

**Агатиева Элима Арбиевна**

**ДОСТАВКА РЕКОМБИНАНТНОГО ГЕНА ЛАКТОФЕРРИНА  
ДЛЯ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ ОСТРОГО  
ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА  
В ПОДНИЖНЕЧЕЛЮСТНОЙ ОБЛАСТИ КРЫСЫ**

3.3.3. – Патологическая физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Казань – 2024

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

**Научный руководитель:** **Исламов Рустем Робертович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии

**Официальные оппоненты:** **Власова Татьяна Ивановна**, доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва», г. Саранск

**Ершов Антон Валерьевич**, доктор медицинских наук, профессор кафедры патофизиологии Института цифрового биодизайна и моделирования живых систем Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), г. Москва

**Ведущая организация:** Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского»

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г. в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 21.2.012.02 при ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России по адресу: 420012, г. Казань, ул. Бутлерова, 49.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России по адресу: 420012, г. Казань, ул. Бутлерова, 49б, и на сайте организации (<http://kazan-gmu.ru>).

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

д-р мед. наук, доцент



О.Р. Радченко

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность и степень разработанности темы исследования.** Острые гнойно-воспалительные заболевания (ОГВЗ) челюстно-лицевой области (ЧЛО) до настоящего времени остаются основной причиной обращения пациентов в профильные медицинские учреждения и относятся к актуальным проблемам челюстно-лицевой хирургии (ЧЛХ), как в теоретическом, так и практическом аспектах. Количество пациентов с ОГВЗ ЧЛО доходит до 60–70% общего числа лиц, нуждающихся в госпитализации в отделения ЧЛХ (Зобенко В.А., Редько А.Н., 2016). Причем причиной ОГВЗ у таких пациентов в 60–80% случаев является одонтогенная инфекция (Лепилин А.В. и соавт., 2017), распространяющаяся на окружающие ткани с развитием флегмон и абсцессов ЧЛО (Конев С.С. и соавт., 2016).

Несмотря на постоянно совершенствующуюся систему оказания хирургической помощи пациентам с ОГВЗ ЧЛО, отмечается лишь незначительное снижение таких пациентов. Флегмоны с атипичным течением, например, вялотекущие или молниеносно развивающиеся, в результате неэффективной терапии часто осложняются генерализацией инфекции, приводя к развитию медиастинитов, менингоэнцефалитов, угрожающих жизни пациентов (Флейшер Г.М., 2017). Снижение чувствительности патогенных микроорганизмов к антибактериальным препаратам, ослабление иммунной системы и «фармакологическая перенасыщенность» организма пациента являются основными патогенетическими факторами увеличения тяжести течения ОГВЗ и серьезными их осложнениями (Митрофанова Н.Н. и соавт., 2017). Вышесказанное дает основание полагать, что в сложившихся условиях для лечения ОГВЗ ЧЛО необходимы поиск, разработка и внедрение в практику ЧЛХ новых эффективных терапевтических способов, учитывающих новые патогенетические аспекты развития ОГВЗ ЧЛО.

В настоящее время одним из перспективных направлений лечения инфекционных заболеваний является генная терапия – область биотехнологических разработок, направленных на использование рекомбинантных терапевтических генов человека, кодирующих природные противомикробные белковые молекулы (Huang G.T.J. et al., 2002). Генная терапия инфекционных заболеваний занимает 7% всех клинических испытаний

генной терапии, где основной мишенью является вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) (Ginn S.L. et al., 2018). Аденовирусные векторы, несущие гены, кодирующие фактор некроза опухоли (TNF $\alpha$ ),  $\beta$ -дефензин-3 и кателидин LL-37, были испытаны на мышах с экспериментальным латентным туберкулезом (Ramos-Espinosa O. et al., 2016). Другой целью генной терапии инфекционных заболеваний является временное изменение функции эпителиальных клеток для увеличения выработки встречающихся в природе антимикробных молекул. В основном такая генная терапия была исследована как способ лечения ожоговых ран (Jacobsen F. et al., 2005) и диабетических раневых инфекций (Hirsch T., 2009). При этом возможность применения генной терапии для лечения ОГВЗ все еще остается мало изученной.

Лактоферрин (ЛФ) относится к белкам первой линии защиты и обладает иммуностимулирующей, противовоспалительной, противогрибковой, антибактериальной, противовирусной, антипаразитарной и антиканцерогенной активностью (Kanwar J. et al., 2015; Kruzel M.L. et al., 2017; Kell D.V. et al., 2020). Эффективность применения рекомбинантного лактоферрина для снижения риска развития сепсиса доказана у новорожденных (Manzoni P. et al., 2010; Ochoa T.J. et al., 2015). Очевидно, что разработка генной терапии ОГВЗ ЧЛО с использованием гена, кодирующего ЛФ, и установление механизмов коррекции гнойно-воспалительного процесса с помощью ЛФ представляет особый интерес.

В отличие от прямой (*in vivo*) генной терапии, основанной на доставке комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты (кДНК) терапевтического гена с помощью генетической конструкции (плазмидного или вирусного вектора) непосредственно в организм реципиента, при клеточно-опосредованной (*ex vivo*) генной терапии рекомбинантные гены доставляют с помощью аутологичных или аллогенных клеток, генетически модифицированных до введения реципиенту (High K.A., Roncarolo M.G., 2019). Такой способ исключает прямое токсическое и иммуногенное действие вирусных частиц на организм. Особый интерес при доставке терапевтических генов вызывают мононуклеарные клетки крови пуповины (МККП) человека (Yang W.Z. et al., 2010). Простота получения и доступность клеточного материала, а также способность МККП продуцировать различные

биологически активные молекулы с иммуностимулирующими, противовоспалительными, антиоксидантными и ангиогенными свойствами указывают на целесообразность применения МККП для клеточно-опосредованной генной терапии инфекционных заболеваний (Allan D.S., 2020). При этом терапевтическая эффективность МККП может быть значительно увеличена путем их генетической модификации, направленной на временную продукцию рекомбинантных терапевтических молекул с антимикробными свойствами. Таким образом, генетически модифицированные МККП могут быть использованы для доставки терапевтических генов в ткани-мишени и обеспечить локальную секрецию рекомбинантных молекул. Эффективность генетически модифицированных МККП была изучена в моделях различных патологических процессов (Ikeda Y. et al., 2004; Chen H.K. et al., 2005), но отсутствуют исследования с использованием генетически модифицированных МККП для лечения ОГВЗ ЧЛО.

**Цель исследования:** установление эффективности и механизмов коррекции острого гнойного воспалительного процесса в поднижнечелюстной области крысы посредством введения рекомбинантного репликативно-дефектного аденовируса человека 5-го серотипа, содержащего кДНК гена лактоферрина (Ad5-LTF) или генетически модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины человека, несущих кДНК гена лактоферрина (МККП+Ad5-LTF).

**Задачи исследования:**

1. Разработать способ моделирования острого гнойного воспалительного процесса в поднижнечелюстной области крысы с учетом патогенетических принципов развития флегмоны в челюстно-лицевой области человека.

2. Изучить механизмы развития острого гнойного воспалительного процесса в поднижнечелюстной области крысы после введения гнойного перитонеального экссудата под надкостницу нижней челюсти с вестибулярной поверхности ротовой полости.

3. Получить генный и генно-клеточный препараты на основе рекомбинантного репликативно-дефектного аденовируса человека 5-го серотипа, несущего кДНК гена лактоферрина человека, и мононуклеарных клеток крови пуповины (МККП) человека для коррекции острого гнойного воспалительного процесса в поднижнечелюстной области крысы.

4. Оценить экспрессию рекомбинантного гена лактоферрина в МККП+Ad5-LTF *in vitro* и миграцию генетически модифицированных МККП после инъекции в здоровые ткани вокруг флегмоны.

5. Оценить эффективность и изучить механизм действия генного (Ad5-LTF) и генно-клеточного (МККП+Ad5-LTF) препаратов при их использовании для коррекции развития острого гнойного воспалительного процесса в поднижнечелюстной области крысы.

**Научная новизна.** Разработан оригинальный способ моделирования флегмоны поднижнечелюстной области у крысы, включающий в себя введение перитонеального гнойного экссудата, полученного от другой крысы, под надкостницу нижней челюсти с вестибулярной поверхности полости рта (патент РФ на изобретение № 2694488). Получены новые сведения о патогенезе острого гнойного воспалительного процесса в этих условиях.

Для терапии флегмоны получен генно-клеточный препарат на основе репликативно-дефектного аденовируса человека 5-го серотипа, содержащего кДНК гена лактоферрина человека (Ad5-LTF), и МККП человека (МККП+Ad5-LTF) с подтвержденной эффективностью экспрессии трансгена *in vitro*. Выявлено, что после инъекции в здоровые ткани вокруг флегмоны препаратов, содержащих ген *LTF* (Ad5-LTF и МККП+Ad5-LTF), они с током тканевой жидкости попадают в регионарные шейные лимфатические узлы, где обеспечивают локальную продукцию рекомбинантных молекул, что свидетельствует о возможном паракринном иммуномодулирующем механизме действия лактоферрина на сохранность и активирование лимфоидной ткани в шейных лимфатических узлах, что в свою очередь оказывает положительное влияние на регрессию флегмоны поднижнечелюстной области у крысы (патент РФ на изобретение № 2746031). Доказано более быстрое заживление раны и лучшие результаты ремоделирования шейных лимфатических узлов у животных на фоне введения генно-клеточного препарата (МККП+Ad5-LTF), что свидетельствует о большей эффективности использования генно-клеточного препарата для коррекции острого гнойного воспалительного процесса в поднижнечелюстной области крысы.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Известно, что короткий период полураспада рекомбинантного ЛФ ограничивает его

терапевтический потенциал. В этой связи научная значимость проведенного исследования заключается в получении генно-клеточной конструкции, эффективно экспрессирующей рекомбинантный ген LTF, что позволяет обеспечить постоянную продукцию рекомбинантного белка лактоферрина в очаге острого гнойного воспалительного процесса в течение функциональной активности аденовирусного вектора, т.е. продолжительностью до 3-х недель. Теоретическая значимость также обусловлена раскрытием одного из механизмов действия рекомбинантного лактоферрина, который заключается в положительном влиянии на регионарные лимфатические узлы.

Практическая значимость исследования состоит в том, что разработаны способы доставки гена лактоферрина путем однократного обкалывания гнойного очага по периметру в 5 точках генным препаратом (Ad5-LTF), содержащим  $1 \times 10^8$  вирусных частиц в 0,5 мл физиологического раствора, или генно-клеточным препаратом, содержащим  $1 \times 10^6$  генетически модифицированных моноклеарных клеток крови пуповины человека (МККП+Ad5-LTF) в 0,5 мл физиологического раствора. Кроме того, сформулировано и обосновано новое направление лечения ОГВЗ ЧЛО, основанное на использовании рекомбинантного гена LTF для прямой генной терапии с помощью аденовирусного вектора или клеточно-опосредованной генной терапии с помощью МККП человека. Данные, полученные в проведенном исследовании, открывают обнадеживающие перспективы по разработке методов генной терапии острых ОГВЗ ЧЛО человека и могут явиться основой для начала доклинических испытаний.

**Методология и методы исследования.** Исследование было одобрено Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России (Протокол №6 от 2018 г). Разработанный способ моделирования флегмоны у крысы не требует создания системного иммунодефицита, что исключает влияние иммунодепрессантов на патогенез воспаления и обеспечивает развитие флегмоны, патогномичной таковой у человека в реальной клинической ситуации. Препараты для лечения флегмоны получены с использованием рекомбинантных репликативно-дефектных аденовирусных векторов, несущих кДНК гена *LTF* или гена зеленого флуоресцирующего белка (*gfp*), созданных на основе аденовируса человека 5-го серотипа (Ad5) в НИЦЕМ

им. Н.Ф. Гамалеи (Москва). Для оценки терапевтической эффективности препаратов в работе были применены молекулярные, микробиологические, гистологические, иммунофлуоресцентные методы исследования.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Доставка кДНК гена лактоферрина с помощью аденовирусного вектора или генетически модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины человека является эффективным средством для коррекции острого гнойного воспалительного процесса в поднижнечелюстной области крысы.

2. Механизм положительного действия рекомбинантного лактоферрина при флегмонах поднижнечелюстной локализации основан на стимулировании иммунной системы, а именно, на предотвращении развития гнойного лимфаденита и активировании лимфоидной ткани в регионарных лимфатических узлах.

**Степень достоверности и апробация работы.** В проведенном исследовании согласно поставленной цели и задачам был разработан детальный план эксперимента, для выполнения которого были использованы современные молекулярные, иммунофлуоресцентные, микробиологические и гистологические методы исследования. Для подтверждения достоверности полученные результаты подвергали адекватным методам статистической обработки. Результаты и выводы научно-квалификационной работы были доложены на конференциях, проводимых ISSCR SFTCG (Лозанна, 2018 г.) и ASCB EMBO (Сан Диего, 2018 г.), на IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2019 г.), на Всероссийских научно-практических конференциях «Здоровье человека в XXI веке» (Казань, 2019-2022 гг.). Основные положения диссертационной работы обсуждены и одобрены на заседании научно-проблемной комиссии «Фундаментальные медицинские и биологические науки» ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России (Казань, 6 октября 2023 г.).

**Личный вклад автора.** Диссертант активно участвовал во всех этапах научного исследования, включая планирование, постановку цели и задач, поиск и анализ литературных данных, проведение экспериментальной части работы, разработку методов моделирования и способов лечения флегмоны, забор биоматериала, а также использование микробиологических, гистологических и



инструментальных методов исследования. Кроме того, диссертантом самостоятельно проведена статистическая обработка и интерпретация полученных результатов. Положения и выводы, представленные в диссертации, основаны на собственных научных результатах исследования автора. Диссертант лично подготовил к печати тезисы и статьи по теме диссертации, текст работы написан диссертантом самостоятельно.

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия инновациям совместно с Инвестиционно-венчурным фондом Республики Татарстан в рамках программы «50 лучших инновационных идей для Республики Татарстан».

**Структура и объём диссертации.** Диссертация написана в традиционном стиле, включает разделы: «Введение», «Глава 1. Обзор литературы», «Глава 2. Материалы и методы исследования», «Глава 3. Результаты исследований», «Глава 4. Обсуждение результатов», «Перспективы дальнейшей разработки темы», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений», «Список литературы» и «Список иллюстративного материала». Диссертация изложена на 108 страницах машинописного текста, включает в себя 6 таблиц и 11 рисунков. Список литературы содержит 238 источников, в том числе 162 отечественных и 76 – зарубежных.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Моделирование флегмоны.** Эксперименты выполнены на взрослых самцах крыс линии Wistar (Пушино, Россия) массой 180-220 г. В качестве инфицирующего субстрата, вызывающего флегмону, использовали перитонеальный гнойный экссудат, который получали от другой крысы после моделирования у нее перитонита. Крысам из всех экспериментальных групп с помощью инсулинового шприца под надкостницу правой нижней челюсти с вестибулярной поверхности в области моляров вводили инфицирующий субстрат в дозе 0,2 мл, содержащий разные патогенные микроорганизмы (*E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*). Через 3-4 суток после введения гнойного экссудата у всех подопытных животных в поднижнечелюстной области формировалась флегмона.

**Получение генных и генно-клеточных препаратов.** Для терапии флегмоны непосредственно перед введением получали генный препарат,

содержащий  $1,0 \times 10^8$  аденовирусных частиц, несущих кДНК гена *LTF* человека (Ad5-LTF), в 100 мкл стерильного физиологического раствора. Для контрольного эксперимента, также готовили генный препарат, содержащий  $1,0 \times 10^8$  Ad5-GFP в 100 мкл физиологического раствора. Генно-клеточные препараты создавали на основе мононуклеарных клеток крови пуповины (МККП) человека и генных препаратов (Ad5-GFP и Ad5-LTF). Образцы пуповинной крови человека процессировали согласно протоколу Банка стволовых клеток ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России. Мононуклеарные клетки крови пуповины выделяли из образцов пуповинной крови в градиенте фиколла. Для генетической модификации полученные МККП высевали на 6 см культуральный планшет из расчета 2 млн клеток на лунку. МККП трансдуцировали с помощью Ad5-LTF или Ad5-GFP с общим показателем MOI (multiplicity of infection — множественность инфицирования) равным 10. Далее генетически модифицированные МККП концентрировали в физиологическом растворе из расчета  $0,2 \times 10^6$  клеток в 100 мкл раствора.

**Оценка эффективности трансдукции МККП.** Экспрессию трансгенов (*LTF* и *gfp*) в МККП, трансдуцированных Ad5-LTF и Ad5-GFP, оценивали с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) через 72 ч после инкубации МККП+Ad5-LTF и МККП+Ad5-GFP в культуральных планшетах. Продукцию зеленого флуоресцентного белка в МККП+Ad5-GFP исследовали с помощью флуоресцентной микроскопии.

**Экспериментальные группы животных.** Согласно дизайну исследования (рисунок 1) и вводимого в здоровые ткани вокруг флегмоны генного или генно-клеточного препаратов экспериментальные животные после моделирования флегмоны были разделены на 5 групп. Для группы животных с прямой генной терапией (доставка гена *LTF* с помощью Ad5-LTF, n=8) контролем являлась группа Ad5-GFP (n=5). Подопытным животным, которым вводили генно-клеточный препарат МККП+Ad5-LTF (доставка гена *LTF* с помощью МККП, n=5), в качестве контроля была выбрана группа, в которой животные получали инъекцию МККП+Ad5-GFP (n=8). Группой сравнения для всех названных групп служили животные, получившие только антибактериальную терапию (n=5).

**Антибактериальная терапия флегмоны.** В группе животных с антибактериальной терапией (АБТ) после вскрытия флегмоны и последующей санации раны внутримышечно вводили антибиотик цефтриаксон (1000 мг/кг), к которому были чувствительны выявленные микроорганизмы в перитонеальном экссудате. АБТ продолжали в последующие дни эксперимента ежедневно.

**Доставка гена лактоферрина с помощью аденовирусного вектора.** Крысам из группы с прямой генной терапией (Ad5-LTF) на фоне АБТ по периметру раневой поверхности в 5 точках производили обкалывание генным препаратом (Ad5-LTF), содержащим  $1 \times 10^8$  аденовирусных частиц, несущих ген *LTF* человека, в 100 мкл физиологического раствора. В группе сравнения крысам в 5 точках по периметру раневой поверхности производили обкалывание генным препаратом (Ad5-GFP). Общая доза Ad5-LTF или Ad5-GFP для одного животного равнялась  $5,0 \times 10^8$  вирусных частиц.

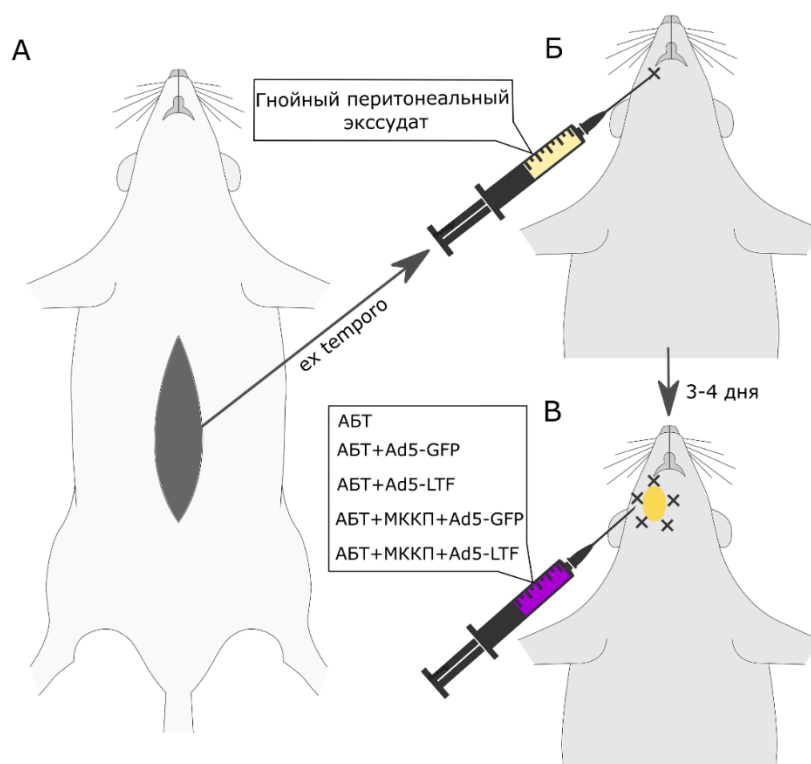


Рисунок 1 – Дизайн эксперимента.

А-Б – Флегмону поднижнечелюстной области у экспериментальных животных моделировали путем введения перитонеального гнойного экссудата под надкостницу правой нижней челюсти с вестибулярной поверхности в области моляров. В – Через 3-4 суток флегмону обкалывали генным или генно-клеточным препаратом. Ad5-GFP – аденовирусный вектор, несущий ген репортерного зеленого флуоресцирующего белка *gfp*; Ad5-LTF – аденовирусный вектор, несущий ген лактоферрина (LTF) человека; МККП+Ad5-GFP – моноклеарные клетки крови пуповины человека, трансдуцированные аденовирусным вектором Ad5-GFP; МККП+Ad5-LTF –

моноклеарные клетки крови пуповины человека, трансдуцированные аденовирусным вектором Ad5-LTF. Контрольные животные получали только АБТ (цефтриаксон).

**Клеточно-опосредованная доставка гена лактоферрина.** Животным на фоне АБТ в 5 точках по периметру раневой поверхности проводили обкалывание генно-клеточным препаратом (МККП+Ad5-LTF), содержащим  $0,2 \times 10^6$  МККП, экспрессирующих рекомбинантный ген *LTF* человека, в 100 мкл физиологического раствора. В группе сравнения крысам в 5 точках по периметру раны вводили  $0,2 \times 10^6$  генетически модифицированные МККП, экспрессирующих *gfp*, в 100 мкл физиологического раствора. Общая доза МККП+Ad5-LTF или МККП+Ad5-GFP для одного животного равнялась  $1,0 \times 10^6$  генетически модифицированных МККП.

**Объективное обследование экспериментальных животных.** После введения перитонеального гнойного экссудата у всех экспериментальных животных оценивали развитие локальных признаков воспалительного процесса в поднижнечелюстной области, включая возникновение и нарастание отека на стороне инъекции гнойного экссудата, болевую реакцию при пальпации, изменения поведенческих реакций (характер питания, частота дыхания, двигательная активность). Выявление признаков системного воспаления (полный отказ от пищи и воды, поверхностное и частое дыхание, отсутствие двигательной активности), являлось критерием эвтаназии подопытных животных.

**Общий анализ крови** проводили с помощью гематологического анализатора Sysmex XP-300 (Sysmex, Кобе, Япония). Образцы периферической крови подопытных животных забирали из правого предсердия на терминальной стадии эксперимента.

**Качественный и количественный анализ микробной флоры** в перитонеальном гнойном экссудате, использованном для моделирования флегмоны, был выполнен в качестве отдельной задачи на пяти половозрелых крысах-самцах. Идентификацию микроорганизмов проводили в соответствии с общепринятыми методами. Чувствительность выделенных штаммов бактерий к антибиотикам исследовали методом диффузии в агар с использованием агара Мюллера–Хинтона.

**Гистологическое исследование шейных лимфатических узлов.** Группу шейных лимфатических узлов каждого подопытного животного фиксировали в параформальдегиде, заливали в парафин и готовили тотальные срезы толщиной 7 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. Структурные компоненты лимфатических узлов оценивали с помощью морфометрической сетки случайного шага и программного обеспечения ImageJ (NIH).

**Иммунофлуоресцентный анализ.** Экспрессию *gfp* в шейных лимфатических узлах крыс из группы Ad5-GFP и группы МККП+Ad5-GFP оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии. Для идентификации МККП человека в лимфатических узлах крыс из групп МККП+Ad5-GFP и МККП+Ad5-LTF проводили иммунофлуоресцентное окрашивание с использованием антител (АТ) против ядерного антигена человека (HNA). Микропрепараты исследовали с помощью люминесцентного микроскопа (Carl Zeiss Axioscope A1). МККП (HNA-позитивные клетки) подсчитывали в группах МККП+Ad5-GFP и МККП+Ad5-LTF на 10 срезах шейного лимфатического узла от каждой крысы. Подсчет клеток проводили на цифровых изображениях в квадрате 300×240 мкм. Среднее количество клеток для каждого животного было стандартизировано до площади 1 мм<sup>2</sup>.

**Статистический анализ.** Анализ и визуализация данных были выполнены с использованием среды R (версия 3.6.3) для статистических вычислений (R Foundation for Statistical Computing, Вена, Австрия). Описательная статистика для количественных переменных представлена в виде средних ± стандартных ошибок и медиан (интерквартильные ряды). Для сравнения групп использовали тест Краскела – Уоллиса и *t*-критерий Уэлча. Относительную экспрессию генов анализировали с учетом значений, полученных для референсного гена β-актина, применяли метод ΔΔCt. Различия в относительной экспрессии генов-мишеней выявляли с использованием линейных моделей со смешанными эффектами, реализованные в пакете lme4, в качестве случайных эффектов выступали технические повторности. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Эффективность трансдукции МККП с помощью Ad5-GFP и Ad5-LTF.** С помощью флуоресцентной микроскопии в цитоплазме МККП,

трансдуцированных Ad5-GFP, было обнаружено специфическое зеленое свечение. Методом ПЦР-РВ в МККП+Ad5-GFP и МККП+Ad5-LTF установлено достоверное повышение уровня мРНК гена *LTF* и репортерного гена *gfp* в  $125,4 \pm 6,7$  и  $176,8 \pm 5,4$  раза, соответственно, по сравнению с нативными (нетрансдуцированными) МККП ( $p < 0,05$ ).

**Эффективность терапии флегмоны у крыс с помощью генного и генно-клеточного препаратов.** У животных из группы АБТ и Ad5-GFP на фоне базового лечения зрелой флегмоны, включавшего хирургический разрез с последующей санацией раны и антибактериальной терапией, воспаление продолжало нарастать, а у крыс появлялись симптомы выраженной интоксикации (полный отказ от пищи и воды, поверхностное и частое дыхание, отсутствие двигательной активности). В результате неэффективности антибиотикотерапии контрольных животных подвергали эвтаназии на 3-4 сутки от начала лечения в соответствии с этическими правилами работы и гуманному отношению к животным. Среднее время заживления раны в группе МККП+Ad5-GFP составило 6,5 суток, в группе Ad5-LTF – 6,5 суток, а в группе МККП+Ad5-LTF – 5,4 суток (рисунок 2).

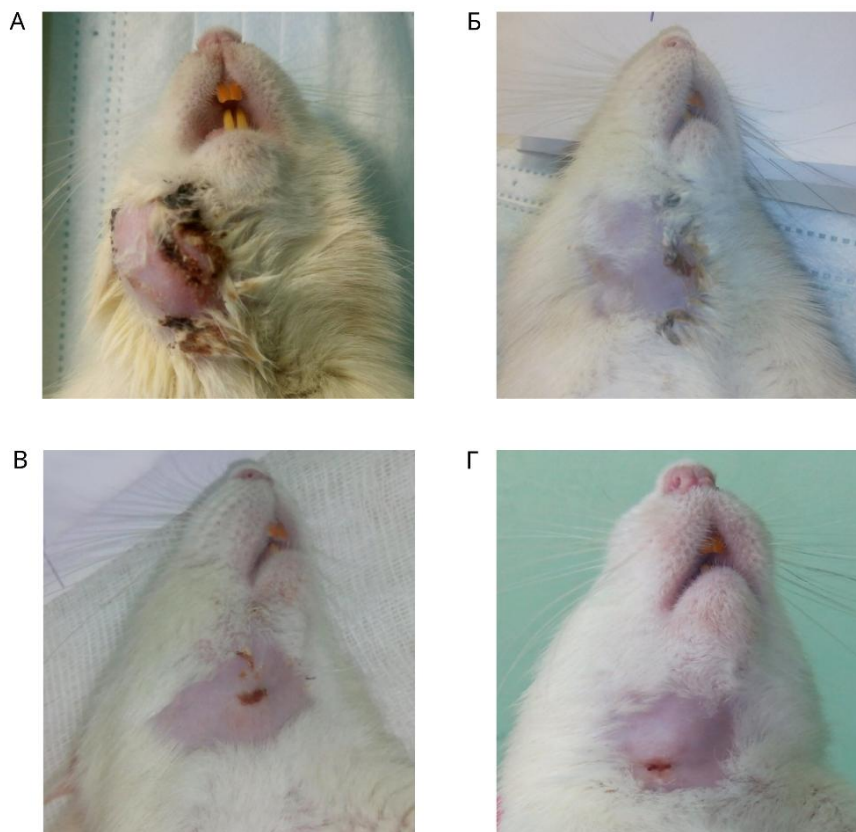


Рисунок 2 – Регрессия флегмоны.

А – Крыса из контрольной группы (Ad5-GFP) на четвертый день лечения. Б – Крысы через 7 дней после инъекции МККП+Ad5-GFP. В и Г – Крысы из групп Ad5-LTF и МККП+Ad5-LTF на шестой день лечения.

**Анализ количества лейкоцитов** подтвердил положительный клинический исход у крыс после введения генного или генно-клеточного препаратов. У крыс из группы Ad5-GFP анализ крови выявил лейкоцитоз [ $15,6 \times 10^9/\text{л}$ , IQR (интерквартильный диапазон): 14,1-19,3] за счет выраженного моноцитоза и гранулоцитоза на фоне лимфоцитопении. Количество лейкоцитов в группе Ad5-LTF составило  $4,9 \times 10^9/\text{л}$  (IQR: 4,0-8,4), в группе МККП+Ad5-GFP –  $7,2 \times 10^9/\text{л}$  (IQR: 6,3-9,5) и в группе МККП+Ad5-LTF –  $7,0 \times 10^9/\text{л}$  (IQR: 6,0-8,7) и было ниже ( $p = 0,01$ ) по сравнению с контрольной (Ad5-GFP) группой.

**Гистологическое исследование.** У крыс из группы Ad5-GFP в лимфатических узлах обнаружены явления гнойного лимфаденита. Преимущественно ткань лимфатических узлов была занята некротической массой с лейкоцитарной инфильтрацией ( $75,34\% \pm 3,49\%$ ). В терапевтических группах были зафиксированы лучшая сохранность и активность лимфоидной ткани. Площадь некротической массы в группе МККП + Ad5-GFP составила  $65,23\% \pm 0,63\%$  и в группе Ad5-LTF –  $63,82\% \pm 1,86\%$ . В сохранной лимфоидной ткани присутствовали лимфоидные фолликулы, паракортикальная зона и синусы. Морфологические изменения в группе МККП + Ad5-LTF выявили значительно меньшую площадь некротической массы ( $52,97\% \pm 1,58\%$ ) и лучшую сохранность структурированной ткани лимфатического узла, с характерными фолликулярной и паракортикальной гиперплазией и синусовым гистиоцитозом (рисунок 3).

**Методом иммунофлуоресцентного окрашивания** с помощью АТ к HNA в шейных лимфатических узлах крыс через 7 суток после инъекции МККП+Ad5-GFP или МККП+Ad5-LTF были обнаружены HNA-позитивные клетки. Количество HNA-позитивных МККП в группах МККП+Ad5-GFP ( $28,1 \pm 2,9$  клетки/ $\text{мм}^2$ ) и МККП+Ad5-LTF ( $34,9 \pm 7,1$  клетки/ $\text{мм}^2$ ) не отличалось ( $p = 0,42$ ). В группе МККП+Ad5-GFP HNA-позитивные клетки имели специфическое зеленое свечение. Флуоресцентная микроскопия лимфатических узлов крыс из группы Ad5-GFP выявила GFP-позитивные клетки в лимфатических фолликулах и синусах.

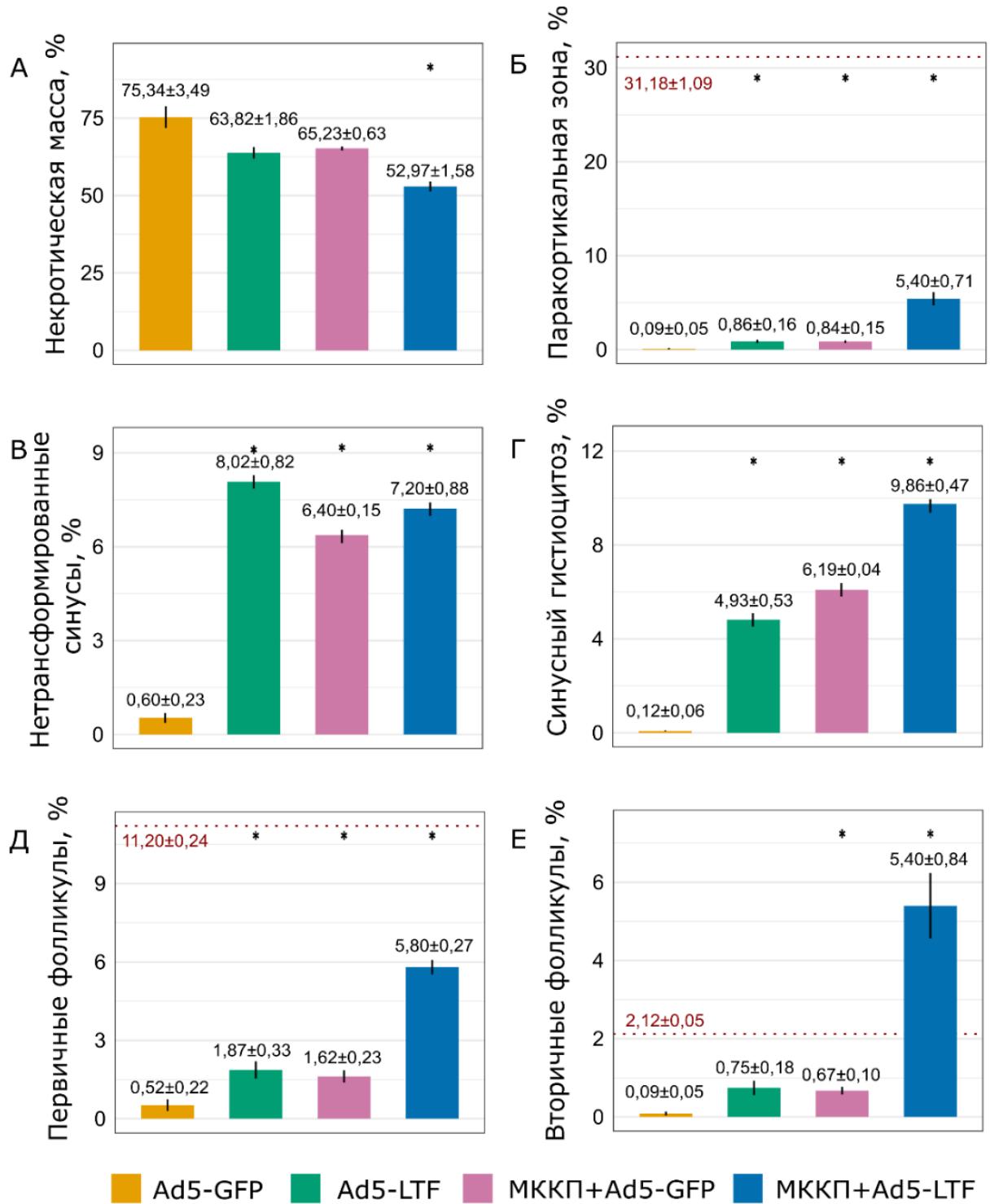


Рисунок 3 – Результаты морфометрического анализа шейных лимфатических узлов подопытных крыс.

А – площади разрушения (некротическая масса), состояние паракортикальной зоны (Б) и синусов (В), гистиоцитоз (Г), присутствие первичных (Д) и вторичных (Е) фолликулов в лимфатических узлах у крыс контрольной (Ad5-GFP) и опытных (Ad5-LTF, МККП+Ad5-GFP и МККП+Ad5-LTF) групп.

Примечания: Пунктирные линии соответствуют показателям у интактных крыс.

\* –  $p < 0,05$  в сравнении с группой Ad5-GFP.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эффективность генной терапии была изучена у крыс с флегмоной в поднижнечелюстной области. Локальную доставку гена *LTF* в область флегмоны осуществляли непосредственно введением аденовирусного вектора, несущего кДНК гена лактоферрина (Ad5-LTF), или с помощью МККП человека, трансдуцированных Ad5-LTF (МККП+Ad5-LTF). Анализ полученных результатов продемонстрировал объективное (заживление раны), лабораторное (общий анализ крови) и морфологическое (сохранность лимфатических узлов) улучшение у экспериментальных крыс в следующем порядке: МККП+Ad5-LTF>Ad5-LTF>МККП+Ad5-GFP.

В контрольной группе (Ad5-GFP) крысы, получавшие антибиотик цефтриаксон, не выздоравливали и были подвергнуты эвтаназии на 3-4 сутки после санации флегмоны. Данный факт свидетельствует, что оценка чувствительности микрофлоры перитонеального гнойного экссудата к цефтриаксону *in vitro* не подтвердила его эффективность *in vivo*. Возможно, что не все установленные бактерии в гнойном экссудате и присоединившаяся патогенная микрофлора во время созревания флегмоны также могут быть причинами отсутствия эффективности терапии с помощью цефтриаксона.

Между тем, GFP-позитивные клетки, выявленные в шейных лимфатических узлах после инъекции Ad5-GFP, свидетельствуют о характере диффузии аденовирусного вектора, его способности трансдуцировать лимфоциты, которые эффективно продуцируют рекомбинантный белок GFP. Эти данные позволяют предположить, что положительный эффект (регрессия флегмоны на 6,6 сутки, сохранность ткани лимфатических узлов и нормальное количество лейкоцитов в крови) при введении животным аденовирусного вектора, несущего ген *LTF*, может быть обусловлено трансдукцией лимфоцитов Ad5-LTF и их локальной продукцией ЛФ. В свою очередь рекомбинантный ЛФ по паракринному механизму модулирует активность иммунокомпетентных клеток лимфатического узла.

Наилучший терапевтический результат был продемонстрирован у крыс, получавших инъекцию МККП+Ad5-LTF, выздоровление которых характеризовалось заживлением ран на 5,6-е сутки путем вторичного натяжения, нормальным содержанием в крови лейкоцитов и положительным

ремоделированием лимфатических узлов. Клеточная терапия с помощью МККП (введение МККП+Ad5-GFP) показала менее выраженный эффект на исход флегмоны, чем у животных из группы МККП+Ad5-LTF. Между тем, время заживления раны (6,5 суток) и характер изменений в лимфатических узлах указывают на положительное влияние МККП. Возможно, МККП, мигрирующие после подкожной инъекции в лимфатический узел, секретируя биологически активные молекулы (цитокины, интерлейкины, антиоксидантные, ангиогенные и ростовые факторы) модулируют иммунокомпетентные клетки крысы. Следовательно, МККП+Ad5-LTF оказывают синергетическое эффект (непосредственное влияние МККП и паракринное действие рекомбинантного ЛФ) на ремоделирование лимфоидной ткани шейных лимфатических узлов и регрессию флегмоны (рисунок 4).

### **Перспективы дальнейшей разработки темы**

В исследовании получены доказательства, что МККП-опосредованная доставка гена LTF для генной терапии флегмоны поднижнечелюстной области у крысы была наиболее эффективной. Однако следует отметить серьезные ограничения применения МККП в качестве клеточных носителей терапевтических генов. При аллогенной инфузии МККП сохраняются риски побочных эффектов, а небольшое количество МККП от одного донора для однократной инфузии и невозможность повторных инфузий МККП от того же донора накладывает серьезные ограничения на широкое применение МККП для клеточной терапии. Поэтому, дальнейшая разработка стратегии использования лейкоцитов для адресной доставки трансгенов может быть направлена на замену МККП на аутологичные лейкоциты, полученные из периферической крови пациента, для продукции рекомбинантного ЛФ. Обогащенный геном LTF аутологичный лейкоконцентрат может быть эффективным противомикробным препаратом для персонифицированной генной терапии. Обогащение аутологичного лейкоконцентрата одновременно генами, кодирующими лактоферрин, кателицидины и дефензины, может увеличить его эффективность при лечении пациентов с инфекционными заболеваниями. В рамках проведенного исследования впервые сформулированы и обоснованы

перспективы дальнейшей разработки способа терапии ОГВЗ ЧЛО с помощью рекомбинантного гена *LTF*.

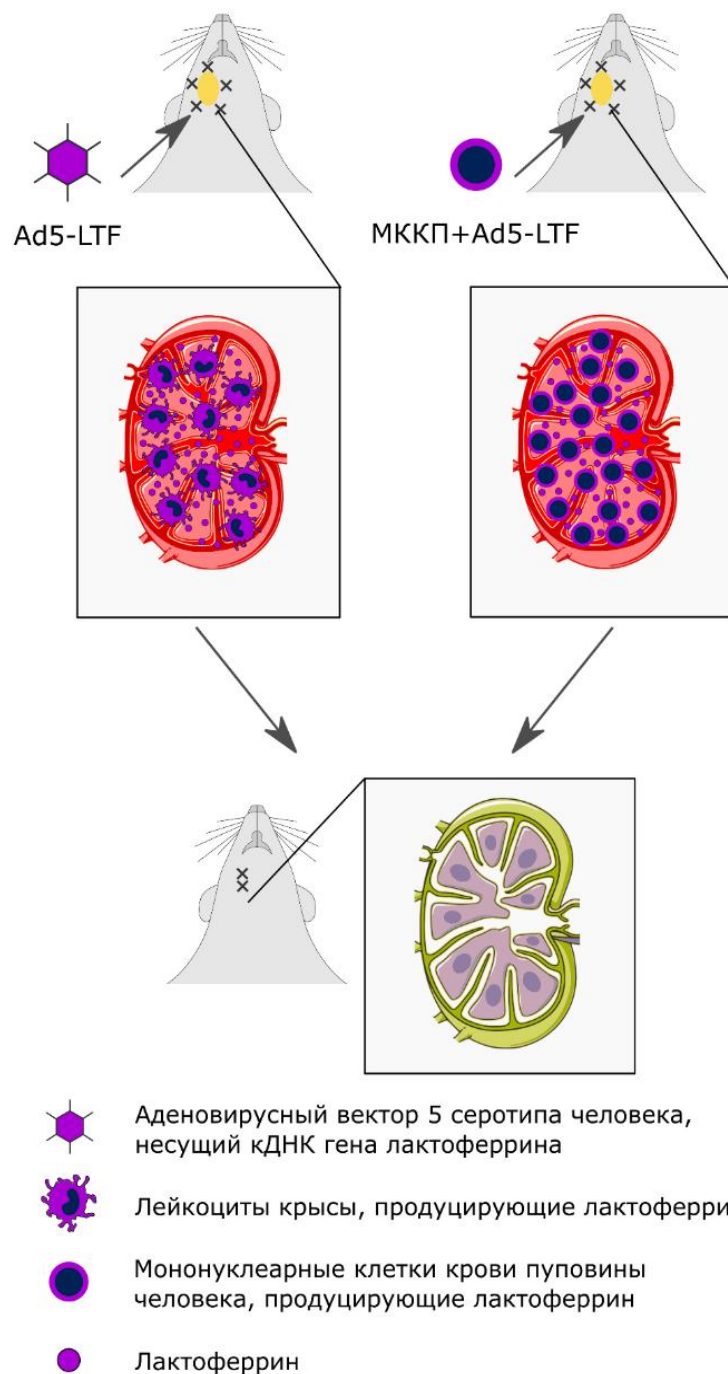


Рисунок 4 – Патогенетическое обоснование эффективности использования рекомбинантного гена лактоферрина для лечения флегмоны в эксперименте

Впервые на основе МККП человека и аденовирусного вектора 5-го серотипа человека (Ad5-LTF) получен инновационный генно-клеточный препарат с антимикробным действием. Результаты исследования установили эффективность и механизм действия Ad5-LTF или генетически модифицированных МККП человека, продуцирующих рекомбинантный ЛФ,

при их использовании для терапии флегмоны поднижнечелюстной области у крыс. Полученные данные открывают обнадеживающие перспективы разработки методов генной терапии ОГВЗ в практике ЧЛХ.

Таким образом, предложенная методика экспериментального моделирования острого гнойного воспаления поднижнечелюстной области у крысы, с последующим эффективным применением рекомбинантного гена *LTF* для прямой и клеточно-опосредованной генной терапии, является ценным дополнением в поиске инновационных способов лечения ОГВЗ ЧЛЮ, что расширяет возможности оптимизации терапии данной патологии в практической медицине.

### ВЫВОДЫ

1. Предлагаемая новая экспериментальная модель флегмоны поднижнечелюстной области – введение 0,2 мл перитонеального гнойного экссудата, содержащего *Escherichia coli* ( $3 \times 10^8$  КОЕ/мл), *Proteus mirabilis* ( $2 \times 10^8$  КОЕ/мл), *Enterobacter aerogenes* ( $2 \times 10^8$  КОЕ/мл) и *Staphylococcus aureus* ( $2 \times 10^3$  КОЕ/мл), под надкостницу нижней челюсти с вестибулярной поверхности полости рта крысы – адекватна и эффективна (острый гнойный воспалительный процесс развивается на 3 сутки эксперимента).

2. Гнойный воспалительный процесс в поднижнечелюстной области крысы после введения гнойного перитонеального экссудата под надкостницу нижней челюсти с вестибулярной поверхности ротовой полости сопровождался гнойным лимфаденитом шейных лимфатических узлов и характеризовался системными признаками ответа острой фазы (лейкоцитоз), а также симптомами выраженной интоксикации (полным отказом от пищи и воды, поверхностным и частым дыханием, отсутствием двигательной активности и др.).

3. В качестве патогенетической терапии острого гнойного воспалительного процесса в поднижнечелюстной области крысы разработаны: генный препарат, содержащий  $1,0 \times 10^8$  аденовирусных частиц, содержащих кДНК гена лактоферрина человека (Ad5-LTF) и генно-клеточный препарат, содержащий  $0,2 \times 10^6$  генетически модифицированных моноклеарных клеток крови пуповины человека, экспрессирующих рекомбинантный ген лактоферрина человека (МККП+Ad5-LTF).

4. Установлены увеличение уровня мРНК гена лактоферрина в МККП, трансдуцированных Ad5-LTF, по сравнению с нативными МККП, и способность генетически модифицированных МККП мигрировать в регионарные лимфатические узлы, после инъекции в здоровые ткани вокруг флегмоны.

5. Положительный эффект однократного введения кДНК гена лактоферрина с помощью аденовирусного вектора (Ad5-LTF) или моноклеарных клеток крови пуповины человека (МККП+Ad5-LTF) в здоровую ткань вокруг острого гнойного воспалительного процесса подтверждается регрессией флегмоны, сохранностью и позитивным ремоделированием шейных лимфатических узлов и нормализацией содержания лейкоцитов в периферической крови, что свидетельствует о патогенетическом действии рекомбинантного лактоферрина.

#### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Adenoviral-mediated lactoferrin gene therapy for abscesses of the maxillofacial area in rat model / **Е. Agatieva**, I. Gazizov, S. Ksembaev [et al.] // Changing the Face of Modern Medicine: Stem Cell and Gene Therapy. Abstracts European Society of Gene & Cell Therapy, International Society for Stem Cell Research, French Society of Gene and Cell Therapy. - Mary Ann Liebert Inc., 2018. - P. 157.

2. Umbilical cord blood mononuclear cells for treatment of the maxillofacial area abscesses in rat / **Е. Agatieva**, I. Gazizov, S.S. Ksembaev [et al.] // Molecular Biology of the Cell. - 2018. - № 29(26). - P. 1321.

3. Генная терапия при флегмонах челюстно-лицевой области / **Э.А. Агatieва**, И.М. Газизов, Д.Э. Цыплаков [и др.] // Здоровье человека в XXI веке: сборник научных статей. - Казань, 2018. - С. 22-25.

4. Способ лечения флегмон челюстно-лицевой области с помощью моноклеарных клеток крови пуповины / **Э.А. Агatieва**, С.С. Ксембаев, И.М. Газизов [и др.] // Здоровье человека в XXI веке: сборник научных статей. - Казань, 2019. - С. 22 -26.

5. Способ моделирования флегмоны околочелюстной области у крысы / Р.Р. Исламов, **Э.А. Агatieва**, И.М. Газизов [и др.] // Гены и Клетки. - 2019. - Т.14, №3 - С. 102.

6. Современные принципы и методы местного лечения при острых гнойно-воспалительных заболеваниях челюстно-лицевой области / Э.А. Агатиева, С.С. Ксембаев, Р.Р. Исламов, Р.А. Галимов // Уральский медицинский журнал. - 2020. - № 9 (192). - С. 9-20.

7. **Evaluation of direct and cell-mediated lactoferrin gene therapy for the maxillofacial area abscesses in rats / E. Agatieva, S. Ksembav, M. Sokolov [et al] // *Pharmaceutics*. - 2021. - № 1. - P. 1-15.**

8. Оценка эффективности прямой генной и клеточно-опосредованной терапии лактоферрином гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области у крыс / Э.А. Агатиева, Р.И. Хисмиев, Р.Р. Исламов [и др.] // Здоровье человека в XXI веке. Качество жизни: сборник научных статей. - Казань, 2022. - С. 8-11.

9. **Перспективы использования генно-клеточной терапии при гнойно-воспалительных заболеваниях челюстно-лицевой области / Э.А. Агатиева, С.С. Ксембаев, Р.И. Хисмиев // Вятский медицинский вестник. - 2022. – Т. 75, № 3. - С. 69-72.**

10. **Патент № 2694488 С1. Способ моделирования флегмоны окологлазничной области : № 2018135344 : заявл. 05.10.2018 : опубл. 15.07.2019 / Исламов Р.Р., Агатиева Э.А., Ксембаев С.С., Поздеев О.К., Морозова Л.Г., Соколов М.Е., Маркосян В.А., Фадеев Ф.О., Баширов Ф.В., Фаизов Т.Т., Цыплаков Д.Э.; заявитель и патентообладатель: Казанский государственный медицинский университет.**

11. **Патент № 2746031 С1. Способ лечения флегмоны челюстно-лицевой области : № 2020117724 : заявл. 19.05.2020 : опубл. 06.04.2021 / Исламов Р.Р., Агатиева Э.А., Ксембаев С.С., Маркосян В.А., Баширов Ф.В., Цыплаков Д.Э., Газизов И.М., Андреева Т.М., Шмаров М.М., Логунов Д.Ю., Тутыхина И.Л., Народицкий Б.С.; заявитель и патентообладатель: Казанский государственный медицинский университет.**

#### Список сокращений

АБТ – антибактериальная терапия

АТ – антитела

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

ЛФ – лактоферрин

МККП – мононуклеарные клетки крови пуповины

МККП+Ad5-LTF – генетически модифицированные мононуклеарные клетки крови пуповины человека, несущие кДНК гена лактоферрина

НИЦЕМ – Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии

ОГВЗ – острые гнойно-воспалительные заболевания

ПК – пуповинная кровь

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

ЧЛО – челюстно-лицевая область

ЧЛХ – челюстно-лицевая хирургия

Ad5 – аденовирус 5-го серотипа

Ad5-LTF – рекомбинантный репликативно-дефектный аденовирус человека 5-го серотипа, содержащего кДНК гена лактоферрина

gfp – ген зеленого флуоресцирующего белка

HNA – ядерный антиген человека

LTF – ген лактоферрина

TNF $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа