

На правах рукописи

Давлеева Мария Александровна

**МЕХАНИЗМЫ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ СПИННОГО
МОЗГА МИНИ-СВИНЬИ В УСЛОВИЯХ ИНФУЗИИ ГЕНЕТИЧЕСКИ-
МОДИФИЦИРОВАННОГО АУТОЛЕЙКОКОНЦЕНТРАТА**

3.3.3. Патологическая физиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Казань - 2026

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

Официальные оппоненты: **Салмина Алла Борисовна**, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник и заведующий лабораторией нейробиологии и тканевой инженерии, заместитель директора Института мозга федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский центр неврологии и нейронаук»

Акулинин Виктор Александрович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

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

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2026 г. в « ____ » часов на заседании диссертационного совета 21.2.012.02, созданного на базе ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России по адресу: 420012, г. Казань, ул. Бутлерова, д. 49.

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

Автореферат разослан « ____ » _____ 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, доцент

Радченко Ольга Рафаиловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Позвоночно-спинномозговая травма является тяжелым повреждением, сочетающим нарушение анатомической целостности позвоночного столба и спинного мозга. В зависимости от тяжести клинические проявления травмы спинного мозга (ТСМ) могут включать двигательные, сенсорные и вегетативные расстройства, что приводит к частичной или полной утрате соответствующих функций и снижает качество жизни пациента (Eli I., Lerner D.P., Ghogawala Z., 2021). При этом, согласно международным исследованиям, в 78% всех случаев ТСМ страдают мужчины (Kang Y. et al., 2017). Аналогичную тенденцию наблюдают и в Российской Федерации, где доля мужчин в возрасте до 30 лет среди пациентов с ТСМ превышает 80%, что указывает на высокую инвалидизацию среди наиболее активной и трудоспособной части населения (Kongjun Y. et al., 2025).

Несмотря на стандартизацию хирургических и реабилитационных протоколов, существующие методы лечения спинальной травмы носят преимущественно симптоматический характер и обуславливают формирование стойкой инвалидности у значительной части пациентов. Для решения указанных проблем необходима разработка новых терапевтических стратегий, нацеленных на стимулирование посттравматической регенерации спинного мозга в острую фазу ТСМ (Tian T., Zhang S., Yang M., 2023).

Степень разработанности темы исследования. Среди современных подходов к ограничению развития вторичных повреждений в острую фазу и стимулированию нейрорегенерации при ТСМ особый интерес представляет генная терапия, основанная на доставке в очаг повреждения терапевтических генов, кодирующих нейротрофические факторы с целью стимулирования поддержания жизнеспособности нейронов (Almeida F. M. de et al., 2023), роста их аксонов и синаптогенеза (Anderson M. A. et al., 2018). В подобных исследованиях уже применяют гамму гуморальных факторов: нейротрофический фактор мозга (BDNF), нейротрофин-3 (NT-3), фактор роста нервов (NGF), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), глиальный

нейротрофический фактор (GDNF), сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), нейрональную молекулу клеточной адгезии (NCAM), которые оказывают стимулирующее действие на посттравматическое восстановление спинного мозга (Deznabi N., Hosseini S., Rajabi M., 2023).

Комбинации генетических конструкций, несущих гены с нейротрофическим действием, и различных клеточных типов привели к созданию множества генно-клеточных препаратов. В частности, для лечения последствий ТСМ были предложены фибробласты, продуцирующие NGF и NT-3, шванновские клетки – NT-3, клетки-предшественники олигодендроцитов – CNTF, нейральные стволовые клетки – NT-3, мезенхимальные стволовые клетки – BDNF, обкладочные клетки обонятельного эпителия – GDNF (Deznabi N., Hosseini S., Rajabi M., 2023; Keefe K.M., Sheikh I.S., Smith G.M., 2017). Подобное многообразие предложенных генетически модифицированных клеток указывает на активный поиск эффективного и безопасного способа генно-клеточной терапии ТСМ.

Одними из недооцененных претендентов на роль носителей терапевтических генов являются аутологичные лейкоциты периферической крови. Они представляют собой доступный и безопасный клеточный носитель для персонализированной генной терапии *ex vivo*, сочетающий высокую секреторную активность лейкоцитов, активную миграцию в повреждённые ткани и возможность многократных системных аутоинфузий.

Цель исследования. Установить влияние аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами сосудистого эндотелиального фактора роста (*vegfl65*), глиального нейротрофического фактора (*gdnf*) и нейрональной молекулы клеточной адгезии (*ncam1*), на клеточные и молекулярные механизмы посттравматической регенерации спинного мозга мини-свиньи после контузионной травмы в нижнегрудном отделе.

Задачи исследования:

1. Изучить эффективность трансдукции лейкоцитов мини-свиньи химерными аденовирусными векторами (Ad5/F35), несущими по отдельности

человеческие гены сосудистого эндотелиального фактора роста (*vegfl65*), глиального нейротрофического фактора (*gdnf*) и нейрональной молекулы клеточной адгезии (*ncam1*), а также оценить экспрессию зеленого флуоресцентного белка GFP в лейкоцитах, трансдуцированных аденовирусным вектором, несущим репортерный ген *gfp*.

2. Изучить миграционный потенциал лейкоцитов, трансдуцированных аденовирусным вектором, несущим репортерный ген зеленого флуоресцентного белка (*gfp*), после внутривенной инфузии мини-свинье с контузионной травмой спинного мозга в нижнегрудном отделе.

3. Оценить влияние внутривенного введения аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, на неврологический статус и сохранность серого и белого вещества спинного мозга животных выше и ниже эпицентра повреждения после моделирования контузионной травмы в нижнегрудном отделе.

