

На правах рукописи

Маркосян Ваге Аршалуйсович

**КОРРЕКЦИЯ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ РАЗВИТИЯ
ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА У КРЫСЫ С ПОМОЩЬЮ ПРЕВЕНТИВНОЙ
ДОСТАВКИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ VEGF, GDNF, NCAM**

3.3.3. – Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Казань – 2023

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

Маслюков Петр Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии с биофизикой ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России, г. Ярославль

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» Федерального медико-биологического агентства

Защита состоится «28» сентября 2023 г. в 10:00 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://www.kazangmu.ru>).

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

д-р мед. наук, доцент

О. Р. Радченко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В Российской Федерации каждый год фиксируется более 450 000 случаев инсульта головного мозга (Скворцова В.И., 2013). Несмотря на повышение эффективности современных методов терапии, смертность по причине инсульта составляет 125 человек на 100 тысяч населения, а у 70-80% выживших пациентов сохраняются стойкие неврологические нарушения, что ведет к росту инвалидизации и является значимым социально-экономическим бременем не только для пациента и членов его семьи, но и для государства (Скворцова В.И., 2013). В центральной нервной системе существуют значительные ограничения регенерации, поэтому проблема сдерживания негативных последствий ишемического инсульта и стимулирования постишемической нейрорегенерации остается актуальной со времен античной медицины и до настоящего времени. Продолжающийся активный поиск новых эффективных методов лечения инсульта позволил сформировать новое направление, основанное на генных и клеточных технологиях, которые открывают широкие перспективы в лечении инсульта.

В случае острого нарушения мозгового кровообращения запускаются сложные патофизиологические процессы, которые могут развиваться как в первые часы после сосудистой катастрофы, так и в последующие дни и недели (Скворцова В.И., 2013). Высокий риск гибели нейронов связан с некрозом и апоптозом, которые возникают на фоне острой ишемии, эксайтотоксичности, воспалительных процессов, клеточного стресса и дисфункции митохондрий (Базеко Н.П., 2004). Область сформировавшегося ишемического инфаркта с необратимыми изменениями окружает так называемая «ишемическая полутень», или «пенумбра», в которой существенно снижено кровоснабжение (Домашенко М.А., 2008). Однако нервные клетки в ишемической полутени сохраняют жизнеспособность в течение 3-6 часового периода, известного как «терапевтическое окно», во время которого возможно предупредить массовую гибель нейронов. Специфическая терапия острого инсульта в этот временной интервал ориентирована на восстановление кровообращения, поддержание обмена веществ и повышение жизнеспособности клеток мозга. Таким образом, в течение данного периода можно сдерживать

распространение инфаркта мозга на пограничные с первичным очагом некроза области ткани мозга.

Особый интерес представляет разработка методов превентивной генной терапии пациентов, подверженных риску ишемического инсульта, направленной на повышение физиологических адаптивных механизмов мозга (нейропластичности) при наступлении инсульта. Ранее было установлено положительное влияние интратекальной доставки генов, кодирующих сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF) и нейрональную молекулу клеточной адгезии (NCAM) на ремоделирование мозга крысы в перинфарктной области (Sokolov M., 2018). Следовательно, такая комбинация генов может быть использована для превентивной генной терапии при высоком риске возникновения ишемического инсульта головного мозга для сдерживания развития негативных последствий при наступлении инсульта.

Одним из препятствий внедрения в практическую медицину прямой (*in vivo*) генной терапии является цитопатическое и иммуногенное влияние генетической конструкции на организм реципиента, в качестве которой для доставки терапевтического гена, обычно используют рекомбинантные вирусы (аденовирус, аденоассоциированный вирус и др.) (H. Toda, 2001; J. Yu, 2009; L. Jin, 1999). Клеточно-опосредованная (*ex vivo*) генная терапия, в отличие от прямой генной терапии, является альтернативным способом введения рекомбинантных генов пациенту с помощью клеточных носителей (Скворцова В.И., 2013; Стулин И.Д., 2003). Однако в связи этим возникает вопрос об адекватном выборе клеток для доставки искусственного генетического материала. Одним из перспективных клеточных носителей терапевтических генов считаются моноклеарные клетки крови пуповины (МНКП) человека. Преимущество применения МНКП человека связано с их пригодностью не только для аутотрансплантации, но и для аллотрансплантации, а также отсутствием законодательных, этических и религиозных запретов, связанных с их использованием в регенеративной медицине (F. Zhang, 2010).

Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования является установление механизмов влияния превентивной доставки рекомбинантных генов, кодирующих сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF) и нейрональную молекулу клеточной адгезии (NCAM), на патофизиологические аспекты повреждения головного мозга крысы после моделирования инсульта.

