

Проведённые в этом направлении многочисленные эксперименты для достижения желаемого результата выявили необходимость вводить эти биоактивные молекулы, чаще всего

пептиды, в больших дозах. Это сопровождалось нежелательными реакциями иммунокомпетентных клеток, массивной выработкой антител против вводимых антигенов и негативными иммунными реакциями. Кроме того, этот подход предполагает необходимость постоянного и длительного введения пептида, что требует применения минипомпы. Наконец, нежелательным эффектом применения терапевтических пептидов является быстрое их расщепление эндогенными пептидазами.

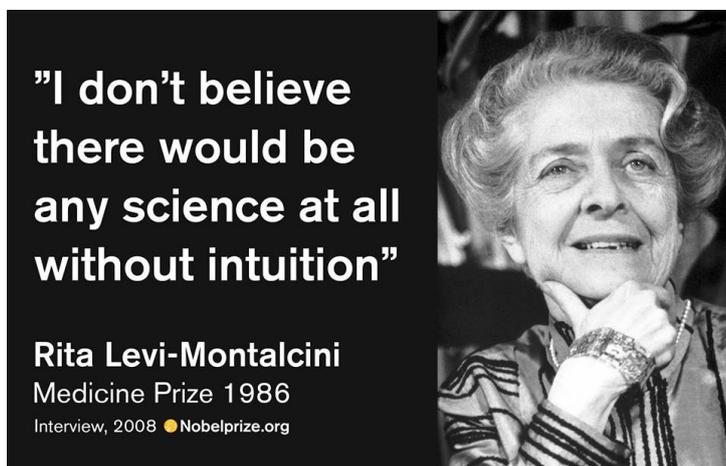
Именно поэтому возникла идея перейти от введения белка к введению кодирующего этот белок гена. Эта идея была успешно реализована и получила дальнейшее развитие как генная терапия. Наиболее продуктивным для стимулирования нейрорегенерации оказалось проведение генной терапии для локального повышения в области повреждения содержания НТФ. На существование и значимость трофических взаимодействий между нейронами и иннервируемыми клетками-мишенями обратил внимание и начал их систематические исследования выдающийся представитель Казанской нейрогистологической школы Борис Иннокентьевич Лаврентьев.



Борис Иннокентьевич Лаврентьев (1892 – 1944). Известный морфолог, автор фундаментальных работ по морфологии автономной нервной системы и чувствительной иннервации. Впервые широко применил эксперимент в нейрогистологических исследованиях. Сформулировал представление о том, что нейроны контролируют иннервируемую ткань-мишень не только при помощи электрических реакций, но также путём трофического влияния.

Концепция НТФ оказалась одной из наиболее плодотворных для объяснения молекулярных механизмов нейрорегенерации. Существует два главных критерия, определяющих принадлежность молекулы к НТФ, – поддержание выживания нейронов и стимулирование роста аксонов. Из НТФ наиболее изучены

нейротрофины, действующие на нейроны через рецепторные тирозинкиназы семейства Trk, а среди нейротрофинов первым был выделен и детально охарактеризован фактор роста нервов (NGF) (Rita Levi-Montalcini, Нобелевская премия 1986 г. за открытие первого НТФ – фактора роста нервов (NGF)).



Rita Levi-Montalcini (1909 – 2012)
Нобелевская премия 1986 года
по физиологии и медицине.
Открытие фактора роста нервов
(NGF).

В наших исследованиях мы применили два рекомбинантных терапевтических гена человека, кодирующих синтез фактора роста фибробластов 2 (FGF2) и сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), которые вначале были идентифицированы и известны как ангиогенные факторы, а позднее для них была доказана нейротрофическая активность.

Кроме прямой инъекции терапевтического гена в ткань, существуют и другие способы доставки, например, на клеточных носителях, с помощью липосом и т.д.

Терапевтический ген доставляют в клетку-мишень при помощи вектора – специального инструмента для доставки генетической конструкции.

Плазмидные векторы активно используют в генной терапии. Плазмиды – внехромосомные факторы наследственности у бактерий. Они представляют собой высокомолекулярные кольцевые двуцепочечные молекулы ДНК, способные нести рекомбинантные гены. Плазмидная ДНК обладает низкой иммуногенностью и не способна к интеграции в эукариотический геном, что делает плазмидные векторы привлекательными для генной терапии. В наших экспериментах с ТСМ мы применили плазмидный вектор pBud-VEGF-FGF2, содержащий два терапевтических рекомбинантных гена VEGF и FGF2 и созданный в КФУ группой А.А. Ризванова.

Регенерация спинного мозга крысы

в условиях прямой и клеточно-опосредованной генной терапии

В наших экспериментах с дозированной ТСМ крысы в каудальном грудном отделе мы инъекцировали плазмиду pBud-VEGF-FGF2 в область повреждения или доставляли её в эту же область при помощи предварительно трансфицированных данной плазмидой МККП человека (рис. 3).