4. Изучить влияние аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, на коррекцию молекулярных и клеточных механизмов посттравматических нарушений в спинном мозге мини-свиньи выше и ниже эпицентра повреждения после моделирования контузионной травмы в нижнегрудном отделе.

Научная новизна. В экспериментах *in vitro* эффективность экспрессии в генетически модифицированных лейкоцитах мини-свиньи рекомбинантных генов, кодирующих VEGF, GDNF и NCAM, подтверждена с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ).

Эффективность миграционного потенциала лейкоцитов мини-свиньи и продукцию рекомбинантного белка *in vivo* исследовали с помощью химерного аденовирусного вектора Ad5/35, несущего репортерный ген зелёного флуоресцентного белка (GFP). Это позволило получить приоритетные данные по результатам флуоресцентной микроскопии о том, что после внутривенной инфузии генетически модифицированные лейкоциты выселяются из кровотока в область травматического повреждения спинного мозга и органы иммунной

защиты и синтезируют рекомбинантный белок GFP.

Новизной обладают приведенные в работе доказательства того, что внутривенное введение генно-клеточного препарата на основе генетически модифицированных аутологичных лейкоцитов, обогащенных генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, мини-свиньям через 4 часа после моделирования контузионной ТСМ имеет выраженный позитивный эффект на сохранность серого вещества спинного мозга ниже эпицентра нейротравмы. Значимыми для будущего применения в клинике и новыми являются результаты о том, что аутологичный лейкоконцентрат, обогащенный генами с нейротрофическим действием, оказывает положительный эффект на ремоделирование клеток нейроглии спинного мозга, проявляющееся нормализацией распределения астроцитов и клеток микроглии в задних рогах и увеличением количества олигодендроглиальных клеток в боковых канатиках в ростральном и каудальном отделах.

Установленные позитивные молекулярные и клеточные изменения свидетельствуют о патогенетическом действии рекомбинантных белковых молекул VEGF165, GDNF и NCAM1 на посттравматическое восстановление спинного мозга и непосредственно отражают улучшение клинических показателей у подопытных животных (появление двигательной активности в задних конечностях и нормализация произвольного мочеиспускания).

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическое значение выполненного исследования заключается в выявлении механизмов действия инновационного персонализированного генно-клеточного препарата на основе генетически модифицированных аутологичных лейкоцитов, обогащенных генами, кодирующими VEGF, GDNF и NCAM, в модели на мини-свиньях с контузионной ТСМ в нижнегрудном отделе.

Данные о направленной миграции генетически модифицированных лейкоцитов в область нейротравмы и органы иммунной защиты (селезенку), при доказанной эффективности посттравматической регенерации спинного мозга свидетельствуют о наличии возможного эндокринного и паракринного

механизмов действия секретируемых генетически модифицированными лейкоцитами рекомбинантных молекул VEGF165, GDNF и NCAM1, с хорошо известными нейропротекторными и нейротрофическими действиями на клетки ЦНС. Рекомбинантные нейротрофические факторы, продуцируемые генетически модифицированными лейкоцитами в кровотоке или в органах иммунной защиты, через поврежденный гематоэнцефалический барьер способны диффундировать в эпицентр нейротравмы и по эндокринному механизму модулировать нейропластичность мозга. Кроме того, присутствие генетически модифицированных лейкоцитов непосредственно в области повреждения мозга дает основание полагать, что лейкоциты, обогащенные генами *vegfl65*, *gdnf*, *ncam1*, мигрируют через нарушенный гематоэнцефалический барьер в ткани мозга и *in situ* продуцируют VEGF165, GDNF и NCAM1, которые уже по паракринному механизму могут стимулировать нейрорегенерацию.

Данные настоящего исследования могут явиться обоснованием для разработки безопасного и экономичного подхода к персонализированной прецизионной генной терапии *ex vivo* на основе аутоинфузии генетически модифицированных лейкоцитов, выделенных из периферической крови пациента. Таким образом, полученные результаты формируют основу для развития клеточно-опосредованной генной терапии как потенциального направления в лечении ТСМ и могут способствовать дальнейшему внедрению регенеративных подходов в клиническую неврологию.

Методология и методы диссертационного исследования. Все эксперименты на животных одобрены на заседании Локального этического комитета ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России (протокол заседания № 5 от 26 мая 2020 г.). Исследование частично поддержано грантом РНФ № 16-15-00010 по теме: «Клеточно-опосредованная генная терапия в сочетании с электростимуляцией при травме спинного мозга». Моделирование контузионной ТСМ в нижнегрудном отделе у мини-свиней выполняли по протоколу, разработанному в предыдущих работах (Islamov R.R. et al., 2022). Аутологичный лейкоконцентрат, обогащенный генами с нейротрофическим действием,

готовили из периферической крови мини-свиньи и аденовирусных векторов (Ad5/F35), несущих по отдельности терапевтические гены *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, по запатентованной технологии (Патент РФ №2784233 «Фармацевтическая композиция и способ ее использования для терапии повреждений головного и спинного мозга»). Генетические конструкции наработаны в ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ в рамках выполнения гранта РНФ. Препарат готовили в стандартном гематологическом контейнере с использованием гематологических центрифуг без применения материалов и оборудования для культивирования клеток *in vitro*. Эффективность посттравматической регенерации спинного мозга в условиях внутривенной аутоинфузии лейкоконцентрата, обогащенного генами *gdnf*, *vegfl65* и *ncam1*, изучали с помощью поведенческих тестов, гистологических и молекулярных методов исследования. Статистический анализ и визуализацию полученных первичных данных проводили в среде R версии 4.1.2 (R Foundation for Statistical Computing, Вена, Австрия) с использованием теста Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Положения, выносимые на защиту

1. Внутривенное введение аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного комбинацией терапевтических генов с нейротрофическим действием (*vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*), стимулирует посттравматическую регенерацию спинного мозга мини-свиньи с контузионной травмой в нижнегрудном отделе, что выражается в сохранности серого вещества спинного мозга и положительном remodelировании клеток нейроглии выше и ниже эпицентра нейротравмы.