В соответствии с целью были сформулированы следующие конкретные задачи исследования, решаемые на модели ишемического инсульта у крысы в условиях превентивной интратекальной прямой и клеточно-опосредованной доставки комбинации рекомбинантных репликативно-дефектных аденовирусов человека 5 серотипа, несущих по-отдельности гены *vegfl65*, *gdnf* и *ncaml*, через 21 сутки после окклюзии средней мозговой артерии:

1. Оценить механизмы повреждения головного мозга крысы после моделирования ишемического инсульта с помощью поведенческого теста, морфометрического и иммунофлуоресцентного исследования периинфарктной области.
2. Оценить влияние трансдукции моноклеарных клеток крови пуповины человека аденовирусным вектором Ad5-GFP, экспрессирующим репортерный зеленый флуоресцентный белок, и смесью аденовирусных векторов, несущих нейропротекторные факторы (Ad5-VEGF, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM) на способность генетически модифицированных клеток продуцировать цитокины, хемокины и факторы роста.
3. Изучить экспрессию рекомбинантных генов (*vegfl65*, *gdnf* и *ncaml*) в периинфарктной области головного мозга крысы после интратекальной доставки с помощью аденовирусных векторов или моноклеарных клеток крови пуповины человека.
4. Изучить механизмы нейропластичности при ишемическом повреждении головного мозга крысы в условиях превентивной интратекальной доставки рекомбинантных генов *vegfl65*, *gdnf* и *ncaml* с помощью аденовирусных векторов или моноклеарных клеток крови пуповины человека.

5. Оценить влияние интратекальной доставки рекомбинантных генов *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1* с помощью аденовирусных векторов или моноклеарных клеток крови пуповины человека на содержание цитокинов, хемокинов и факторов роста в образцах крови и ликвора подопытных животных после моделирования ишемического инсульта головного мозга.

Научная новизна. В данной работе были изучены механизмы, определяющие эффективность превентивной доставки рекомбинантных генов *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1* с помощью аденовирусных векторов (Ad5) или МНКП человека на патогенетические факторы развития ишемического повреждения головного мозга крысы. Морфофункциональное исследование последствий окклюзии средней мозговой артерии у крысы через 3 недели обнаружило стандартный очаг инфаркта в теменной доле, который не приводит к существенным сдвигам со стороны сенсорного и моторного ответов у экспериментальных животных. При этом в перинфарктной области были обнаружены патологические изменения, включающие в себя клеточный стресс, апоптоз, астроглиоз, уменьшение количества миелинообразующих клеток, снижение уровня экспрессии синаптических белков. Данные о содержании эндогенных цитокинов, хемокинов и факторов роста в крови и спинномозговой жидкости крысы указывают на прекращение воспалительной реакции через 3 недели после моделирования инсульта, что может быть следствием разрешения острой фазы ишемического повреждения мозга.

В условиях превентивной интратекальной доставки рекомбинантных генов *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1* с помощью Ad5 или МНКП человека установлены сохранность ткани мозга и положительное действие на постишемическое ремоделирование перинфарктной области, характеризующееся препятствием развития астроглиоза и поддержанием миелинизации, восстановлением продукции синаптических белков в нейронах.

Принципиально новыми являются данные об адресной миграции генетически модифицированных МНКП человека, трансплантированных до моделирования ишемического инсульта головного мозга. После интратекальной инфузии генетически модифицированные МНКП человека с током цереброспинальной

жидкости достигают головного мозга, где они мигрируют в перинфарктную область и локально продуцируют рекомбинантные молекулы VEGF GDNF и NCAM.

Приоритетными следует признать результаты генетической модификации МНКП человека комбинацией Ad5, несущих нейропротекторные факторы (Ad5-VEGF, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM), свидетельствующие об увеличении синтеза мРНК соответствующих транскриптов и отсутствии эффекта трансдукции на экспрессию данными клетками цитокинов, хемокинов и факторов роста. Кроме того, одновременная интратекальная инъекция комбинации из трех Ad, или генетически модифицированных МНКП не влияет на содержание цитокинов, хемокинов и факторов роста в крови и цереброспинальной жидкости экспериментальных животных, что свидетельствует об отсутствии иммунной реакции организма крысы на интратекальное введение Ad5 и генетически модифицированных МНКП человека.

Научно-практическая значимость работы. В исследовании получены новые фундаментальные сведения о патогенезе постишемических повреждений в перинфарктной области коры мозга крысы после моделирования ишемического инсульта. Правительство Российской Федерации в научно-техническом развитии поставило в приоритет: "переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарственных препаратов (прежде всего антибактериальных)" и в этой связи было проведено исследование, цель которого – выявление механизмов морфо-функционального восстановления мозга при наступлении ишемического инсульта на фоне превентивной доставки искусственного генетического материала в цереброспинальной жидкости крысы. В рамках данной работы были разработаны основы превентивной персонализированной генной терапии при угрозе ишемического инсульта. Следует отметить, что в настоящее время в практической медицине не существует препаратов, содержащих искусственный генетический материал, для терапии ишемического инсульта. Таким образом, данное исследование вносит важный вклад для создания принципиально новых методов персонализированной генной терапии

не только при угрозе ишемического инсульта, но и для лечения других повреждений центральной нервной системы, например, нейротравм и нейродегенеративных заболеваний.

Положения, выносимые на защиту:

1. Превентивная интратекальная доставка в цереброспинальную жидкость комбинации рекомбинантных генов, кодирующих сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF) и нейрональную молекулу клеточной адгезии (NCAM), в составе аденовирусных векторов или с помощью моноклеарных клеток крови пуповины человека сдерживает развитие негативных последствий ишемического инсульта, а именно препятствует развитию астроглиоза, поддерживает миелинизацию и содействует восстановлению продукции синаптических белков в нейронах периинфарктной области головного мозга крысы после моделирования ишемического инсульта.