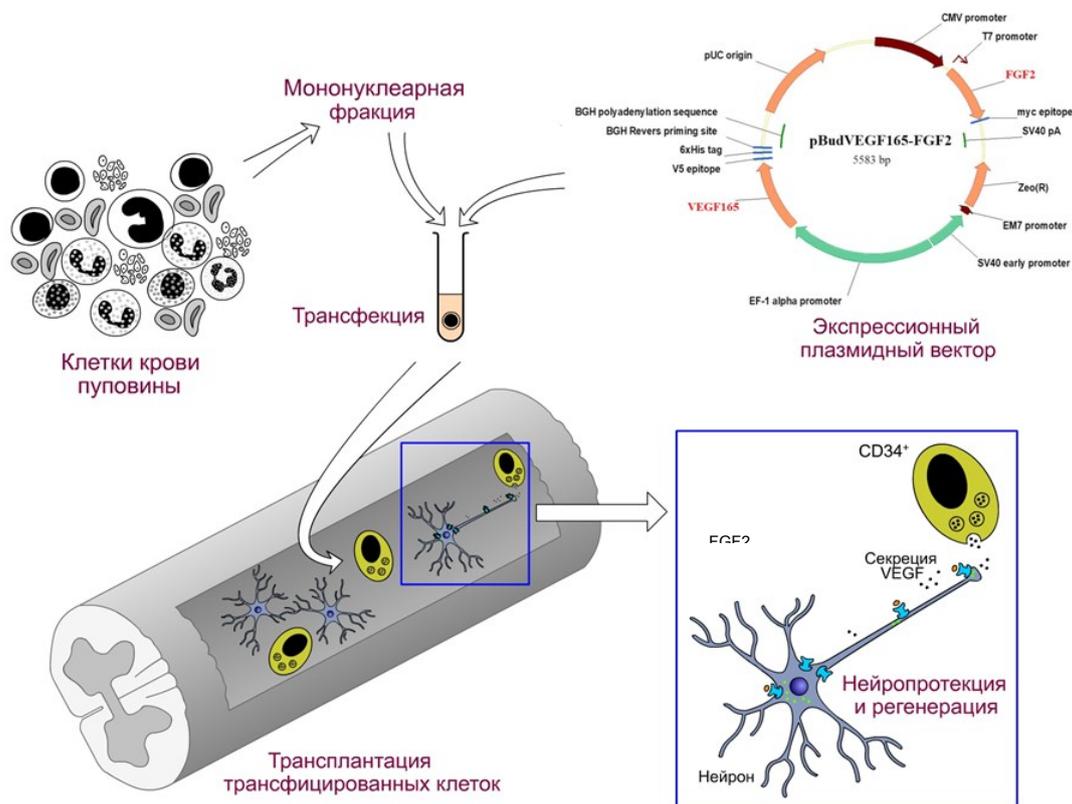


Рис. 3. Трансфекция методом электропорации мононуклеарных клеток крови пуповины (МККП) человека плазмидой pBud с двумя терапевтическими генами, кодирующими синтез нейротрофических и проангиогенных факторов VEGF и FGF2. Трансплантация генетически модифицированных клеток в область ТСМ крысы.

Прямая и клеточно-опосредованная генная терапия приводит в спинном мозге к позитивным структурно-функциональным сдвигам, что проявляется в виде:

- уменьшения объёма дезинтегрированной ткани в сером и белом веществе;
- уменьшения суммарного объёма патологических полостей;
- увеличения количества миелинизированных волокон в белом веществе;

- увеличения количества перицитов в белом веществе;
- улучшения двигательной функции и более раннего её восстановления.

Сравнительная оценка эффективности применения плазмиды pBud-VEGF-FGF2 при доставке с помощью клеточных носителей и при прямой инъекции плазмидной ДНК в область ТСМ показала, что по одним показателям более эффективна прямая генная терапия, а по другим показателям – клеточно-опосредованная терапия. Так, по показателю снижения объёма патологических полостей, по количеству перицитов в белом веществе и показателю восстановления двигательной функции более эффективна прямая генная терапия. Но по критерию ремиелинизации более эффективной оказалась клеточно-опосредованная доставка тех же терапевтических генов. Эти данные дают основание полагать, что при сочетании обоих способов доставки в ткань-мишень терапевтических генов может быть получен более выраженный эффект.

Регенераторный потенциал плазмидной ДНК может быть усилен введением в её состав участков, способных специфично связываться с мембранными рецепторами для увеличения эффективности проникновения плазмиды в клетки спинного мозга. Недостатки клеточной терапии в виде слабого выживания и неконтролируемой дифференцировки в ткани реципиента и, особенно, требования онкогенной и инфекционной безопасности обуславливают актуальность поиска новых способов доставки терапевтических генов, не связанных с клеточными носителями. Достижения в области трансфекции генов делают более реальным применение прямой генной терапии для лечения ТСМ. В этом отношении наиболее перспективной представляется прямая доставка генов в область повреждения при помощи синтетических платформ на основе биосовместимых и биodeградируемых материалов.

*ТСМ: опосредованная вирусным вектором
доставка терапевтических генов*

Один из основных недостатков плазмидных векторов – низкая эффективность трансфекции клеток и ограниченная стабильность в биологических жидкостях. Другим перспективным методом доставки генетического материала в клетки-мишени являются вирусные векторы. С помощью методов генной инженерии в геном вирусов встраивают экспрессионные конструкции, несущие один или

несколько рекомбинантных генов. В настоящее время применяют экспрессионные векторы на основе различных вирусов. Среди них аденовирусы, адено-ассоциированные вирусы, герпесвирусы и ретровирусы.