2. Механизм положительного влияния аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, на посттравматическую регенерацию спинного мозга мини-свиньи с контузионной травмой в нижнегрудном отделе обусловлен паракринным и эндокринным действием рекомбинантных белковых молекул VEGF165, GDNF и NCAM1 на клетки

спинного мозга.

Степень достоверности. Достоверность полученных результатов подтверждается репрезентативным объемом выборки, использованием современных методов исследования (молекулярно-генетические, иммунофлуоресцентные, морфометрические, гистологические) и корректными методами статистической обработки полученных данных.

Апробация результатов исследования. Результаты научного исследования были доложены на IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2019); The American Society for Cell Biology (ASCB) and European Molecular Biology Organization (EMBO) (Washington, DC, 2019); VII Молодежной школе-конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2020); XXVIII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2021); Всероссийском научно-медицинском форуме студентов и молодых ученых с международным участием «Белые цветы» (Казань, 2021–2025).

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс кафедры общей патологии и кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 1 статья в журнале из перечня ВАК, 2 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных библиографических базах Scopus и WoS, 2 патента.

Объем и структура работы. Диссертационная работа содержит 164 страницы печатного текста, состоит из 5 глав, а именно введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов, заключения, выводов, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы и списка иллюстративного материала. Работа включает 5 таблиц, 26 рисунков. Список литературы содержит 271 цитируемых источника.

Личный вклад автора. Диссертантом лично осуществлено планирование и проведение экспериментального исследования. Все материалы диссертации, включая результаты, выводы и положения, выносимые на защиту, сформулированы автором лично. Текст диссертации и все публикации по теме диссертации подготовлены соискателем самостоятельно.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Получение генно-клеточного препарата. За 12 часов до моделирования спинальной травмы у мини-свиней из подключичной вены забирали 50 мл периферической крови в стандартный гематологический контейнер. Лейкоконтрат получали путем фракционирования с использованием 6% раствора гидроксипропила крахмала, двукратного центрифугирования и экстракции плазмы. Трансдукцию лейкоцитов проводили непосредственно в контейнере в течение 12 часов на шейкере при комнатной температуре аденовирусным вектором, несущим ген зеленого флуоресцентного белка (Ad5/35-GFP), или комбинацией из трех векторов (1/3 Ad5/35-VEGF165, 1/3 Ad5/35-GDNF и 1/3 Ad5/35-NCAM1), при множественности инфицирования (MOI) равной 10. После инкубации свободные вирусные частицы удаляли путем отмывки физиологическим раствором, а объем клеточной взвеси доводили до 30 мл.

Общий анализ генно-клеточного препарата на основе лейкоцитов, трансдуцированных Ad5/35-GFP, показал снижение количества лейкоцитов в три раза ($p = 0,002$), что может быть связано с пятикратным снижением количества гранулоцитов ($p = 0,015$) и шестикратным снижением количества моноцитов ($p = 0,003$) по сравнению с нативной периферической кровью. Количество лимфоцитов было примерно равным, а количество эритроцитов было в 19 раз ниже ($p = 0,001$) в полученном препарате по сравнению с периферической кровью. Методом проточной цитометрии было показано, что в образцах лейкоконцентрата, обогащенного геном *gfp*, 0,6% лейкоцитов эффективно продуцируют зеленый флуоресцентный белок.

Клеточный анализ лейкоконцентрата мини-свиньи, трансдуцированного комбинацией аденовирусных векторов (Ad5/35-VEGF165, Ad5/35-GDNF и Ad5/35-NCAM1) в равном соотношении, показал схожие значения по сравнению с генно-клеточным препаратом на основе лейкоцитов мини-свиньи и Ad5/F35-GFP. Эффективность трансдукции лейкоцитов исследовали методом ПЦР-РВ через 72 часа культивирования клеток. Выявлено увеличение уровня относительной экспрессии мРНК трансгенов: в $3,2 \pm 1,2$ раза для *vegfl65*, в $3,0 \pm 1,5$ раза для *gdnf* и в $5,5 \pm 1,7$ раза для *ncam1* по сравнению с нетрансдуцированными лейкоцитами.

Моделирование нейротравмы. Исследование выполнено на половозрелых самках вьетнамской вислобрюхой свиньи (8 месяцев, масса 25–30 кг, $n = 14$). Доступ к спинному мозгу осуществляли посредством ламинэктомии на уровне Th8–Th9. Дозированную контузионную ТСМ осуществляли при помощи металлического стержня весом 50 г, падающего с высоты 50 см. на открытый участок твердой мозговой оболочки. Через 4 часа после травмы животным из терапевтической группы ($n = 4$) внутривенно через ушную вену однократно вводили 30 мл генно-клеточного препарата на основе аутологичных лейкоцитов, обогащенных терапевтическими генами. Животным контрольной группы ($n = 4$) вводили 30 мл нативного аутологичного лейкоконцентрата. Интактных (здоровых) животных ($n=3$) использовали для получения референсных показателей для последующего сравнительного анализа с данными мини-свиней с ТСМ из контрольной и терапевтической групп. Отдельная группа ($n = 3$) получала лейкоконцентрат с репортерным геном *gfp* для изучения миграционного потенциала генетически модифицированных лейкоцитов *in vivo*. Все животные в послеоперационном периоде получали стандартную антибактериальную, обезболивающую и витаминную терапию (Рисунок 1).