2. Превентивная интратекальная доставка рекомбинантных генов *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1* с помощью аденовирусных векторов или моноклеарных клеток крови пуповины человека обеспечивает продукцию рекомбинантных молекул VEGF, GDNF и NCAM, оказывающих нейропротекторное действие в области ишемической полутени в первые часы наступления инсульта, а также в последующие три недели реабилитационного периода.

Степень достоверности и апробация работы. Согласно поставленной цели и задачам настоящего исследования был разработан оригинальный дизайн эксперимента и использованы современные методы (молекулярные, клеточные, иммунофлуоресцентные, морфометрические, гистологические), соответствующие мировому уровню. Статистический анализ полученных результатов подтверждает их достоверность. Результаты научно-квалификационной работы были доложены на конференциях, проводимых EJCI (Барселона, 2018 г.; Бари, 2020 г.); на национальных конгрессах по регенеративной медицине (IV – Москва, 2019 г.; V – Москва 2022 г.), конференции ASCB, EMBO 2019 (Вашингтон, 2019 г.); на V-X Международных молодежных научных медицинских форумах «Белые цветы» (Казань, 2018-2023 гг.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных библиографических базах Scopus, WoS и 2 патента.

Структура и объем диссертационной работы. Диссертационная работа представлена на 136 страницах печатного текста и включает в себя: введение, 4 главы (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение результатов), заключение, выводы, список литературы и список сокращений. Диссертация содержит 5 таблиц, 19 рисунков. Список литературы состоит из 191 источника.

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 готовил к печати тезисы и статьи по теме диссертации, текст работы написан автором самостоятельно.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Диссертационная работа выполнена в ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России. Рекомбинантные репликативно-дефектные Ad5-VEGF, Ad5-GDNF, Ad5-NCAM, Ad5-GFP были наработаны в НИЦЭиМ имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России (г. Москва). Исследование поддержано Российским научным фондом (№17-75-10053) и проводилось только в рамках научно-исследовательской работы «Генная терапия ишемического инсульта», утвержденной Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России (Протокол №6 от 20.06.2017 г).

Моделирование ишемического инсульта головного мозга. Эксперименты выполнены на крысах линии Wistar массой 200-250 г. Ишемический инсульт моделировали методом дистальной окклюзии средней мозговой артерии. На первом этапе операции в височной кости высверливали трепанационное отверстие. Далее под операционным микроскопом разрезали твердую мозговую оболочку и коагулировали среднюю мозговую артерию. На втором этапе операции для

снижения кровотока в виллизиевом круге справа через продольный разрез по срединной линии шеи препарировали общую сонную артерию, которую лигировали шелковой нитью.

Превентивную доставку генных и генно-клеточных препаратов осуществляли за 3 и 2 суток до моделирования инсульта, соответственно. Временные интервалы обусловлены сроками трансдукции Ad5 клеток мозга и началом экспрессии рекомбинантных генов в МНКП человека после трансплантации крысам. Препараты (2×10^7 вирусных частиц в 20 мкл 0,9% NaCl или 2×10^6 МНКП в 20 мкл 0,9% NaCl) вводили интратекально. Согласно вводимому в ликвор препарату животные были разделены на 5 групп. Для крыс, которым инъецировали Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM, контролем являлась группа, в которой крысам вводили Ad, несущий ген *gfp*. Животным, которым трансплантировали генно-клеточный препарат МНКП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM, в качестве контроля была выбрана группа, в которой крысам вводили МНКП+Ad5-GFP. Контрольной группой для всех экспериментальных животных служили крысы с инфузией раствора NaCl. Результаты исследования сравнивали с данными, полученными у интактных животных.

Морфометрический анализ объема инфаркта головного мозга. Для определения объема инфаркта фотографировали очаг ишемического инсульта и готовили 10 фронтальных срезов с интервалом в 200 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. На оцифрованных микропрепаратах глубину (h) и диаметр ($2 \times r$) инфаркта измеряли в программе ImageJ (NIH). Объем инфаркта вычисляли с помощью формулы:

$$V = 1/3 \times h_{\max} \times \pi \times r_{\max}^2 \quad (1)$$

где, $h_{\max}$ – максимальная глубина инфаркта и $r_{\max}$ – максимальный радиус инфаркта.

Иммунофлуоресцентный анализ молекулярных и клеточных изменений в области инфаркта головного мозга. Фронтальные срезы мозга через область инфаркта толщиной 20 мкм готовили на криостате и процессировали для иммунофлуоресцентного окрашивания. Астроциты маркировали антителами (АТ)

против глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), олигодендроциты – транскрипционного фактора олигодендроцитов 2 (Olig2). Клетки микроглии выявляли при помощи АТ к кальций-связывающему белку (Iba1). Белки теплового шока и проапоптозные белки определяли с помощью АТ против Hsp70 и Caspase3, соответственно. Экспрессию синаптических белков оценивали с помощью АТ к синаптофизину и белку постсинаптической плотности 95 кДа (PSD95 кДа). Первичные антитела визуализировали с помощью конъюгированных с флуорохромом вторичных АТ. Ядра клеток докрашивали раствором DAPI. Цифровые изображения структур мозга получали с помощью микроскопа LSM 510-Meta. Количество иммунопозитивных клеток (Caspase3⁺ и Olig2⁺) подсчитывали на объединенных изображениях, полученных с 10 последовательных оптических срезов, учитывая колокализацию иммунопозитивных структур и окрашенных DAPI клеточных ядер. Экспрессию маркеров астроцитов (GFAP) и микроглии (Iba1) представляли как иммунопозитивную площадь в процентах. Уровень экспрессии Hsp70, синаптофизина и PSD95 оценивали как среднюю интенсивность пикселей соответствующих маркеров в иммунопозитивных клетках на площади 0,05 мм².