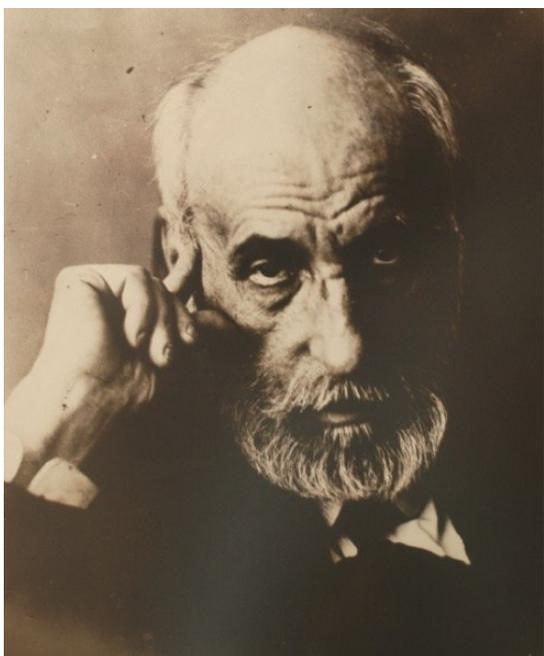
Применение не одного, а комбинации нескольких трансгенов может оказаться более эффективным для восстановления функции, так как различные терапевтические гены в области повреждения могут поддерживать клетки не одного, а нескольких типов и влиять на различные звенья в патогенезе травмы. Поиск такой комбинации представляется особенно актуальным.

В условиях прямой генной терапии нами изучено влияние одновременного введения в область дозированной контузионной ТСМ крысы двух рекомбинантных генов человека – VEGF и ангиогенина (ANG) – при помощи аденовирусного вектора серотипа 5 (Ad5). Генетические конструкции были предоставлены НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (Москва). При их введении зарегистрировано улучшение двигательной функции, но оно не было более выраженным, чем в условиях прямой инъекции в ту же область вышеупомянутой плазмиды pBud-VEGF-FGF2.

В нашем университете группой Р.Р. Исламова исследовано влияние на посттравматическую регенерацию спинного мозга крысы доставки генов, кодирующих VEGF, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), ANG и молекулу адгезии нейронов (NCAM) в двух комбинациях VEGF + GDNF + NCAM и VEGF + ANG + NCAM. Рекомбинантные терапевтические гены в составе аденовирусного вектора (Ad5) вводили интратекально в варианте прямой генной терапии или при помощи МККП человека. Эффективность обоих методов лечения была подтверждена улучшением показателей поведенческого теста. Результаты показывают, что оба подхода с доставкой терапевтических генов поддерживают восстановление функции спинного мозга, что опосредуется через снижение стресса, повышение синаптической пластичности, поддержание пролиферации олигодендроцитов и миелинизации, влияние на астроглиоз за счёт уменьшения количества астроцитов, а также клеток микроглии.

Регенерация аксонов при травме спинного мозга

Ramon y Cajal, выдающийся испанский нейробиолог, создатель нейронной теории, получивший Нобелевскую премию по медицине в 1906 г., впервые подробно описал несостоятельность роста аксонов в повреждённом спинном мозге. В 1905 г. Ramon y Cajal заметил, что регенерирующие аксоны сначала формируют конусы роста, подобные тем, которые наблюдаются при развитии нервной системы, но вскоре происходит их ретракция, коллапс конуса роста, формируются округлые концевые расширения и рост прекращается. До начала 1980-х годов полагали, что нейроны ЦНС лишены способности к регенерации.



Santiago Ramón y Cajal (1852 – 1934)
Нобелевская премия 1906 г. по физиологии и медицине «за работу по изучению структуры нервной системы». Создатель нейронной теории.

Albert Aguayo (1980 – 1981) впервые показал, что аксоны центральных нейронов могут регенерировать в присутствии трансплантата периферического нерва. Позднее А. Aguayo установил, что регенерирующие аксоны могут формировать синапсы и функциональные связи даже у взрослых животных. На основании этих результатов был поставлен вопрос: если нейроны ЦНС в принципе могут регенерировать, что мешает им сделать это после травмы?



Albert Juan Aguayo,
канадский невролог,
президент Международной ор-
ганизации по изучению мозга.
Показал принципиальную
возможность регенерации
аксонов в ЦНС.

По мере углубления знаний о состоянии области повреждения формировались представления о потенциальных возможностях для аксонов прорасти через эту область или обходить её. Эти представления вселили надежду на успешную трансляцию полученных экспериментальных данных по устойчивой и протяжённой регенерации аксонов при травме мозга в клиническую практику. В то же время, эти представления высветили новый набор препятствий, которые должны быть преодолены растущими аксонами для успешной реиннервации своих мишеней. Стало ясным, что аксоны потенциально способны преодолеть физические и химические барьеры глиального рубца. В классических экспериментах, выполненных более века назад, Tello продемонстрировал возможность врастания аксонов центральных нейронов во фрагменты седалищного нерва, трансплантированные в кору головного мозга (Ramón y Cajal, 1928).

С тех пор методы трансплантации позволили получить убедительные доказательства возможности регенераторного роста аксонов в сформированной ЦНС, причём на большие расстояния и с последующим восстановлением функции. Так, на модели гемисекции спинного мозга в шейном отделе (C2) Alilain et al. (2011) показали, что ауто трансплантат большеберцового нерва «разрешает» и облегчает серотонинергическим аксонам спинного мозга обходить область повреждения и иннервировать диафрагмальные двигательные нейроны, расположенные в дистальных сегментах C3 – 6 спинного мозга. Морфологические признаки регенерации сопровождалось улучшением электрогенеза и выраженным восстановлением функции парализованной диафрагмы. Кроме того, в трансплантате было

показано появление волокон, которые ретранслируют импульсы из дыхательных центров продолговатого мозга.