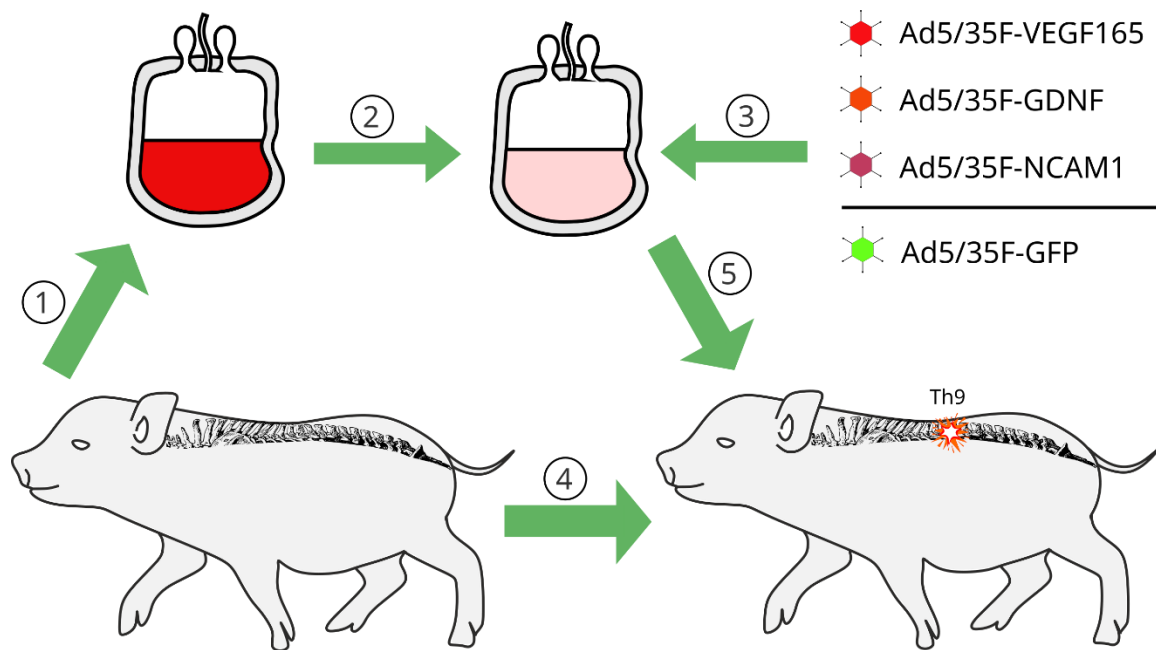


Рисунок 1 – Дизайн эксперимента: (1) забор 50 мл венозной крови из подключичной вены; (2) получение аутолейкоконцентрата; (3) одновременная трансдукция лейкоцитов тремя химерными аденовирусными векторами Ad5/35-VEGF165, Ad5/35-GDNF и Ad5/35-NCAM1 в равном соотношении или трансдукция аденовирусным вектором Ad5/F35-GFP, несущим репортерный ген зеленого флуоресцентного белка (*gfp*); (4) моделирование контузионной травмы в сегменте Th9; (5) инфузия через ушную вену генно-клеточного препарата на основе аутологических лейкоцитов, обогащенных терапевтическими генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncaml* или геном *gfp*.

Исследование миграционного потенциала лейкоцитов, трансдуцированных Ad5/F35-GFP, и экспрессии *gfp in vivo*. Для оценки миграционного потенциала генетически модифицированных клеток проводили флуоресцентную микроскопию срезов спинного мозга и селезенки через 7 суток после внутривенной аутоинфузии лейкоцитов, трансдуцированных Ad5/F35-GFP, свиньям с ТСМ. Полученные результаты показали, что генетически модифицированные лейкоциты могут циркулировать в кровотоке, мигрировать в область контузионной ТСМ, заселять селезенку и эффективно продуцировать зеленый флуоресцентный белок в местах установленной локализации.

Оценка посттравматической регенерации спинного мозга мини-свиней после ТСМ в условиях внутривенного введения аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного терапевтическими генами *vegfl65*, *gdnf* и *pcam1*

Неврологический статус. Еженедельный неврологический осмотр включал оценку типа паралича, мышечного тонуса, пассивных и активных движений в задних конечностях, а также функции мочеиспускания. В первую неделю после травмы у всех экспериментальных животных наблюдался центральный тип паралича задних конечностей и задержка мочи. Через 3 недели у мини-свиней обеих групп отмечались первые попытки подтягивания задних конечностей к туловищу и мочеиспускания малыми порциями. К 4-й неделе животные терапевтической группы могли самостоятельно стоять на четырех конечностях, тогда как контрольные свиньи пытались приподняться с помощью передних конечностей. Через 5 недель у животных из терапевтической группы наступала нормализация мочеиспускания, у контрольных мини-свиней мочеиспускания восстанавливалось через 7 недель после ТСМ. К 8-й неделе мини-свиньи, получившие генно-клеточный препарат, демонстрировали успешные попытки самостоятельного стояния и ходьбы с активными движениями в бедренных, коленных и голеностопных суставах. Животные контрольной группы к этому сроку все еще передвигались, волоча задние конечности, с отсутствием сгибания в суставах.

Гистологическое исследование спинного мозга. Через 8 недель после нейротравмы спинной мозг разделяли на ростральный (РС) и каудальный сегменты (КС) относительно эпицентра травмы, а также на ростральный (ЭР) и каудальный фрагменты (ЭК) эпицентра травмы, и готовили криостатные и полутонкие срезы для морфологического и иммунофлуоресцентного исследования.

Морфометрический анализ поперечных срезов спинного мозга, окрашенных гематоксилином и эозином, обнаружил, что площадь сохранного серого вещества в РС не различалась между группами, однако в КС у животных

терапевтической группы сохранность серого вещества была выше (98,13 [96,73–98,45] %) по сравнению с контрольной группой (70,71 [68,00–76,70] %, $p < 0,0001$). На полутонких срезах белого вещества в области латерального кортикоспинального тракта (КСТ) в ЭР и ЭК достоверных различий по сохранности исследуемых зон между терапевтической и контрольной группами выявлено не было ($p = 0,4397$).

Для анализа выживаемости клеток спинного мозга были использованы антитела (АТ) против белка теплового шока Hsp27, экспрессия которого возрастает при оксидативном стрессе, и АТ против проапоптозного белка Caspase3, свидетельствующие о гибели клеток. Для оценки астроглиоза применяли АТ против глиального фибриллярного кислого белка GFAP, являющимся маркером астроцитов, и АТ к белку ионизированной кальций-связывающей адаптерной молекулы 1 Iba1, который представляет собой маркер микроглии. Олигодендроциты изучали с помощью АТ против фактора транскрипции олигодендроцитов Olig2. Для анализа экспрессии синаптических белков использовали АТ против синаптофизина и белка постсинаптической плотности 95 кДа (PSD95). Продольные срезы из ЭР и ЭК фрагментов, смонтированные на предметные стекла, окрашивали АТ к специфическому для нейронов β III-тубулину для идентификации аксонов.

Было выявлено, что у контрольных мини-свиней количество Caspase3-позитивных клеток в задних рогах (ЗР) в РС спинного мозга было достоверно выше (25,50 [24,25–26,00], чем у животных из терапевтической группы (13,50 [11,25–18,00], $p=0,0033$). В то же время анализ данных показал, что количество Caspase3-позитивных клеток в ЗР спинного мозга в КС не отличалось у контрольных (20,50 [19,25–24,75] животных и мини-свиней из терапевтической группы 18,00 [17,00–19,00] ($p > 0,05$).

Уровень экспрессии Hsp27 в ЗР в РС (6,03 [5,52–6,46]) и КС (4,99 [4,13–5,12]) спинного мозга животных из терапевтической группы не отличался от данных интактных животных. При этом у мини-свиней из контрольной группы было выявлено значительное увеличение Hsp27-позитивной площади в РС (27,11

[24,02–29,03], $p = 0,0004$) и в КС (29,51 [28,76–32,33], $p < 0,0001$) спинного мозга по сравнению с интактными животными (0,24 [0,16–0,87]).

Синаптофизин-иммунопозитивная площадь в ЗР была значительно меньше в РС и КС как в контрольной (РС, (20,01 [19,10–21,82], $p = 0,0173$; КС, 13,79 [11,25–16,28], $p < 0,0001$), так и в терапевтической (РС, (20,31 [19,55–22,39], $p = 0,0259$; КС, 20,37 [18,25–22,13], $p = 0,0162$) группах по сравнению с интактной (25,23 [23,75–27,72]). Однако синаптофизин-иммунопозитивная площадь в КС в терапевтической группе была больше, чем в контрольной ($p = 0,0251$).

Анализ экспрессии белка PSD95 в ЗР показал, что PSD95-иммунопозитивная площадь была значительно меньше в КС спинного мозга в контрольной (18,66 [16,73–22,72], $p = 0,0019$) и терапевтической группах (19,65 [16,84–23,68], $p = 0,0043$), и не различалась в РС у животных из контрольной (27,61 [16,80–31,63]) и терапевтической групп (23,09 [22,92–24,09]) по сравнению с интактными мини-свиньями (30,31 [25,60–33,00]).

Иммунофлуоресцентное окрашивание ЗР спинного мозга АТ против GFAP выявило, что в терапевтической группе значения по маркеру астроцитов в РС (3,66 [1,67–5,14]) и КС (6,63 [5,23–8,79]) не имели отличий от таковых показателей у интактных животных. При этом у мини-свиней из контрольной группы выявлено увеличение GFAP-иммунопозитивной площади как в РС (12,75 [10,83–13,84], $p = 0,0105$), так и в КС (12,53 [11,69–13,73], $p = 0,0173$) по сравнению с животными из интактной группы (6,23 [4,36–8,73]).

Анализ экспрессии Iba1 в ЗР спинного мозга обнаружил, что в терапевтической группе Iba1-иммунопозитивная площадь в РС (25,82 [23,51–26,80]) и в КС (28,81 [25,62–30,35]) аналогична значениям в интактной группе. В контрольной группе было обнаружено увеличение Iba1-иммунопозитивной площади как в РС (30,67 [28,60–31,88], $p = 0,0193$), так и в КС (30,37 [29,29–32,43], $p = 0,0014$) спинного мозга по сравнению с соответствующими данными животных из интактной группы (26,10 [23,89–28,09]).

Иммунофлуоресцентный анализ Olig2 в области латерального КСТ спинного мозга обнаружил, что в терапевтической группе количество

олигодендроглиальных клеток в РС (24,00 [23,00–26,00], $p=0,0531$) и в КС (22,00 [20,50–24,25], $p=0,0312$) было значительно выше, чем в РС (13,50 [13,00–14,75]) и в КС (10,50 [10,00–11,75] в контрольной группе и не отличалось от значений интактной группы (24,50 [24,00–25,00]).

Исследование экспрессии β III-тубулина в области латерального КСТ на продольных срезах в ЭР и ЭК обнаружило, что β III-тубулин-иммунопозитивная площадь в ЭК не отличалась в терапевтической группе (12,79 [10,30–15,33]) по сравнению с интактной группой (17,70 [15,89–19,79]). При этом у контрольных животных β III-тубулин-позитивная площадь в ЭК была значительно меньше (10,0 [8,41–11,48], $p<0,0001$) по сравнению со значениями у интактных мини-свиней. В ЭР у животных из контрольной (14,74 [12,81–16,43]) и терапевтической групп (15,06 [11,87–17,69]) β III-тубулин-позитивная площадь была аналогичной таковой у мини-свиней из интактной группы.

Таким образом, концепция персонализированной генной терапии *ex vivo*, заключающаяся в использовании генно-клеточного препарата на основе аутологичных генетически модифицированных лейкоцитов, была экспериментально продемонстрирована на модели контузионной ТСМ у мини-свиней. Преимуществом метода является простота изготовления генно-клеточного препарата, а именно получения взвеси аутологичных лейкоцитов из периферической крови и её последующей трансдукции аденовирусными векторами, несущими терапевтические гены *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, в гематологическом контейнере, что исключает риски, связанные с культивированием клеток и использованием компонентов животного происхождения и антибиотиков. Для обеспечения высокой эффективности трансдукции лейкоцитов применяли химерный аденовирусный вектор (Ad5/35), содержащий модифицированный фибер, который обладает высокой аффинностью к рецептору CD46, экспрессируемому на поверхности всех ядросодержащих клеток крови.

Через 8 недель после ТСМ у мини-свиней в условиях внутривенной инфузии аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами *vegfl65*, *gdnf*, и

pcam1, было установлено положительное влияние генно-клеточного препарата на динамику неврологического статуса (появление двигательной активности в задних конечностях и нормализация произвольного мочеиспускания) на фоне посттравматической регенерации спинного мозга (сдерживание апоптоза в ростральном отделе, снижение клеточного стресса и восстановление активности нервных клеток в каудальном отделе, нормализация распределения астроцитов и клеток микроглии и увеличение количества олигодендроглиальных клеток в ростральном и каудальном отделах).

Тот факт, что GFP-позитивные лейкоциты были обнаружены в области травматического повреждения спинного мозга, а также в органах иммунной защиты, дает основание полагать, что генетически модифицированные лейкоциты способны продуцировать рекомбинантные белки *in vivo*, терапевтическое действие которых на клетки-мишени может быть реализовано через паракринный и/или эндокринный механизмы (Рисунок 2).

Паракринный механизм действия генно-клеточного препарата основан на временной продукции *in situ* рекомбинантных биологически активных молекул с терапевтическим действием мигрирующими трансдуцированными лейкоцитами в область повреждения спинного мозга. Эндокринный механизм действия генно-клеточного препарата обусловлен секрецией нейротрофических факторов в кровь генетически модифицированными лейкоцитами, циркулирующими в кровеносных сосудах или локализующихся в органах иммунной защиты. Из кровотока рекомбинантные терапевтические молекулы через поврежденный гематоэнцефалический барьер способны диффундировать в область патологического процесса и усиливать паракринный механизм действия генно-клеточного препарата.

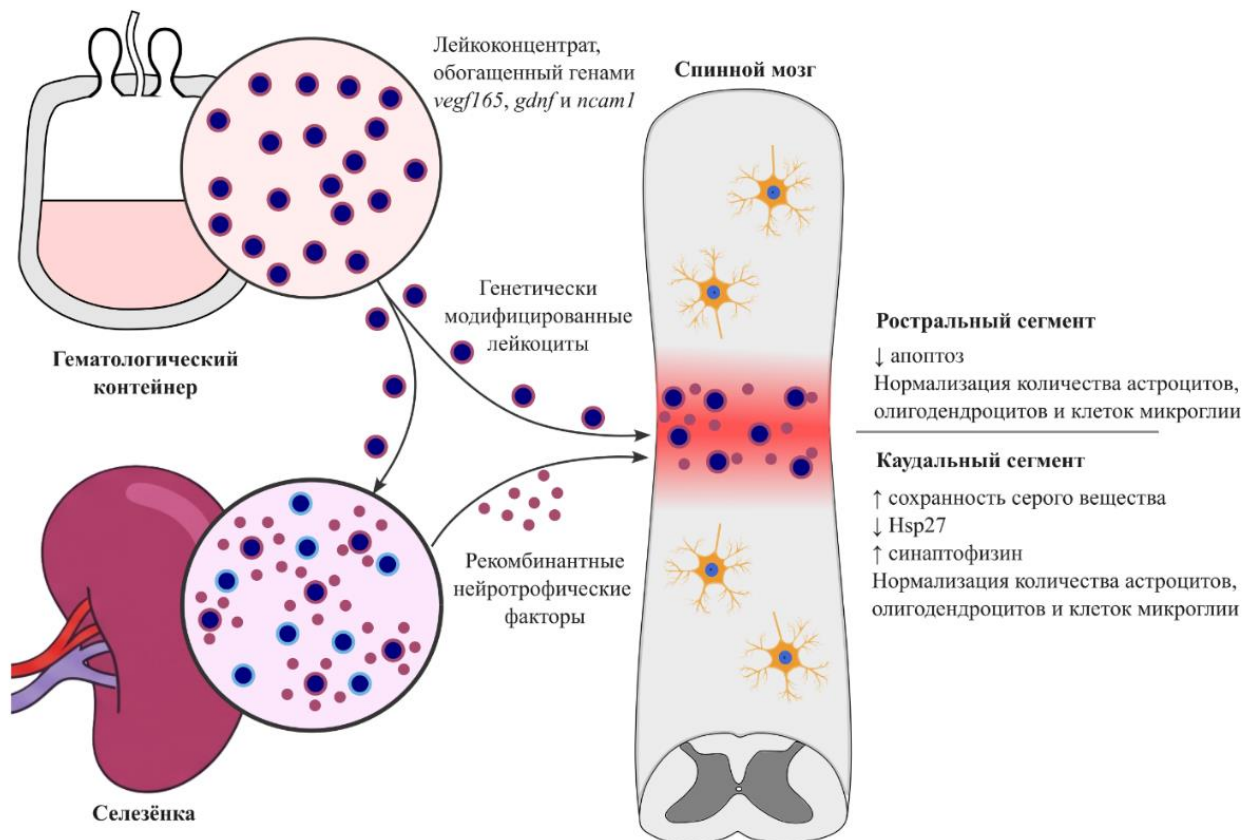


Рисунок 2 – Паракринный и эндокринный механизмы действия рекомбинантных нейротрофических факторов, продуцируемых генетически модифицированными аутологичными лейкоцитами.

ВЫВОДЫ

1. Эффективность трансдукции лейкоцитов свиньи с помощью химерного аденовирусного вектора на основе аденовируса человека серотипа 5 с фибром аденовируса 35 серотипа (Ad5/F35), несущими по отдельности гены сосудистого эндотелиального фактора роста (Ad5/35F-VEGF165), глиального нейротрофического фактора (Ad5/35F-GDNF) и нейрональной молекулы клеточной адгезии (Ad5/35F-NCAM1) подтверждена на уровне транскрипции генов *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, а также на уровне синтеза зеленого флуоресцентного белка GFP после трансдукции аденовирусным вектором, несущим репортерный ген *gfp*, где уровень трансдукции составил 0,6%.

2. Установлено, что после внутривенной инфузии аутологичного лейкоконцентрата, трансдуцированного аденовирусным вектором, несущим

репортерный ген *gfp* (Ad5/35F-GFP), мини-свинье с контузионной травмой спинного мозга, лейкоциты, продуцирующие зеленый флуоресцентный белок, мигрируют в область травматического повреждения спинного мозга и заселяют селезенку.

3. Однократное внутривенное введение аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncaml*, мини-свиньям после повреждения спинного мозга оказывает положительный эффект на динамику неврологического статуса (появление произвольных движений задних конечностей), что согласуется с лучшей сохранностью структуры серого вещества в каудальном отделе спинного мозга.

4. На 56 сутки после внутривенной инфузии аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncaml*, установлен позитивный эффект на регенерацию нервной ткани выше и ниже эпицентра контузионной травмы спинного мозга мини-свиньи, проявляющийся в: 1) сдерживании апоптоза клеток спинного мозга (снижение количества Caspase3-положительных клеток в задних рогах рострального отдела); 2) снижении экспрессии молекул клеточного стресса (уменьшение Hsp27-иммунопозитивной площади) и восстановлении активности нейронов (увеличение синаптофизин-иммунопозитивной площади) в задних рогах каудального отдела; 3) нормализации распределения астроцитов и клеток микроглии в задних рогах рострального и каудального отделов (уменьшение GFAP-позитивной и Iba1-позитивной площади, соответственно), участвующих в развитии астроглиоза; 4) увеличении количества Olig2-позитивных олигодендроглиальных клеток, обеспечивающих миелинизацию нервных отростков в боковых канатиках рострального и каудального отделов; что все вместе свидетельствует о патогенетическом действии рекомбинантных белковых молекул VEGF165, GDNF и NCAM1 на посттравматическое восстановление спинного мозга.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В настоящем исследовании для стимулирования посттравматической регенерации спинного мозга мини-свиньи с контузионной травмой был применен метод клеточно-опосредованной генной терапии путем однократной внутривенной инфузии аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами с нейротрофическим действием (*vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*), в острую фазу. Тот факт, что активная экспрессия терапевтических генов длится не более 3-х недель, а вторичные посттравматические повреждения спинного мозга продолжаются более длительный период, то для поддержания темпов нейрорегенерации может быть целесообразным через определенное время повторное введение аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного терапевтическими генами. При этом, учитывая, что нейровоспаление становится одним из основных патогенетических факторов вторичного повреждения, комбинация терапевтических генов может быть пересмотрена, с целью сдерживания распространения воспалительной реакции в удаленные от эпицентра отделы спинного мозга.

Вместе с тем, результаты исследования служат предпосылкой для дальнейшей разработки и внедрения в практическую медицину безопасного и экономичного подхода к персонализированной прецизионной генной терапии *ex vivo* на основе генетически модифицированных аутологичных лейкоцитов, выделенных из периферической крови пациента. Полученные данные открывают перспективы изучения и последующего применения этого метода клеточно-опосредованной генной терапии не только в клинической неврологии при травмах и ишемии спинного и головного мозга, но и в других областях регенеративной медицины, таких как травматология (стимулирование остео- и хондрогенеза), кардиология (стимулирование регенерации миокарда) и др.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Islamov R.R. The concept of personalized cell mediated gene therapy using gene modified leucoconcentrate (GML) prepared from the patient's peripheral blood / R.R. Islamov, A.A. Izmailov, **M.A. Davleeva** [et al.] // 2019 ASCB Annual Meeting abstracts: Molecular Biology of the Cell.–Washington, DC, 2019.– Vol. 30, Is. 26.– P 2612/ B 872.

2. Патент № 2716013. Способ изготовления средства для клеточно-опосредованной генной терапии и средство для клеточно-опосредованной генной терапии: № 2019116258: заявл. 27.05.2019: опубл. 05.03.2020 / Р.Р. Исламов, М.Е. Соколов, Ф.В. Баширов, В.А. Маркосян, А.А. Измайлов, Ф.О. Фадеев, М.С. Кузнецов, А.Н. Лисюков, И.М. Газизов, Д.Ю. Логунов, И.И. Салафутдинов, М.А. Давлеева, М.М. Шмаров, Б.С. Народицкий, Н.А. Бачерикова, Р.Г. Тураев; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Казанский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации. – 11 с.

3. Влияние клеточно-опосредованной доставки комбинации генов VEGF165, GDNF и NCAM1 на молекулярные и клеточные реакции в спинном мозге свиней с контузионной травмой / М.А. Давлеева, Ф.В. Баширов, А.А. Измайлов [и др.] // Гены и клетки. – 2020. – Т. 15, № 3. – С. 85–91.

4. Измайлов А.А. Клеточно-опосредованная генная терапия с помощью генетически модифицированного лейкоконцентрата для стимулирования нейрорегенерации / А.А. Измайлов, М.Е. Соколов, М.А. Давлеева [и др.] // Гены и клетки. – 2020. – Т. XV, №3. – С.162.

5. Islamov R. R. A simple, safe and effective approach for personalized precision ex vivo gene therapy based on autoinfusion of gene-modified leucoconcentrate (GML) prepared from routine unit of patient's peripheral blood / R.R. Islamov, M.E. Sokolov, **M.A. Davleeva** [et al.] // Blood. – 2020. – Vol. 136, Suppl. 1. – P. 31.

6. Gene-modified leucoconcentrate for personalized ex vivo gene therapy in a mini pig model of moderate spinal cord injury / R.R. Islamov, F.V. Bashirov, M.A. Davleeva [et al.] // Neural Regeneration Research. – 2021. – Vol.16, Is.2. – P.357-361.

7. Гарифулин Р.Р. Влияние аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генетическим материалом, на сохранность белого вещества спинного мозга у свиней с контузионной травмой / Р.Р. Гарифулин, М.А. Давлеева, А.А. Измайлов // VIII Международный молодёжный научный медицинский форум «Белые Цветы»: сборник тезисов. – Казань, 2021. – С.1127.

8. Гарифулин Р.Р. Иммунофлуоресцентное исследование спинного мозга мини-свиней после контузионной травмы на фоне лечения аутологичным лейкоконцентратом, обогащенного генетическим материалом / Р.Р. Гарифулин, А.А. Измайлов, М.А. Давлеева [и др.] // XXVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» – Москва, 2021. – С. 1–2.

9. Патент № 2784233. Фармацевтическая композиция и способ ее использования для терапии повреждений головного и спинного мозга: № 2022102655: заявл. 03.02.2022: опубл. 23.11.2022 / Р.Р. Исламов, М.Е. Соколов, Ф. О. Фадеев, В.А. Маркосян, А.А. Измайлов, М.С. Кузнецов, А.Н. Лисюков, Р.Р. Гарифулин, М.А. Давлеева, З.З. Сафиуллов, Ф.В. Баширов, Д.Н. Щербинин, М.М. Шмаров, Д.Ю. Логунов, Б.С. Народицкий; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Казанский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации. – 34 с.

10. Давлеева М.А. Анализ экспрессии генов тормозной гамкергической системы при моделировании травмы спинного мозга у мини-свиней / М.А. Давлеева, А.А. Измайлов, Р.Р. Гарифулин // IX Международный молодёжный научный медицинский форум «Белые Цветы»: сборник тезисов. – Казань, 2022. – С.921.

11. Molecular and cellular changes in the post-traumatic spinal cord remodeling after autoinfusion of a genetically-enriched leucoconcentrate in a mini-pig model / M.A. Davleeva, R.R. Garifulin, F.V. Bashirov [et al.] // Neural Regeneration Research. – 2023.– Vol.18, Is.7. – P.1505-1511.

12. Гарифулин Р.Р. Восстановление локомоторного аппарата у свиней с контузионной травмой спинного мозга на фоне введения аутологичного лейкоконцентрата обогащенного рекомбинантными генами / Р.Р. Гарифулин, М.А. Давлеева, А.А. Измайлов // XI Международный молодёжный научный медицинский форум «Белые Цветы»: сборник тезисов. – Казань, 2024. – С. 1619-1620.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АТ – антитела

ЗР – задние рога спинного мозга

КС – каудальный сегмент спинного мозга, относительно эпицентра ТСМ

КСТ – кортикоспинальный тракт

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

РС – ростральный сегмент спинного мозга, относительно эпицентра ТСМ

ТСМ – травма спинного мозга

ЭК – каудальный фрагмент эпицентра травмы

ЭР – ростральный фрагмент эпицентра травмы

Ad5/F35 – химерный вектор на базе аденовируса человека 5 серотипа (Ad5) с фибром аденовируса 35 серотипа

GDNF – глиальный нейротрофический фактор (Glial cell line-derived neurotrophic factor)

GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок (Glial Fibrillary Acidic Protein)

GFP – зеленый флуоресцирующий белок (Green Fluorescent Protein)

Hsp – белки теплового шока

Iba1 – ионизированная кальций-связывающая адаптерная молекула 1

NCAM – нейрональная молекула клеточной адгезии (Neural cell adhesion molecule)

PSD95 – белок постсинаптической плотности молекулярной массой 95 кДа

VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста (Vascular endothelial growth factor)