Экспрессия рекомбинантных генов *in vivo*. Экспрессию гена *gfp* в головном мозге крысы изучали после интратекальной инъекции Ad5-GFP и МНКП+Ad5-GFP с помощью флуоресцентной микроскопии через 3 недели после моделирования инсульта. Экспрессию трансгенов, кодирующих VEGF, GDNF и NCAM, в мозге крысы после инфузии Ad5-VEGF+Ad-GDNF+Ad-NCAM оценивали с помощью специфических АТ на 21 сутки после операции. Продукцию целевых молекул в МНКП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM после их трансплантации исследовали методом двойного иммунофлуоресцентного окрашивания с помощью АТ против ядерного антигена человека (HNA) и АТ против VEGF, GDNF и NCAM. Верификация HNA⁺- клетки, продуцирующей одну из рекомбинантных молекул, была подтверждена путем анализа объединенных трехканальных изображений, включая ультрафиолетовый канал для DAPI.

Мультиплексное профилирование цитокинов, хемокинов и факторов роста выполнено на анализаторе Bio-Plex200 System (BioRad, США) с помощью

программного обеспечения Bio-Plex Manager 4.1 (Bio-Rad Laboratories). В супернатантах, полученных при культивировании в течение 72 часов нативных МНКП, МНКП+Ad5-GFP и МНКП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM, использовали набор Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (HCYTMAG-60K-PX41). Содержание цитокинов, хемокинов и факторов роста в крови и ликворе экспериментальных крыс через 3 недели после моделирования инсульта анализировали с помощью набора Bio-Plex Pro™ Rat Cytokine 23-Plex Assay.

Статистический анализ. Описательные статистики объема очага инфаркта и иммунофлуоресцентного исследования представлены в виде Медианы [1 квартиль; 3 квартиль]. Результаты полимеразной цепной реакции в реальном времени представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего. Статистическая обработка результатов мультиплексного анализа проводилась с использованием линейных моделей, реализованных в пакете limma. В качестве оценки размера эффекта использовалось Fold Change, полученное при попарном сравнении. Для выявления групповых различий медианных значений использовали тест Краскела-Уоллиса. В качестве апостериорного критерия для попарных сравнений был применен критерий Неменьи с аппроксимацией к распределению Тьюки. Анализ полученных данных проводили с использованием базовых пакетов языка R. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эффективность трансдукции МНКП с помощью Ad5-GFP была подтверждена через 72 часа после трансдукции данных клеток. С помощью флуоресцентной микроскопии в культуре генетически модифицированных МНКП человека были выявлены клетки со специфическим зеленым свечением. Методом проточной цитометрии установлено, что процент GFP⁺-МНКП человека при MOI равном 10 достигает 29,5%.

Анализ экспрессии *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1* в МНКП in vitro методом полимеразной цепной реакции в реальном времени установил, что уровень мРНК *vegfl65* увеличился в $141,8 \pm 8,24$ раз, мРНК *gdnf* – в $167,51 \pm 6,85$ раз и мРНК *ncam1* –

в $122,9 \pm 13,5$ раз при сравнении с контролем (нативных моноклеарных клеток крови пуповины человека). Уровень мРНК *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1* в МНКП+Ad5-GFP не отличался от значений в нативных МНКП человека.

Экспрессия *gfp*, *vegfl*, *gdnf* и *ncam* в головном мозге крысы была изучена в перинфарктной области головного мозга крысы на 21 сутки после интратекальной инъекции Ad5-GFP или Ad5-VEGF+Ad-GDNF+Ad-NCAM. GFP был обнаружен в клетках мозга с помощью флуоресцентной микроскопии. Использование специфических АТ к VEGF, GDNF и NCAM выявило целевые молекулы в клетках мозга подопытных животных. Продукция GFP и VEGF, GDNF, NCAM в перинфарктной области была также подтверждена в МНКП+Ad5-GFP и МНКП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM, соответственно, после их превентивной инъекции в ликвор.

Морфометрический анализ объема инфаркта головного мозга. На 21 сутки после моделирования инсульта макроскопическое исследование мозга экспериментальных животных обнаружило стандартную локализацию очага инфаркта в теменной доле, которая соответствует месту окклюзии средней мозговой артерии. Морфометрический анализ объема инфаркта показал различия между экспериментальными группами. Данный показатель был значительно меньше в группах Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM и МНКП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM по сравнению с контрольными группами NaCl и Ad5-GFP. При трансплантации МНКП+Ad5-GFP объем инфаркта не отличался от групп с превентивной доставкой рекомбинантных генов. Обнаруженный большой объем инфаркта мозга у крыс из контрольных групп свидетельствует о положительном действии превентивной доставки генных и генно-клеточных конструкций на сохранность нервной ткани при наступлении инсульта.

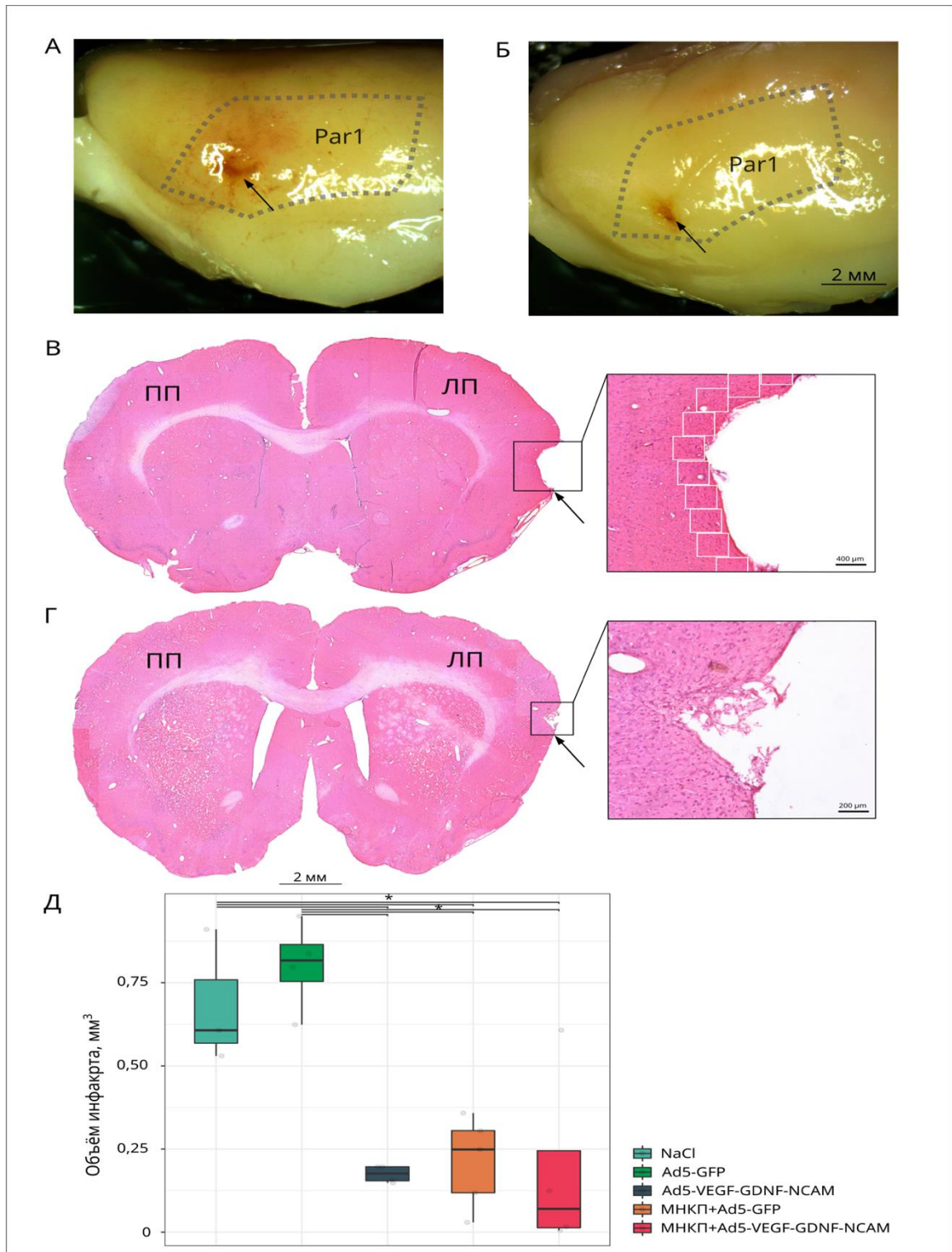


Рисунок 11 – Очаг ишемического инсульта у крыс через 3 недели после окклюзии средней мозговой артерии.

А – мозг крысы из контрольной (NaCl) группы. Б – мозг крысы из группы МНКП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM. В и Г – фронтальные срезы мозга, окрашенные гематоксилином и эозином, животных из контрольной (NaCl) группы (В) и животных из группы МНКП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM (Г).

Д – анализ объема инфаркта мозга в экспериментальных группах; * – $p < 0,05$.

Примечание — На рисунках А и Б область инфаркта мозга указана черной стрелкой, где Par1 – область мозга в теменной доле – обозначена пунктирной линией. ПП – правое полушарие; ЛП – левое полушарие. Белыми квадратами на вставке рисунка В выделены области, исследованные с помощью иммунофлуоресцентного метода.

Белок клеточного стресса и апоптоза. Уровень экспрессии Hsp70 в контрольных NaCl и Ad5-GFP группах был значительно выше, чем у интактных животных ($p < 0,05$). В опытных группах Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM и МНКП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM экспрессия Hsp70 была ниже по сравнению с группами NaCl и Ad5-GFP ($p < 0,05$) и не отличалась от интактной группы. В группе МНКП+Ad5-GFP уровень экспрессии Hsp70 не отличался от интактной и опытных групп с введением генного или генно-клеточного препаратов.