Tom et al. (2009) в аналогичных экспериментах с трансплантацией фрагментов периферического нерва установили, что аксоны могут прорасти через трансплантат и частично восстанавливать функцию в спинном мозге при хронической травме. Таким образом, хотя многие барьеры препятствуют регенерации аксонов в ЦНС при отсутствии экзогенного вмешательства, тем не менее аксоны ЦНС могут расти на большие расстояния и устанавливать функциональные связи с неповреждёнными нейронными сетями.

Почему аксоны в зрелом мозге, в отличие от периферической нервной системы, не регенерируют?

При нарушении нервных связей аксоны в ЦНС не регенерируют. Критическим условием нормального функционирования мозга является поддержание стабильных нервных связей. Стабильность обеспечивается многочисленными молекулами, которые ингибируют рост аксонов. При ТСМ их продуцируют астроциты и другие клетки в области повреждения, а общее количество таких молекул в глиальном рубце достигает трёх десятков. Среди молекул-ингибиторов – хондроитинсульфат протеогликаны (ХСПГ) семейства лектиканов, эфрины, нетрины, нейропиллины, плексины, молекулы slit и другие. При ТСМ действие этих молекул проявляется преимущественно в области глиального рубца. В последнее время установлено, что в глиальном рубце молекулы-ингибиторы роста аксонов вырабатываются не только реактивными астроцитами, но и клетками других типов, что расширяет список потенциальных терапевтических мишеней при ТСМ.

Глиальный рубец – новый взгляд

При ТСМ на внешней границе области повреждения реактивные астроциты формируют глиальный рубец (рис. 4). В соответствии с существовавшей догмой глиальный рубец рассматривается как главное препятствие для роста и регенерации повреждённых аксонов. Действительно, рубец содержит все вышеупомянутые молекулы-ингибиторы роста аксонов. Однако в последнее время в составе глиального рубца было выявлено присутствие так называемых перmissive молекул, стимулирующих рост аксонов. Среди них некоторые ХСПГ (CSPG4, или NG2, а также CSPG5, или

нейрогликан С), ламинины, синдеканы, глипиканы, декорин и другие. Оказалось, что в глиальном рубце количество пермиссивных молекул даже превышает количество известных молекул-ингибиторов роста аксонов. Более того, в изящных экспериментах с привлечением молекулярно-генетических методик при ТСМ предотвращали образование глиального рубца или его удаляли, а также подавляли популяцию рубец-образующих реактивных астроцитов, что ни при каких условиях не стимулировало рост аксонов. Открытие пермиссивных для роста аксонов молекул в глиальном рубце освежило старое представление о роли глиального рубца как позитивного фактора, ограничивающего распространение повреждения на соседнюю ткань спинного мозга. Но главное значение этих исследований состоит в выявлении в составе глиального рубца конкретных молекул-стимуляторов роста аксонов.

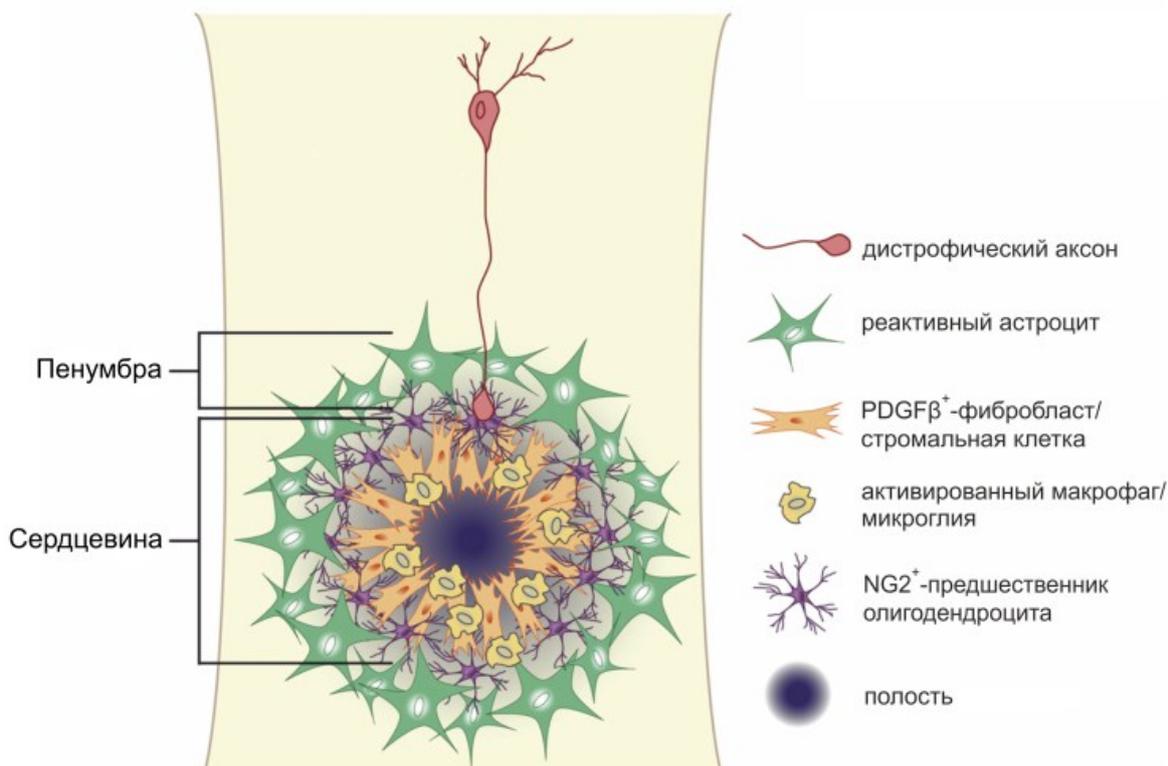


Рис. 4. Область травмы спинного мозга – локализация глиального рубца. Наружная часть, или пенумбра, содержит гипертрофированные реактивные астроциты, в центральной части присутствуют глиальные NG2 клетки, фибробласты и макрофаги/микроглия. [Cregg et al., 2014]

Молекулы-ингибиторы роста аксонов, идентифицированные в глиальном рубце, функционируют и в интактном мозге, стабилизируя нервные связи. Они включены в перинейрональную сеть, окружающую тела нейронов, и в перисинаптический матрикс. Находясь в составе этих структур, молекулы-ингибиторы

ограничивают пластичность нейронов, рост аксонов и стабилизируют синаптические контакты.

Расщепление ХСПГ при помощи хондроитиназы ABC, бактериального фермента, получаемого из *Proteus vulgaris*, – эффективный способ стимулирования регенерации аксонов. При расщеплении хондроитиназой ABC ХСПГ, входящих в состав перинейрональной сети, нейроны становятся более пластичными, что проявляется в усилении образования отростков и новых синаптических контактов.

Ингибиторы роста аксонов из олигодендроцитов и миелина

Другим источником молекул-ингибиторов роста аксонов являются миелин-образующие клетки – олигодендроциты. В эту группу молекул входят белок Nogo-A, миелин-ассоциированный гликопротеин (MAG) и гликопротеин миелина олигодендроцитов (OMGP).

Универсальный механизм действия ингибиторов роста аксонов из разных клеточных источников

Молекулярный механизм ингибирования роста аксонов со стороны ХСПГ запускается путём их связывания с несколькими рецепторными белками. Среди них РТРσ, LAR, NgR1 и NgR3. ХСПГ могут подавлять рост аксонов путём блокирования рост-поддерживающих молекул, таких как ламинин и его рецептора интегрин.

В механизме действия молекул-ингибиторов роста аксонов из миелина участвуют рецепторы NgR1, NgR2 и PirB (рис. 5).

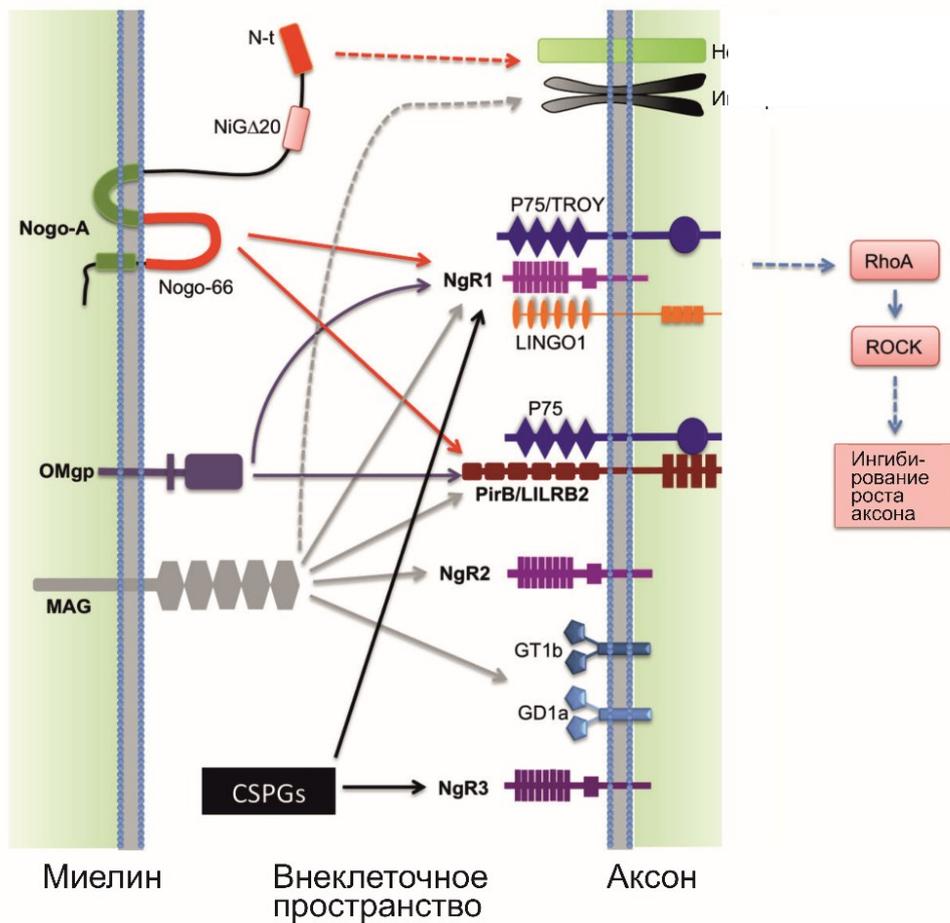


Рис. 5. Взаимодействие ингибиторных молекул-лигандов из реактивных астроцитов (хондроитинсульфат протеогликаны, CSPG) и олигодендроцитов (Nogo-A, OMgp и MAG) со своими рецепторами (NgR1, NgR2, NgR3, PirB) в мембране нейрона активирует в нём внутриклеточный сигнальный путь RhoA-ROCK и блокирует рост аксонов. (Geoffroy, Zheng, 2014)

Доставка при помощи лентивирусного вектора малой РНК-шпильки, которая интерферирует с РНК белка-рецептора NgR1 и разрушает её, стимулирует регенерацию аксонов и восстановление двигательной функции при ТСМ.

Синтезирован пептид, который, будучи доставленным в клетку, избирательно связывается с внутриклеточным так называемым клиновидным доменом рецептора РТРσ и блокирует его активность, что отменяет ингибирующее действие ХСПГ через этот рецептор и усиливает регенерацию аксонов.

Сигнальный путь RhoA – Rho-киназы – PTEN и нейродегенерация

Взаимодействие молекул-ингибиторов со своими рецепторами активирует внутриклеточный сигнальный путь RhoA – Rho-киназы – PTEN и инактивирует сигнальные пути Akt и Erk.

Активация рецепторов, через которые действуют все молекулы-ингибиторы роста аксонов, стимулирует малую ГТФазу RhoA, которая, в свою очередь, активирует Rho-киназу (ROCK) (рис. 6). В ответ на это ROCK фосфорилирует не менее четырёх молекулярных мишеней, которые негативно регулируют рост аксонов. Это фосфатаза и гомолог тензина на хромосоме 10 (PTEN), LIM-киназа (LIMK), лёгкая цепь миозина (MLC) и медиаторный белок 2 ответа на коллапс (CRMP2). В результате этих взаимодействий актиновый компонент цитоскелета дезинтегрируется, аксоны подвергаются ретракции, их рост останавливается.

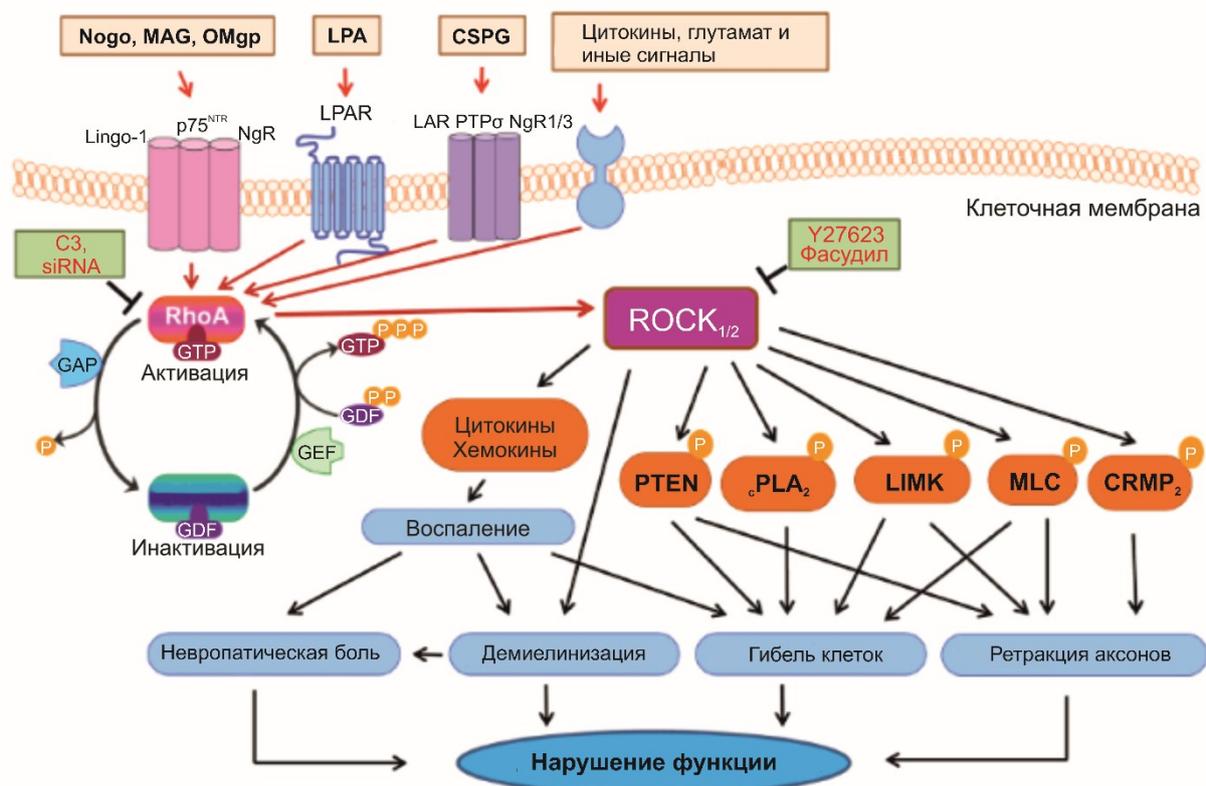


Рис. 6. Роль внутриклеточного сигнального пути RhoA – Rho-киназы – PTEN в нейродегенерации. (Wu, Xu, 2016)

Было установлено, что ингибирование сигнального пути RhoA – Rho-киназы – PTEN усиливает рост аксонов при ТСМ. Получены и исследованы ингибиторы каждого звена в этом пути. Так, RhoA ингибируется С3 экзоферментом *Clostridium botulinum* С3, который является прототипом АДФ-рибозилтрансфераз. Соединения фасудил и Y-27632 ингибируют ROCK, а соединение bpV(pic) оказывает избирательное ингибирующее влияние на PTEN. Оказалось, что действие этих ингибиторов в конкретных звеньях сигнального пути RhoA – Rho-киназы – PTEN не только стимулирует

посттравматическую регенерацию аксонов, но также препятствует гибели клеток, снижает выраженность воспалительного ответа, демиелинизацию и невропатическую боль.

Ограничением к применению ингибиторов RhoA – Rho-киназы – PTEN при ТСМ является известное для данного сигнального пути ингибирование пролиферации клеток. Выключение этого влияния может стимулировать нежелательное размножение клеток, что увеличивает риск опухолевого роста.

Аксоны ЦНС могут регенерировать, но не образуют специфичные связи.

Получены данные, указывающие на возможность стимулировать рост повреждённых аксонов путём воздействия на внутриклеточные сигнальные пути непосредственно в нейронах спинного мозга. Принципиально новые данные по стимулированию регенерации аксонов в ЦНС были получены на модели зрительного нерва. В ходе недавних исследований в нейронах идентифицированы два сигнальных пути, которые регулируют рост аксонов. Выключение PTEN (негативный регулятор передачи сигналов в каскаде mTOR) или супрессора цитокиновой сигнализации 3 (SOCS3, негативный регулятор передачи сигналов в каскаде JAK/STAT) способствует устойчивой регенерации аксонов ганглиозных клеток сетчатки после травмы зрительного нерва. Кроме того, было показано, что нокаун, или делеция, гена PTEN в проекционных нейронах кортикоспинального тракта позволяет восстанавливать аксоны в этом тракте после повреждения. Более того, было установлено, что совместная делеция генов PTEN и SOCS3 обеспечивает устойчивую регенерацию аксонов ганглиозных клеток сетчатки в составе зрительного нерва и часто даже после их прохождения через зрительный перекрест.

Хотя уже сегодня можно инициировать прорастание аксонов через область повреждения или в обход её, направление роста этих аксонов к соответствующим мишеням остаётся предметом изучения. Используя 3D-визуализацию в сочетании с техникой очистки ткани, Luo et al. (2013) показали, что делеция генов PTEN/SOCS3 в ганглиозных клетках сетчатки позволяет аксонам расти на большие расстояния. Оказалось, однако, что это не решает проблему восстановления функции. Регенерирующие аксоны обнаруживают aberrantное поведение. Оно проявляется в том, что 40% регенерирующих аксонов совершают разворот и растут в обратном

направлении, а 10% аксонов способны продвигаться в дистальном направлении ещё дальше, но всё равно разворачиваются. Было установлено, что большое количество разворотов коррелирует с интенсивной активацией астроглии, что указывает на то, что реактивные астроциты вдали от места повреждения могут вводить регенерирующие аксоны в зрительный нерв. В нейрогенезе растущие аксоны зрительного нерва достигают точки принятия решения в перекресте (хиазме), где они распределяются между трактами на своей (ипсилатеральной) и противоположной (контралатеральной) стороне примерно поровну. Такое распределение регенерирующих аксонов нарушается, и они не достигают своих мишеней в таламусе или тектуме. Таким образом, молекулярные сигналы, которые в нейрогенезе контролировали направленный рост аксонов, не сохранились в сформированном мозге. Чтобы обеспечить целевую реиннервацию очень сложных топографически организованных систем, таких как зрительная или двигательная кортикоспинальная, необходимы новые идеи, методы и подходы.

Тканеинженерные технологии стимулирования нейрорегенерации при ТСМ

Нервная ткань состоит из клеток и внеклеточного матрикса, который заполняет 20% объёма мозга и содержит молекулы, рассматриваемые сегодня в качестве терапевтических мишеней. Для целей нейрорегенерации и восполнения дефекта ткани важно восстановить не только клеточные популяции и как следствие межклеточные коммуникации, но и матрикс ткани, в основе которого лежит гидрогель. Создание гидрогелевых конструкций на основе пептидных наносистем с самосборкой является одним из наиболее перспективных способов реконструкции дефектов ткани в ЦНС.

Самоорганизующиеся пептидные гидрогели

Имплантируемые гидрогелевые полимеры являются привлекательной средой для заполнения патологических полостей. Их пористая структура обеспечивает миграцию клеток и диффузию питательных веществ. Гидрогели также могут функционировать в качестве средств доставки клеток и лекарств в область повреждения. Гидрогели способны поддерживать выживание и дифференцировку трансплантируемых клеток и сдерживать нежелательные иммунные реакции. При ТСМ детально исследована эффективность применения

различных биоматериалов, включая агарозу, коллаген, гиалуронан/метилцеллюлозу, фибрин и альгинат, и установлено их позитивное влияние на нейрорегенерацию. Активно продолжаются работы по модификации и адаптации гидрогелей для доставки в область повреждения НТФ, таких как BDNF, NT-3 и GDNF, факторов роста, иммуномодуляторов и других терапевтических молекул.

Синтетические самоорганизующиеся пептидные гидрогели являются уникальными тканеинженерными конструкциями. Будучи жидкими при температуре окружающей среды, при введении в организм млекопитающих они самособираются в биосовместимую структуру из нановолокон, сходную с нативным внеклеточным матриксом. Самоорганизующиеся пептидные гидрогели, имплантированные в область повреждения спинного мозга, уменьшают астроглиоз и гибель клеток и улучшают регенерацию аксонов. Применение самоорганизующихся пептидных гидрогелей в эксперименте повышает эффективность совместной трансплантации нейральных стволовых клеток и улучшает функцию передних конечностей при ТСМ в шейном отделе. Технология создания и применения самоорганизующихся пептидных гидрогелей с элюированием лекарств быстро развивается и становится всё более привлекательной.

Печать биомиметических каркасов на биопринтере

Современные технологии биопечати тканей пока не позволяют создавать сложные трёхмерные микроархитектуры, обеспечивающие эффективное управление ростом клеток и ускорение созревания тканей. 3D печать структур мозга не была осуществлена, возможно, из-за сложности морфологической организации ЦНС. В последнее время для этой цели разработан микромасштабный метод непрерывной проекционной печати, который даёт возможность воспроизводить сложную структуру ЦНС для стимулирования посттравматической регенерации спинного мозга. Метод непрерывной проекционной печати позволяет создавать трёхмерные биомиметические гидрогелевые каркасы, адаптированные к размерам спинного мозга грызунов, а также масштабируемые под размеры спинного мозга человека и геометрию поражения. Исследованы возможности трансплантации подобных каркасов, загруженных предшественниками нейральных клеток, поддерживать регенерацию аксонов и формировать новые нейронные сети в местах полного

разрыва спинного мозга у грызунов. На данной экспериментальной модели показано прорастание регенерирующих аксонов в трёхмерный биомиметический каркас, формирование в нём синапсов, а также установлена возможность выхода регенерирующих аксонов из тканеинженерной конструкции в ткань спинного мозга для дальнейшего роста и восстановления функции.

Нейропластичность и перепрограммирование связей в ЦНС

Восстановление после ТСМ может происходить в течение некоторого времени после повреждения как часть способности мозга реорганизовывать старые или формировать новые нервные пути и связи. Такая возможность в ЦНС существует благодаря феномену нейропластичности, способности мозга изменяться и адаптироваться к новым условиям функционирования. В интактном мозге нейропластичность имеет значение для проявления высших функций нервной системы – обучения и памяти, а в условиях патологии значима для поддержания или восстановления функции.

Центральный генератор паттерна. Контроль двигательной функции со стороны спинного мозга связан с работой в нём центрального генератора паттерна – локальной нейронной сети, кластера взаимосвязанных нейронов, который воспроизводит стереотипную активность при отсутствии сенсорного входа. Ритмические паттерны возникают в спинном мозге и координируют сокращения сотен мышц. Центральный генератор паттерна воспроизводит двигательную команду для каждой мышцы конечностей, устанавливает ритм локомоторных циклов и обеспечивает внутримышечную и межмышечную координацию.

Реактивация центрального генератора паттерна – облигатное условие для восстановления движений после ТСМ. Она достигается в ходе переучивания мозга при помощи сочетания агрессивной физиотерапии, активных физических упражнений, применения электростимуляции и роботизированной терапии.

Центральный генератор паттерна является доказанной мишенью для нейрореабилитации с целью улучшения опорно-двигательной функции у пациентов после ТСМ. На феномене нейропластичности базируются способы реабилитации, которые разрабатывали на протяжении последних десятилетий для преодоления последствий ТСМ. Стало понятным, что стандартная парадигма реабилитации, основанная на произвольных движениях и применении только одной

беговой дорожки при тяжёлой ТСМ не приводит к желаемым результатам. Исследования последнего времени в области нейрореабилитации при ТСМ указывают на перспективность посттравматической перестройки локальных нейронных сетей с применением следующих методик и технологий:

- электростимуляция спинного мозга (чрескожная, эпидуральная) и двигательных центров головного мозга;
- электрохимическая нейромодуляционная терапия, предполагающая сочетание электростимуляции с воздействием на рецепторы серотонина (5HT1a, 5HT2, 5HT7) и дофамина (D1), активация которых в интактном спинном мозге обеспечивается соответствующими медиаторами из нейронов ствола мозга;
- роботизированные технологии экзоскелета.

Заключение

По мере накопления новых фактов проблема регенерации спинного мозга оказалась более сложной, чем представлялась ранее. Выживание нейронов, регенерация их отростков и даже формирование новых синапсов, – всё это является необходимым, но недостаточным условием для восстановления двигательной, чувствительной и вегетативной функции. Для трансляции достижений экспериментальной терапии в практику более эффективного лечения пациентов с ТСМ следует признать существенно важным комбинаторный подход, учитывая многофакторную природу ТСМ и процесса нейрорегенерации. В ближайшее десятилетие экспертное сообщество по проблеме ТСМ значительное улучшение результатов лечения связывает с применением хондроитиназы ABC, ингибированием сигнального пути Rho-ROCK, с биоинженерными технологиями и новыми достижениями нейрореабилитации.

Вернёмся, однако, с мировых просторов исследования ТСМ в *Alma mater*. Сегодня в КГМУ активно работает коллектив молодых талантливых исследователей и имеется возможность продолжения и развития работ по поиску новых эффективных подходов к лечению пациентов с ТСМ и трансляции результатов фундаментальных работ в клинику.

Список принятых сокращений

МККП – моноклеарные клетки крови пуповины

НТФ – нейротрофический фактор

ТСМ – травма спинного мозга

ХСПГ – хондроитинсульфат протеогликан

Челышев Юрий Александрович

**СПИННОЙ МОЗГ:
ТРАВМАТИЧЕСКОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ
И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ МИШЕНИ**

Редактор Деговцова Е.В.