Исследование экспрессии проапоптотического белка Caspase3 в периинфарктной области обнаружило, что в опытных группах Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM и МНКП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM количество Caspase3⁺- клеток значительно меньше, чем в контрольной группе NaCl. Количество клеток, вступивших в апоптоз, в группе МНКП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM также было ниже, чем в контрольной группе Ad5-GFP ($p < 0,05$). В группе МНКП+Ad5-GFP Caspase3⁺- клеток не отличалось от опытных групп.

Клетки нейроглии. Относительная Iba1-позитивная площадь, представленная микроглией, в контрольных NaCl, Ad5-GFP и в МНКП+Ad5-GF группах была больше, чем в интактной. В тоже время в опытных Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM и МНКП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM группах этот показатель был меньше при сравнении с контрольными NaCl и Ad5-GFP группами ($p < 0,05$). В группе МНКП+Ad5-GFP относительная Iba1-позитивная площадь не отличалась от опытных групп.

Относительная GFAP-позитивная площадь в головном мозге контрольных NaCl, Ad5-GFP и МНКП+Ad5-GFP группах была больше ($p < 0,05$), чем в интактной группе. В опытной группе Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM GFAP-позитивная

площадь была больше, чем в интактной группе, но меньше, чем в контрольной NaCl ($p < 0,05$). В группе МНКП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM данный показатель был выше, чем интактной группе, но ниже, чем в контрольных группах ($p < 0,05$).

Количество Olig2-позитивных клеток было значительно снижено в контрольных NaCl, Ad5-GFP и МНКП+Ad5-GFP группах при сравнении с интактной группой ($p < 0,05$). Количество Olig2-позитивных клеток в опытных Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM и МНКП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM группах не отличалось от интактной.

Синаптические белки. Средняя интенсивность флуоресценции синаптофизина была снижена в контрольных NaCl и Ad5-GFP группах при сравнении с интактной ($p < 0,05$). Данный показатель в опытных Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM и МНКП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM группах и в группе МНКП+Ad5-GFP был выше, чем в контрольных группах ($p < 0,05$) и не отличался от интактной.

Экспрессия PSD95 была снижена во всех экспериментальных группах, за исключением группы МНКП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM, при сравнении с интактной группой ($p < 0,05$). Однако данный показатель был значительно выше в опытных Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM и МНКП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM группах и в группе МНКП+Ad5-GFP при сравнении с контрольной группой NaCl, которая не отличалась от контрольной группы Ad5-GFP ($p < 0,05$).

Мультиплексный анализ цитокинов, хемокинов и факторов роста в генетически модифицированных МНКП человека и образцах крови и ликвора крыс. Генетическая модификация МНКП с помощью Ad5-GFP не влияла на их секреторный профиль при сравнении с нативными МНКП. В МНКП, трансдуцированных с помощью Ad5-VEGF, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM, также профиль экспрессии исследуемых факторов не отличался от нативных МНКП, за исключением ожидаемого увеличения уровня VEGF. Анализ содержания аналитов в сыворотке крови и ликворе у животных из контрольной группы NaCl не выявил значимых различий при сравнении с интактными крысами, что, вероятно, указывает на прекращение воспалительной реакции на 21 сутки после моделирования

инсульта. Интратекальная инъекция комбинации Ad5, несущих *veg165*, *gdnf* и *ncam1*, или трансплантация генетически модифицированных МНКП человека также не оказывает влияние на уровень цитокинов, хемокинов и факторов роста при сравнении с интактными крысами.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Пациенты с транзиторными ишемическими атаками, артериальной гипертензией, фибрилляцией предсердий, нарушениями липидного обмена с высоким уровнем холестерина и диабетом подвержены высокому риску развития ишемического инсульта. Особый интерес представляет разработка методов превентивной терапии, направленной на повышение физиологических адаптивных механизмов мозга (нейропластичности) при наступлении инсульта.

В исследовании впервые предлагается подход превентивной генной терапии для усиления свойств нейропластичности мозга и сдерживания развития необратимых повреждений в ишемической полутени после наступления инсульта. Использование МНКП человека для доставки рекомбинантных *veg165*, *gdnf* и *ncam1* в мозг было основано на их высоком секреторном и миграционном потенциале. Оценку превентивной доставки *veg165*, *gdnf* и *ncam1* с помощью Ad5 в равном соотношении (Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM), или генетически модифицированных клеток МНКП (МНКП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM) проводили на крысах, которым моделировали ишемический инсульт через 3 или 2 суток, соответственно. Ишемический инсульт головного мозга вызывали методом дистальной окклюзии средней мозговой артерии в сочетании с лигированием общей сонной артерии на противоположной стороне для снижения кровотока в виллизиевом круге.

После интратекального введения смеси Ad5 или генетически модифицированных МНКП человека было установлено, что генный и генно-клеточный препараты с током ликвора достигали области ишемического повреждения мозга и обеспечивали локальную продукцию рекомбинантных VEGF, GDNF и NCAM, продолжавшуюся до 21 дня эксперимента.

Через 3 недели после операции макроскопическое исследование обнаружило стандартную локализацию очага инфаркта в теменной доле мозга, что соответствует месту окклюзии средней мозговой артерии. Морфометрический анализ объема инфаркта выявил больший объем инфаркта мозга у крыс из контрольных групп, что свидетельствует о положительном действии превентивной доставки *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1* на сохранность ткани мозга при наступлении инсульта.

Иммунофлуоресцентное исследование периинфарктной области подопытных животных обнаружило, что превентивная интратекальная Ad5- или МНКП-опосредованная одновременная доставка *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1* приводит к снижению экспрессии Hsp70 до конститутивного уровня и сдерживанию апоптоза клеток мозга. В дополнение к лучшей сохранности нервной ткани в области ишемического повреждения обнаружены свидетельства восстановления функциональной активности нейронов, поддержания миелинизации и препятствия развитию астроглиоза.

Сравнительный анализ морфометрического анализа объема инфаркта мозга и показателей его ремоделирования не выявил значимых различий при интратекальной инъекции генного или генно-клеточного препаратов. С точки зрения безопасности превентивная доставка генов *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1* с помощью МНКП исключает прямое токсическое и иммуногенное действие вирусных частиц на организм реципиента. При этом любой способ введения вирусных векторов предполагает неуправляемую трансдукцию различных клеточных типов, по-разному реагирующих на определенный вектор.

Трансплантация генетически модифицированных МНКП является более безопасной и эффективной по сравнению с доставкой рекомбинантных генов с помощью Ad5. Генетически модифицированные МНКП после интратекальной инъекции мигрируют в периинфарктную область и локально продуцируют рекомбинантные молекулы VEGF, GDNF и NCAM, что свидетельствует о паракринном механизме действия нейротрофических факторов на нейроны в очаге ишемического повреждения в течение трех недель от момента наступления инсульта.

Перспективы дальнейшей разработки темы. В исследовании представлены доказательства об эффективности коррекции патогенетических факторов развития ишемического инсульта у крысы с помощью превентивной доставки генов, кодирующих VEGF, GDNF, NCAM. Полученные результаты указывают на важность проведения доклинических исследований с большим количеством разнополых крупных животных, анатомические, физиологические и биохимические характеристики которых близки к человеку.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ишемический инсульт является одной из основных причин смертности населения в мире. При этом пациенты, выжившие после инсульта, подвержены риску инвалидности и имеют высокую частоту рецидива. Превентивная терапия, направленная на предупреждение развития ишемического инсульта у пациентов из группы риска, позволит предотвратить сосудистую катастрофу или улучшить исход заболевания. Целью проведенного исследования являлась разработка метода превентивной доставки генов, направленного на повышение жизнеспособности нейронов при угрозе наступления ишемического инсульта, и, как следствие, оказывающего нейропротекторное действие в области ишемической полутени после наступления сосудистой катастрофы. В данной работе Ad5 или МНКП человека были использованы для превентивной доставки в область инфаркта одновременно трех генов, кодирующих VEGF, GDNF и NCAM, путем интратекальной инъекции до моделирования ишемического инсульта головного мозга у крыс.

Постишемическую регенерацию мозга исследовали через 21 день после моделирования инсульта. Морфометрический и иммунофлуоресцентный анализ в области ишемического повреждения показал уменьшение объема инфаркта, сопровождающееся меньшим количеством апоптотических клеток, снижением клеточного стресса, сдерживанием развития астроглиоза, поддержанием миелинизации и восстановлением экспрессии синаптических белков у животных на фоне превентивной доставки генов, кодирующих VEGF, GDNF, и NCAM. При этом нейропротекторное действие рекомбинантных молекул VEGF GDNF и NCAM

начинается уже в период терапевтического окна (в том числе области ишемической полутени) и продолжается в последующие три недели реабилитационного периода. Таким образом, полученные в рамках проведенного исследования данные могут являться основой для разработки нового способа превентивной персонализированной генной терапии при угрозе ишемического инсульта.

ВЫВОДЫ

1. После окклюзии средней мозговой артерии у крысы через 21 сутки в теменной доле головного мозга формируется мелкоочаговый инфаркт, сопровождающийся признаками апоптоза клеток, клеточного стресса, астроглиоза, уменьшением количества миелинообразующих олигодендроглиальных клеток, снижением уровня экспрессии синаптических белков в нейронах, свидетельствующий о продолжающейся нейродегенерации в перинфарктной области мозга.

2. Трансдукция моноклеарных клеток крови пуповины человека аденовирусным вектором, экспрессирующим зеленый флуоресцентный белок (Ad5-GFP), смесью аденовирусных векторов, несущих нейропротекторные факторы (Ad5-VEGF, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM), не оказывает влияния на секретомный профиль генетически модифицированных моноклеарных клеток крови пуповины человека, а именно на продукцию цитокинов, хемокинов и факторов роста, за исключением установленного 200-кратного увеличения продукции рекомбинантного белка VEGF.

3. Интратекальная доставка рекомбинантных генов *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1* с помощью аденовирусных векторов (Ad5-VEGF, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM) или моноклеарных клеток крови пуповины человека, одновременно трансдуцированных комбинацией аденовирусных векторов (Ad5-VEGF + Ad5-GDNF + Ad5-NCAM), обеспечивает продукцию нейротрофических факторов VEGF, GDNF и NCAM, которые оказывают нейропротекторное действие в перинфарктной области ишемического повреждения мозга с момента наступления инсульта и в последующие 3 недели эксперимента.

4. Превентивная интратекальная доставка рекомбинантных генов *vegfl65*,

gdnf и *ncam1* с помощью аденовирусных векторов или моноклеарных клеток крови пуповины человека не влияет на сенсорный и моторный ответы, но способствует сохранности ткани головного мозга, препятствует развитию астроглиоза и поддерживает миелинизацию, содействует повышению продукции синаптических белков в нейронах коры головного мозга, что свидетельствует о нейропротекторном механизме действия рекомбинантных молекул VEGF, GDNF и NCAM в перинфарктной области мозга.

5. Интратекальное введение смеси генов *veg165*, *gdnf* и *ncam1* с помощью аденовирусных векторов (Ad5-VEGF, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM) или генетически модифицированных моноклеарных клеток крови пуповины человека не влияет на профиль цитокинов, хемокинов и факторов роста в крови и спинномозговой жидкости подопытных животных, что свидетельствует об отсутствии иммуногенного эффекта аденовирусных векторов и генетически модифицированных моноклеарных клеток крови пуповины человека, как на местном, так и системном уровнях.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Triple-Gene Therapy for Stroke: A Proof-of-Concept in Vivo Study in Rats / M.E. Sokolov., F.V. Bashirov, V.A. Markosyan [et al] // Front. Pharmacol. – 2018. – Vol. 9, No February. – Pp. 1–15.**
2. Preventive gene therapy for stroke / V.A. Markosyan, F.V. Bashirov, M.E. Sokolov [et al] // Eur. J. Clin. Invest. – 2018. – Vol. 48, No Suppl.1. – Pp. 99.
3. Umbilical Cord Blood Mononuclear Cells for Ex-Vivo Gene Therapy / F.V. Bashirov, I.I. Salafutdinov, V.A. Markosyan [et al.] // Blood. – 2018. – Vol. 132, No Suppl 1. – Pp. 5797.
4. Cell mediated gene therapy for neurodegenerative diseases, neurotrauma and stroke / F.V. Bashirov, V.A. Markosyan, A.A. Izmailov [et al.] // Hum. Gene Ther. – 2018. – Vol. 29, No 12. – Pp. 139.
5. Preventive Ex Vivo Gene Therapy for Stroke in Rat Model / V.A. Markosyan, Z.Z. Safiulloev, F.O. Fadeev [et al.] // Mol. Biol. Cell. – 2019. – Vol. 30, No 26. – Pp. 2217/B467.
6. Triple gene therapy for the prevention of ischemic stroke / Markosyan V.A., Sokolov M.E., Izmailov A.A. [et al.] // Eur. J. Clin. Invest. – 2020. – No Suppl 1:e13369. – Pp. 41–42.
7. **Preventive triple gene therapy reduces the negative consequences of ischemia-induced brain injury after modeling stroke in a rat / V. Markosyan, Z.**

Safiullov, A. Izmailov [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2020. – Vol. 21(18). – Pp. 1-24.

8. Модель мелкоочагового ишемического инфаркта головного мозга, как основа для разработки новых методов терапии инсульта / В.А. Маркосян, А.А. Измайлов, М.Е. Соколов [и др.] // Казанский медицинский журнал – 2023. – Т. 104, № 2. – С. 242-248.

9. Autologous Genetically Enriched Leucoconcentrate in the Preventive and Acute Phases of Stroke Treatment in a Mini-Pig Model / Z. Safiullov, A. Izmailov, V. Markosyan [et al.] // Pharm. – 2022. – Vol. 14. – Pp. 2209.

10. Патент № 2748940 С1. Средство для сдерживания гибели нейронов при ишемическом инсульте головного мозга, способ клеточно-опосредованной генной терапии ишемического инсульта средством сдерживания гибели нейронов при ишемическом инсульте головного мозга и способ превентивной генной терапии для предупреждения гибели нейронов средством сдерживания гибели нейронов при ишемическом инсульте головного мозга : № 2017142047 : заявл. 01.12.2017 : опубл. 20.01.2018 / Исламов Р.Р., Соколов М.Е. Маркосян В.А.; заявитель, патентообладатель ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России.

11. Патент № 2676701 С1. Способ превентивной генной терапии для сдерживания гибели нейронов при ишемическом инсульте головного мозга: № 2020117396 : заявл. 18.05.2020 : опубл. 01.06.2021 / Исламов Р.Р., Маркосян В.А. ; заявитель, патентообладатель ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России.

Список сокращений

АТ – антитело

МНПК – мононуклеарных клеток крови пуповины человека

Ad5 – генетический вектор на основе аденовируса человека 5 серотипа

Caspase3 – проапоптозный белок

GDNF – глиальный нейротрофический фактор

GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок

Hsp70 – белок теплового шока 70 кДа

Iba1 – кальций-связывающий белок

NCAM – нейрональная молекула клеточной адгезии

Olig2 – транскрипционный фактор олигодендроцитов 2

PSD95 – белок постсинаптической плотности 95 кДа

VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста