

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «КАЗАНСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ДАВЛЕЕВА МАРИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

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

3.3.3. – Патологическая физиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Исламов Рустем Робертович

Казань – 2026

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	16
1.1 Травма спинного мозга	16
1.1.1 Эпидемиология травмы спинного мозга	16
1.1.2 Патофизиологические и патоморфологические особенности острой фазы TCM	19
1.1.3 Роль клеток глии в патогенезе нейровоспаления	21
1.1.4 Взаимодействие клеток глии при образовании глиального рубца.....	23
1.2 Моделирование травмы спинного мозга.....	24
1.2.1 Модельные животные.....	24
1.2.2 Способы моделирования TCM	27
1.3 Современные методы терапии TCM	29
1.3.1 Декомпрессивно-стабилизирующие хирургические вмешательства	30
1.3.2 Контроль артериального давления	31
1.3.3 Фармакологические препараты	31
1.4 Факторы, влияющие на сохранность и восстановление нервной ткани.....	35
1.4.1 Нейротрофические факторы	35
1.4.2 Молекулы межклеточной адгезии	37
1.4.3 Сосудистые факторы роста	39
1.5 Генная терапия.....	40
1.5.1 Аденоассоциированные вирусы	41
1.5.2 Лентивирусы.....	42
1.5.3 Аденовирусы	44
1.5.4 Невирусные системы доставки рекомбинантных генов	46
1.6 Клеточная терапия.....	47
1.6.1 Эмбриональные стволовые клетки	47
1.6.2 Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.....	48
1.6.3 Нейральные стволовые клетки	49
1.6.4 Шванновские клетки	50

1.6.5	Обонятельные нейроэпителиальные клетки	51
1.6.6	Мезенхимальные стволовые клетки	51
1.6.7	Гемопоэтические стволовые клетки	53
1.6.8	Мононуклеарные клетки пуповинной крови	54
1.6.9	Аутологичные лейкоциты	55
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ		58
2.1	Дизайн эксперимента	58
2.2	Моделирование контузионной травмы спинного мозга	59
2.2.1	Предоперационный период и анестезия	60
2.2.2	Оперативный доступ	60
2.2.3	Контузионная травма	61
2.2.4	Послеоперационный период	61
2.3	Неврологический осмотр	61
2.4	Гистологические методы исследования спинного мозга	62
2.4.1	Приготовление срезов	64
2.4.2	Морфометрический анализ сохранности серого вещества	64
2.4.3	Морфометрический анализ сохранности белого вещества	65
2.4.4	Иммунофлуоресцентное исследование спинного мозга	65
2.5	Приготовление генно-клеточного препарата	68
2.5.1	Получение химерных аденовирусных векторов Ad5/F35	69
2.5.2	Забор крови	71
2.5.3	Получение взвеси аутологичных лейкоцитов (лейкоконцентрата) из периферической крови	71
2.5.4	Трансдукция лейкоцитов химерными аденовирусными векторами	71
2.6	Анализ эффективности экспрессии трансгенов <i>in vitro</i>	72
2.6.1	Изучение эффективности трансдукции лейкоцитов химерным аденовирусным вектором, несущим ген репортерного зеленого флуоресцентного белка <i>gfp</i>	72
2.6.2	Изучение эффективности трансдукции лейкоцитов химерными аденовирусными векторами, несущими терапевтические гены <i>vegfl65</i> , <i>gdnf</i> и	

<i>ncam1</i>	73
2.7 Исследование миграционного потенциала лейкоцитов, трансдуцированных Ad5/F35-GFP, и экспрессии <i>gfp in vivo</i>	74
2.8 Способ применения аутологичных лейкоцитов, трансдуцированных Ad5/35-VEGF165, Ad5/35-GDNF и Ad5/35-NCAM1, для стимулирования посттравматической регенерации спинного мозга у мини-свиней	75
2.9 Статистический анализ	76
ГЛАВА 3 ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СПИННОМ МОЗГЕ ПОСЛЕ НЕЙРОТРАВМЫ У МИНИ-СВИНЕЙ.....	77
3.1 Неврологический статус	77
3.2 Сохранность серого вещества	78
3.3 Сохранность белого вещества.....	78
3.4 Анализ иммунофлуоресцентного окрашивания спинного мозга	81
3.4.1 Маркеры стресса и апоптоза.....	81
3.4.2 Экспрессия синаптических белков.....	84
3.4.3 Реакция клеток нейроглии на травму спинного мозга	87
3.4.4 Сохранность аксонов	91
ГЛАВА 4 СТИМУЛИРОВАНИЕ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ СПИННОГО МОЗГА С ПОМОЩЬЮ АУТОЛОГИЧНОГО ЛЕЙКОКОНЦЕНТРАТА, ОБОГАЩЕННОГО ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМИ ГЕНАМИ С НЕЙРОТРОФИЧЕСКИМ ДЕЙСТВИЕМ	93
4.1 Анализ экспрессии рекомбинантных генов в лейкоцитах мини-свиньи <i>in vitro</i>	93
4.1.1 Общая характеристика лейкоконцентрата, трансдуцированного аденовирусным вектором, несущим репортерный ген зеленого флуоресцентного белка	93
4.1.2 Экспрессия репортерного гена зеленого флуоресцентного белка в лейкоцитах, трансдуцированных Ad5/F35-GFP	94
4.1.3 Общая характеристика лейкоконцентрата, трансдуцированного	

аденовирусными векторами, несущими терапевтические гены <i>vegfl65</i> , <i>gdnf</i> и <i>ncam1</i>	95
4.1.4 Экспрессия рекомбинантных генов <i>vegfl65</i> , <i>gdnf</i> и <i>ncam1</i> в лейкоцитах, трансдуцированных комбинацией аденовирусных векторов Ad5/35-VEGF165, Ad5/35-GDNF и Ad5/35-NCAM1 в равном соотношении	96
4.2 Анализ продукции GFP в аутологичных лейкоцитах <i>in vivo</i> и миграционного потенциала лейкоцитов, продуцирующих зеленый флуоресцентный белок	97
4.3 Посттравматическая регенерация спинного мозга мини-свиней после ТСМ в условиях внутривенного введения аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного терапевтическими генами <i>vegfl65</i> , <i>gdnf</i> и <i>ncam1</i>	98
4.3.1 Неврологический статус	99
4.3.2 Сохранность серого вещества	100
4.3.3 Сохранность белого вещества	100
4.3.4 Иммунофлуоресцентный анализ спинного мозга	100
ГЛАВА 5 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	113
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	122
ВЫВОДЫ	127
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	129
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	130
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	133
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА	161

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Позвоночно-спинномозговая травма является тяжелым повреждением, сочетающим нарушение анатомической целостности позвоночного столба, приводящим к повреждению 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 [79]. В настоящее время ТСМ представляет собой значимую медико-социальную проблему, встречающуюся с высокой частотой во всех регионах мира [7; 220]. При этом, согласно международным исследованиям, в 78% всех случаев ТСМ страдают мужчины [79; 84]. 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 [4].

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 [79]. Для решения указанных проблем необходима разработка новых терапевтических стратегий, нацеленных на стимулирование посттравматической регенерации различных структур спинного мозга в острую фазу [250].

Патогенез ТСМ включает две последовательные стадии в острой фазе. Первая стадия представляет собой непосредственное механическое повреждение, возникающее в момент травмирующего воздействия [198] и проявляющееся гибелью части нейронов и клеток нейроглии, разрушением аксонов, а также повреждением сосудов микроциркуляторного русла с формированием геморрагических очагов [79]. Вторая стадия развивается в посттравматическом

периоде и характеризуется каскадом деструктивных биохимических и патофизиологических реакций, таких как ишемия, эксайтотоксичность, окислительный стресс, воспаление и апоптоз клеток, приводящим к прогрессирующей гибели нейронов и клеток глии в течение длительного времени после первичного повреждения [79; 249]. Знание патофизиологических механизмов вторичного повреждения позволяет осуществлять целенаправленное воздействие на ключевые точки каскада патологических реакций с целью ограничения распространения зоны повреждения и улучшения функциональных исходов ТСМ.

Степень разработанности темы исследования

Среди современных подходов к ограничению развития вторичных повреждений 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, модуляции генерации ионных токов и возбудимости нейронов [155], роста их аксонов [204] и синаптогенеза [234; 189]. В подобных исследованиях уже применяют гамму гуморальных факторов: нейротрофический фактор мозга (BDNF) [124], нейротрофин-3 (NT-3) [176], нейротрофин-4/5 (NT-4/5) [48], фактор роста нервов (NGF) [165], цилиарный нейротрофический фактор (CNTF) [157], фактор роста фибробластов (FGF) [91], глиальный нейротрофический фактор (GDNF) [201], сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) [36], нейрональную молекулу клеточной адгезии (NCAM) [163], которые оказывают стимулирующее действие на посттравматическое восстановление спинного мозга.

В исследованиях последствий спинальной травмы особого внимания заслуживают VEGF, GDNF и NCAM как молекулы с доказанным нейропротекторным и регенеративным потенциалом при повреждении спинного мозга. Использование VEGF, кроме его ангиогенного действия [32; 36], обосновано также его доказанным нейротрофическим эффектом [209] и положительным влиянием на рост аксонов [23]. Глиальный нейротрофический фактор (GDNF),

экспрессируемый как нейронами, так и глиальными клетками [43; 128], проявляет комплексное нейропротекторное действие: стимулирует дифференцировку нейронов, сдерживает апоптоз, повышает выживаемость повреждённых мотонейронов [80; 219], способствует ремиелинизации аксонов [100] и модулирует реактивный астроглиоз, что создаёт благоприятную среду для ограничения распространения вторичного повреждения и роста аксонов [201; 204]. Нейрональная молекула клеточной адгезии (NCAM) обеспечивает не только рост аксонов, но и отвечает за синаптическую пластичность, совокупно обуславливающих формирование новых нейронных сетей, необходимых для функционального восстановления спинного мозга после травмы [234]. Одним из ограничений внедрения в практическую медицину использования биологически активных факторов для стимулирования посттравматической регенерации спинного мозга является таргентный способ их доставки в спинной мозг. В настоящее время наиболее перспективным считают использование вирусных векторов, несущих терапевтические гены с нейротрофическим действием. С этой целью в эксперименте и клинических испытаниях широко применяют аденоассоциированные вирусы, лентивирусы и аденовирусы, каждый из которых обладает характерным профилем ёмкости генетической вставки, эффективности трансдукции, продолжительности экспрессии и иммуногенности.

Доставку вирусных векторов, несущих терапевтический ген, в очаг повреждения спинного мозга можно осуществлять прямым или клеточно-опосредованным способом. Метод прямой (*in vivo*) генной терапии основан на непосредственном введении генетической конструкции в спинной мозг, что обеспечивает экспрессию трансгена в клетках-мишенях на основе тропизма вирусного вектора [199; 252]. Клеточно-опосредованная (*ex vivo*) генная терапия подразумевает доставку генетической конструкции с помощью аутологических или аллогенных клеток, выступающих и как носители трансгенов, и как продуценты рекомбинантных нейротрофических факторов. Такой способ позволяет избежать прямого взаимодействия антигенов вирусного вектора и иммунокомпетентных клеток пациента, а также предполагает экспрессию трансгена исключительно

трансдуцированными *ex vivo* клетками и возможность введения в клетку-носитель более одного трансгена для усиления терапевтического эффекта [20; 44; 101].

Комбинации различных клеточных типов и генетических конструкций привели к созданию множества генно-клеточных систем. В частности, для лечения последствий ТСМ были предложены фибробласты, продуцирующие NGF и NT-3, шванновские клетки, продуцирующие NT-3 и NCAM, клетки-предшественники олигодендроцитов, продуцирующие CNTF, нейральные стволовые клетки, продуцирующие NT-3, мезенхимальные стволовые клетки, продуцирующие BDNF, обкладочные клетки обонятельного эпителия, продуцирующие GDNF [41; 68; 203]. Подобное многообразие предложенных 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 [51; 172; 269]. Генетически модифицированные Т-лимфоциты, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), применяют для лечения онкогематологических заболеваний. Однако разработанный безопасный и эффективный метод персонализированной генной терапии *ex vivo* для лечения ТСМ в клинической практике в настоящее время отсутствует.

Таким образом, применение лейкоцитов периферической крови пациента с ТСМ в качестве носителей комбинации генов-стимуляторов нейрорегенерации рассматривается как перспективная стратегия, способная стать прорывным направлением в генной терапии и дать заметный социальный эффект.

Цель и задачи исследования

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

В соответствии с целью исследования были сформулированы следующие задачи:

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 (*ncaml*), 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 *ncaml*, 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 *ncaml*, 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 сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF) и нейрональную молекулу клеточной адгезии (NCAM), в модели на мини-свиньях с контузионной TCM 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 кровоток 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 исследования

Все эксперименты на животных одобрены на заседании Локального этического комитета Казанского государственного медицинского университета (протокол заседания № 5 от 26 мая 2020 г.). Исследование частично поддержано грантом РФФИ № 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 наших предыдущих работах [172]. Аутологичный лейкоконцентрат, обогащенный генами с нейротрофическим действием, готовили из периферической крови мини-свиньи и химерных 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 РФФИ. Препарат готовили в стандартном гематологическом контейнере с использованием гематологических центрифуг без применения материалов и оборудования для культивирования *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 ремоделировании 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 и апробация работы

Для выполнения поставленных задач в данной работе были использованы современные методы исследования: молекулярно-генетические, иммунофлуоресцентные, морфометрические, гистологические и статистические. Они соответствуют всем критериям, принятым на мировом уровне, для подтверждения достоверности полученных данных. 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); VIII Международном молодежном научном медицинском форуме «Белые цветы» (Казань, 2021); XXVIII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2021); IX Международном молодежном научном

медицинском форуме «Белые цветы» (Казань, 2022), X Международном молодежном научном медицинском форуме «Белые цветы» (Казань, 2023), XI Международном молодежном научном медицинском форуме «Белые цветы» (Казань, 2024), XII Международном молодежном научном медицинском форуме «Белые цветы» (Казань, 2025).

Внедрение результатов исследования

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 из перечня ВАК, 2 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных библиографических базах Scopus и WoS, 2 патента.

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.

Структура и объем диссертационной 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.

ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Травма спинного мозга

Позвоночно-спинномозговая травма с нарушением целостности позвоночного столба, спинного мозга и других структур, находящихся в спинномозговом канале, является одной из наиболее тяжёлых и опасных патологий в нейрохирургии и травматологии [7; 8]. Травматическое повреждение непосредственно спинного мозга приводит к комплексу двигательных, сенсорных и вегетативных расстройств от ограничения подвижности отдельных участков тела до полной парализации, что оказывает существенное негативное воздействие на психоэмоциональное состояние и общее физическое благополучие пациентов, нуждающихся в сложной реабилитации и длительном восстановлении [6; 79]. Существующие методы лечения ТСМ характеризуются ограниченным спектром возможностей и направлены преимущественно на симптоматическую поддержку пациентов с сохраняющейся пожизненной инвалидностью [8; 144; 167].

1.1.1 Эпидемиология травмы спинного мозга

Первые известные упоминания о повреждениях спинного мозга встречаются в древнеегипетском папирусе Эдвина Смита — старейшем медицинском тракте по травматологии, датированном XVII в. до н.э., где травмы спинного мозга признаны неизлечимыми заболеваниями [109].

В современном мире технологический прогресс, способствующий повышению скоростей на транспорте, росту интенсивности промышленного производства, развитию экстремальных видов спорта, является одним из факторов, приводящих к увеличению распространенности ТСМ [8].

Среди патологий опорно-двигательного аппарата доля травматических повреждений спинного мозга составляет 5,5%–17,8%, и в мире их частота варьирует в пределах от 15 до 40 случаев на 1 млн. населения в год, а распространённость составляет 750 случаев на 1 млн. населения [7]. По данным ВОЗ за 2023 год, число пациентов с ТСМ превышает 15 миллионов [220].

Медико-статистические исследования показывают, что за рубежом ТСМ чаще регистрируют у мужчин, что составляет 78% от всех случаев [79; 84]. Средний возраст пациентов на момент получения травмы варьирует в пределах 43 лет, однако при этом отмечают бимодальное распределение с двумя пиками: в подростково-юношеском возрасте и среди лиц пожилого возраста (старше 65 лет) [256]. Основными этиологическими факторами ТСМ являются дорожно-транспортные происшествия (38,6%) и падения с высоты (32,2%). Другие причины включают насильственные действия (14,0%), занятия спортом (7,8%), хирургические вмешательства (4,2%) [79]. Доля детей в общей структуре случаев ТСМ, по данным различных исследований, варьирует от 1% до 5% [6; 183].

В Российской Федерации также отмечают высокую долю ТСМ среди лиц мужского пола в возрасте до 30 лет (более 80%), являющихся наиболее активной и трудоспособной возрастной группой населения [4]. При этом каждый десятый случай протекает с осложнениями, а общая частота ТСМ достигает 90 случаев на миллион жителей в год (в среднем около 13 тысяч случаев), из которых 5,5–6,0 тысяч сопровождаются нижними параплегиями или тетраплегиями [3].

Для оценки тяжести ТСМ широко применяют Международные стандарты неврологической классификации травмы спинного мозга (ISNCSCI, *International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury*), разработанные Американской ассоциацией по травмам позвоночника (ASIA, *American Spinal Injury Association*). Согласно данной классификации, выделяют пять основных типов неврологических нарушений. Тип А характеризуется полной дисфункцией, проявляющейся в тотальной утрате как двигательной, так и чувствительной функций во всех сегментах ниже уровня повреждения. В отличие от полной формы, тип В представляет собой неполную дисфункцию, при которой, несмотря на тотальную потерю двигательной функции, ниже уровня поражения, сохраняется чувствительность. Тип С также представляет собой неполную дисфункцию и определяется как выраженная двигательная недостаточность с невозможностью движений в мышцах против силы тяжести. При типе D наблюдают умеренную двигательную недостаточность. Тип Е характеризует отсутствие двигательных и

чувствительных дефицитов у пациентов с позвоночно-спинномозговой травмой [11; 198].

Анализ распределения типов переломов позвоночника в соответствии с классификацией Ассоциации по изучению применения внутренних фиксаторов в хирургии (AO/ASIF, *Arbeitsgemeinschaft for Osteosynthesefragen / Association for the Study of Internal Fixation*) показывает преобладание компрессионных переломов типа А, составляющих от 54 до 70% всех случаев. Дистракционные переломы типа В, возникающие вследствие дистракционного механизма травмы (растяжения), встречаются в 16% случаев. Оставшиеся случаи (до 18,5%) приходятся на ротационные переломы типа С [11]. Отдельно следует отметить, что в структуре повреждений спинного мозга наиболее распространённым типом являются контузии, чаще всего связанные с тупой механической травмой [198].

Если у взрослых и подростков 90% повреждений локализованы в грудном и поясничном отделах, из которых 68,8% дислоцированы в зоне грудопоясничного перехода, то у детей младшего возраста, напротив, преобладают травмы шейного отдела вследствие особенностей строения позвоночника [7]. Несмотря на преобладание поражений в грудопоясничной области в общей структуре травм позвоночника, наибольшую частоту неврологических нарушений наблюдают при повреждениях шейного отдела, что составляет до 34% всех случаев ТСМ. Для грудного отдела этот показатель составляет 26%, для поясничного – 19% [11].

Таким образом, ТСМ представляет собой значимую медико-социальную проблему, характеризующуюся высокой частотой и распространенностью в мире. Доминирование травм спинного мозга среди мужчин молодого и трудоспособного возраста объясняется высокой долей случаев, связанных с дорожно-транспортными происшествиями и падениями. В клинической практике наиболее частым типом повреждения спинного мозга является контузия. При этом в структуре переломов позвоночника преобладают повреждения грудопоясничного перехода, однако наибольшая частота неврологических дефицитов отмечается при травмах шейного отдела.

1.1.2 Патолофизиологические и патоморфологические особенности острой фазы ТСМ

Острая фаза спинальной травмы протекает в две стадии и продолжается до 2 недель. Первая стадия острой фазы ТСМ начинается сразу после механического воздействия на спинной мозг [198]. В эту стадию возникают первичные повреждения, включающие в себя разрывы ткани мозга и сосудов, некротическую гибель нейронов и глиальных клеток в результате размозжения под действием костных отломков [79]. Первичное механическое повреждение гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) с нарушением его целостности обуславливает проникновение осмотически активных веществ в ткань спинного мозга и развитие вазогенного отека в зоне повреждения. Немедленным результатом этих событий является отёк, приводящий к повышению механического давления в ограниченном пространстве позвоночного канала и смещению структур спинного мозга, что дополнительно усугубляет ишемию нервной ткани [115; 138].

Снижение кровоснабжения в области повреждения приводит к дефициту кислорода и глюкозы для нейронов и глиальных клеток, создавая условия для инициации вторичного повреждения [267]. В первые два часа после травмы отмечают массовую гибель нейронов и глиальных клеток [79]. Гибель клеток, начавшаяся в эпицентре повреждения, постепенно распространяется и на периферические зоны. В результате происходит разрушение центрально расположенного серого вещества с последующей частичной или полной дегенерацией прилежащих проводящих трактов белого вещества [46; 115]. При этом структуры спинного мозга демонстрируют различную устойчивость к ишемическому повреждению: если серое вещество претерпевает необратимые изменения уже в течение первого часа после травмы, то белое вещество сохраняет жизнеспособность до 72 часов [198].

Вторая стадия острой фазы характеризуется развитием каскада деструктивных биохимических и патофизиологических реакций в нейронах и глиальных клетках, которые усугубляют дисфункцию спинного мозга и приводят к прогрессирующей гибели клеток в течение нескольких часов, дней или недель

после первичного повреждения [249]. В период вторичного повреждения развиваются воспаление, отек и кровоизлияние, обусловленные комплексом патогенетических механизмов, а именно образованием свободных радикалов, ионной дисрегуляцией, эксайтотоксичностью, иммунологической нейротоксичностью и прогрессирующим нарушением микроциркуляции. Эти механизмы способствуют расширению зоны первичного повреждения [79].

В отличие от локализованного первичного повреждения, вторичный патологический процесс распространяется как в ростральном, так и в каудальном направлении относительно эпицентра травмы, вызывая структурные и функциональные нарушения вдоль значительного протяжения спинного мозга [115; 249].

Одновременно в острую фазу развивается спинальный шок, характеризующийся комплексом неврологических нарушений ниже уровня повреждения, включающих сенсорную потерю, вялый паралич, отсутствие глубоких сухожильных рефлексов, угнетение соматической рефлекторной активности и нарушение терморегуляции [127].

Фагоциты, проникшие в результате нарушения целостности ГЭБ, активно поглощают клеточный детрит в очаге поражения, выделяя при этом комплекс токсичных активных форм кислорода (АФК), повреждающих нервную ткань. В ответ начинается реактивная пролиферация резидентных глиальных клеток, включая астроциты и микроглию, что в последующем приводит к формированию глиального рубца и прогрессированию воспалительной реакции с нарушением ионного гомеостаза [79; 198; 221]. Эти патофизиологические процессы создают неблагоприятные условия для регенерации аксонов и процессов их миелинизации [47].

Промежуточная фаза ТСМ начинается по истечении двух недель после повреждения и длится до шести месяцев. Она характеризуется активным созреванием глиального рубца, распространением нейровоспаления в ростральном и каудальном направлениях, а также временем начала регенерации аксонов [198].

Хроническая фаза развивается, в среднем, через шесть месяцев после травмы

и сохраняется в течение всей жизни пациента. Её отличает распространение нейровоспаления в удаленные от эпицентра повреждения отделы спинного мозга, рубцевание нервной ткани и образование кистозных полостей [47; 221].

1.1.3 Роль клеток глии в патогенезе нейровоспаления

В области нейровоспаления присутствуют два функциональных фенотипа астроцитов: нейротоксичные астроциты A1 (A1-астроциты) и нейропротективные астроциты A2 (A2-астроциты). Астроциты фенотипа A1 секретируют растворимые нейротоксичные факторы (медиаторы апоптоза, например, насыщенные липиды), индуцирующие гибель нейронов и клеток нейроглии [134].

Активированная микроглия играет ключевую роль в индукции нейротоксичного фенотипа астроцитов A1 [170]. Данный процесс опосредован секрецией микроглией ряда провоспалительных медиаторов: интерлейкин-1 α (IL-1 α), фактора некроза опухоли α (TNF- α) и компонента комплемента C1q. Эти цитокины запускают каскад внутриклеточных сигналов в астроцитах, включая активацию транскрипционного фактора NF- κ B (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* – Ядерный фактор, усиливающий экспрессию каппа-легкой цепи иммуноглобулинов в активированных В-лимфоцитах), что приводит к их трансформации в фенотип A1 [188]. Активацию сигнального пути NF- κ B рассматривают как центральное звено патологического каскада при нейровоспалении, тогда как его подавление замедляет прогрессирование заболевания [71]. При травматическом повреждении спинного мозга активируется сигнальный путь JAK/STAT3 (*Janus kinase Signal Transducer and Activator of Transcription* – Сигнальный путь янус-киназы трансдуктора сигналов и активатора транскрипции 3), что запускает пролиферацию астроцитов и формирование глиального рубца. Данный процесс сопровождается значительное повышение экспрессии глиального фибриллярного кислого белка GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein* – Глиальный фибриллярный кислый белок), виментина и провоспалительного цитокина интерлейкин-1 β (IL-1 β). В результате астроциты начинают секретировать факторы, ингибирующие рост аксонов и препятствующие

функциональному восстановлению нервной ткани [146].

S.A. Liddelow с соавт. (2017) установили, что астроциты фенотипа A2 регулируют экспрессию ряда нейротрофических факторов, противовоспалительных цитокинов и трансформирующего ростового фактора- β (TGF- β – *Transforming Growth Factor β*). Данные молекулы способствуют выживанию нейронов и регенерации аксонов, что определяет нейропротективную роль A2-астроцитов [170].

При ТСМ олигодендроциты подвергаются как некрозу, так и апоптозу. Гибель этих клеток индуцирует повышение уровня глутамата, что приводит к усилению внутриклеточного притока ионов Ca^{2+} [47]. Дополнительным фактором, запускающим апоптоз олигодендроцитов служит активация микроглии и инфильтрация нейтрофилами, сопровождающаяся генерацией токсичных АФК, высвобождением провоспалительных цитокинов, включая TNF, IL-2, интерферон- γ (IFN- γ), и протеолитических ферментов [179]. В результате апоптоза олигодендроцитов происходит демиелинизация аксонов, что приводит к утрате их функциональной активности и структурной целостности [148; 179]. Важно отметить пролонгированный характер гибели олигодендроцитов, подтверждённый исследованиями на крысах с контузионной моделью ТСМ, в которых апоптоз этих клеток продолжался не менее трех недель после травмы [35]. При этом большее количество погибающих олигодендроцитов фиксировали в дегенерирующих проводящих путях как проксимальнее, так и дистальнее эпицентра повреждения.

Травма спинного мозга активирует резидентную микроглию, приобретающую поляризованные функциональные фенотипы, условно обозначаемые как M1 (классический) и M2 (селективный). Трансформацию покоящейся микроглии в состояние, сходное с фенотипом M1, индуцируют провоспалительные факторы, например, IFN- γ [64; 180]. Клетки с фенотипом M1 часто демонстрируют гиперактивацию, что усиливает нейровоспаление, способствует гибели нейронов и олигодендроцитов и усугубляет вторичное повреждение тканей. В противоположность этому, микроглия с фенотипом M2 играет ключевую роль в процессах сдерживания воспаления и восстановления

нервной ткани [246]. Фенотип M2 микроглии включает подтипы M2a, M2b и M2c, активация которых происходит под воздействием цитокинов, включая интерлейкин-10 (IL-10), интерлейкин-4 (IL-4) и TNF- β [64].

1.1.4 Взаимодействие клеток глии при образовании глиального рубца

Механическое повреждение нервной ткани сопровождается гибелью клеток и нарушением целостности ГЭБ, что создает условия для активной инфильтрации травмированного участка клетками периферической крови [228]. Нейтрофилы являются первыми фагоцитами, проникающими в очаг повреждения. Несмотря на преобладающую провоспалительную роль, нейтрофилы могут способствовать ограничению повреждения путем секреции ингибиторов лейкоцитарных протеаз [166], а также ангиогенных факторов, стимулирующих васкуляризацию поврежденной ткани [95]. Макрофаги, представляют собой следующую популяцию фагоцитов, мигрирующую в очаг повреждения под влиянием аттрактантов, высвобождаемых нейтрофилами и погибающими клетками нервной ткани [142]. Для участия в регенерации к эпицентру повреждения также мигрируют предшественники олигодендроглиальных клеток, секретирующие нейронально-глиальный антиген 2 (NG2-OPC). Астроциты остаются за пределами эпицентра повреждения [47].

Своего пика пролиферация астроцитов, активируемых цитокинами фагоцитов и микроглией, достигает через 3-7 суток с момента нейротравмы. Активированные астроциты мигрируют к границе повреждения, удлиняются перпендикулярно ядру поражения и формируют реактивный глиальный рубец [63]. К 14-м суткам пролиферация астроцитов практически прекращается, а через несколько недель глиальный рубец полностью созревает, создавая механический и молекулярный барьер на границе с неповрежденной нервной тканью, препятствующий также прорастанию аксонов [83].

Исследование J.E. Herrmann с соавт. (2008) на крысах с TCM продемонстрировало, что подавление формирования глиального рубца приводит к усилению распространения воспаления [224]. Существует значительный пул

данных, свидетельствующих о том, что реактивный глиоз является защитным механизмом, предназначенным для локализации и восстановления поврежденного участка путем его изоляции [47; 63; 83]. Следствием отсутствия образования глиального рубца является расширение зоны вторичного повреждения, увеличение гибели нейронов и усугубление сенсомоторных дефицитов [221].

Таким образом место повреждения можно разделить на три области: центрально расположенный фиброзный рубец, окружающий его астроглиальный рубец и периферические зоны поражения с сохраненной жизнеспособной реактивной тканью [253]. В состав центральной зоны фиброзного рубца входят стромальные клетки, менингеальные фибробласты и перициты. Также сформировавшийся очаг характеризуется наличием новообразованных кровеносных сосудов, макрофагов, нейтрофилов, лимфоцитов [93]. Толщина астроцитарного рубца составляет всего несколько клеточных слоев астроцитов. По краям рубца астроциты взаимодействуют с реактивными NG2-OPC [63]. Жизнеспособные области, окружающие астроцитарный рубец, сохраняют нормальную физиологию и представлены гетерогенной популяцией клеток, включая реактивные астроциты, активированную микроглию, NG2-OPC и олигодендроциты [253].

1.2 Моделирование травмы спинного мозга

1.2.1 Модельные животные

С начала XX века было разработано множество экспериментальных моделей ТСМ, имитирующих широкий спектр повреждений: от частичного или полного пересечения спинного мозга до контузий различной степени тяжести, а также компрессионного сдавления [39; 102; 208]. Исследования травм спинного мозга проводили с использованием различных модельных организмов, включая млекопитающих, амфибий и рыб. Преимущества и недостатки каждой модели ТСМ зависят от уникальных для каждого вида особенностей анатомии и физиологии спинного мозга, скорости нейрорегенерации, а также соотношения областей некроза и ишемии [38].

Согласно систематическому обзору М.Е. Filipp с соавт. (2019), охватывающему научные публикации за 72-летний период (1946–2018 гг.), лабораторные грызуны занимают доминирующее положение в качестве экспериментальных моделей ТСМ, составляя более 87% от общего числа животных [69]. Их популярность обусловлена, прежде всего, их небольшим размером, низкой стоимостью, хорошо изученным геномом и валидированными шкалами оценки функционального восстановления [39; 88; 126]. Однако существенные различия в организации спинного мозга у грызунов, его кровоснабжении, размерах позвоночного столба и известной способности к самостоятельному восстановлению после ТСМ, во многом ограничивают трансляцию результатов подобных исследований на организм человека [126]. В частности, кортикоспинальный тракт — основной нисходящий двигательный путь, располагающийся в дорсальной области у крыс, у человека он расположен в латеральной и передней части спинного мозга [69]. Кроме того, значительную роль в функциональном восстановлении у грызунов играет руброспинальный тракт. У человека вклад данного тракта ограничен вследствие его редукции в ходе эволюции при переходе к прямохождению [38].

Морфологический анализ хронического очага повреждения у человека демонстрирует меньшее количество реактивных астроцитов по сравнению с грызунами [31]. Снижение выраженности астроглиоза может разносторонне влиять на долгосрочное восстановление. С одной стороны он способствует регенерации аксонов, а с другой — провоцирует формирование aberrантных синаптических связей, что может иметь неблагоприятные последствия [69]. Важным, однако часто недооцениваемым фактором, объясняющим трудности трансляции, является различие в темпе биологических процессов. Если отдельные биохимические реакции (например, ферментативная кинетика) могут протекать с сопоставимой скоростью, то сложные физиологические явления, такие как метаболизм, регенерация и продолжительность жизни, характеризуются принципиально разными временными масштабами у грызунов и человека [31]. По этой причине многообещающие результаты, полученные в ходе доклинических исследований на

грызунах, часто не подтверждают клинические испытания у пациентов с ТСМ [31; 59; 193].

Исследования по моделированию травм спинного мозга у крупных животных в доступной литературе представлены в меньшем объеме. Впервые модель травмы спинного мозга у свиней была разработана в 1996 году, через 85 лет после того, как A.R. Allen (1911) разработал модель ТСМ на собаках [105]. В настоящее время модели ТСМ на свиньях являются перспективными промежуточными моделями для трансляции экспериментальных исследований в клинику. Указанное обусловлено схожестью спинного мозга свиней и человека по размеру, высоте позвоночного столба и системе кровообращения [66; 168; 192]. А. Тоосси и др. (2021) провели сравнительный анализ анатомических особенностей пояснично-крестцового отдела спинного мозга человека и свиньи, а также ряда других животных, включая крыс, макак-резусов и кошек [62]. Они установили, что свиньи обладают большим числом общих анатомических характеристик с человеком по сравнению с другими видами. В частности, это касается длины пояснично-крестцового утолщения, площади поперечного сечения спинного мозга и морфологии центрального серого вещества [195]. Кроме того, увеличенная длина спинного мозга, характерная для свиней, создает благоприятные условия для исследования регенерации аксонов на расстояниях, сопоставимых с наблюдаемыми у человека. Данный фактор имеет важное значение для оценки возможности переноса биоинженерных методов лечения ТСМ в клиническую практику [37; 190]. Важным анатомическим сходством служит расположение кортикоспинального тракта. У свиней, как и у человека, он проходит латеральнее центрального серого вещества [136]. Аналогичное соответствие имеет место в организации сенсорных путей. Ноцицептивные нейроны у свиней проходят через вентролатеральную часть спинного мозга, что схоже с расположением переднего и латерального спиноталамических трактов у человека [191]. Кроме того, М.А. Skinnider и др. (2021) с помощью протеомного анализа показали 80% сходство молекулярных изменений в ответ на ТСМ в ликворе и сыворотке свиней и людей [194]. Как было отмечено ранее, значительное сходство в строении сосудистой системы спинного

мозга свиней и человека, модель ТСМ на свиньях является более адекватной в изучении процессов, происходящих в острую и хроническую стадии повреждения [190]. В целом ряде исследований на свиньях был получен большой объём поведенческих, электрофизиологических, гистологических данных, подтверждающих целесообразность изучения эффективности новых методов лечения при моделировании ТСМ у этих животных [61; 116; 191].

В то же время эти пионерские исследования были проведены на домашних свиньях, чей вес нередко превышал 200 кг, что создает серьезные трудности при моделировании травм спинного мозга [191; 192]. В связи с этим в более поздних работах все чаще стали моделировать ТСМ у мини-свиней. Их компактные габариты и уравновешенный характер облегчают условия содержания и выполнение экспериментальных процедур, а также обеспечивают более точное моделирование биомеханических свойств человеческого позвоночника [20; 61].

1.2.2 Способы моделирования ТСМ

Экспериментальные модели травмы спинного мозга разделяют на контузионные, компрессионные и трансекционные. Согласно данным литературы, наиболее широкое распространение получили контузионные модели ТСМ, тогда как к трансекционным и компрессионным прибегают значительно реже [39]. Несмотря на то, что шейный отдел является наиболее частым местом повреждения спинного мозга у человека [84], в большинстве исследований ТСМ воспроизводят в грудном отделе животных (81%), так как такие модели считаются наиболее надежными и воспроизводимыми [39; 191].

Впервые контузионная модель была предложена A.R. Allen (1911). В его эксперименте на собаке использовали груз, падающий с заданной высоты на дорсальную поверхность твердой мозговой оболочки. Современные протоколы создания контузионных моделей ТСМ в основном представляют усовершенствованную версию оригинальной методики [38]. С помощью контузионных моделей можно создавать ТСМ различной степени тяжести и комплексом патологических изменений, включающих воспаление, ишемию,

геморрагический некроз. Наибольшей популярностью среди устройств для моделирования контузионной модели являются Weight Drop, использующийся в 37,5% случаев, NYU impactor (27,4%), впервые разработанный доктором Gruner в 1992 году в Медицинском центре Нью-Йоркского университета [102], а также Horizon impactor (20.6%), коммерческое устройство, разработанное в начале 2000-х годов [87]. Благодаря электромагнитному приводу, импакторы Infinite horizon обеспечивают более точное и надежное моделирование TCM, чем импактор Нью-Йоркского университета (NYU), который, тем не менее, прост в использовании [39]. Недавний систематический обзор показал, что в 70% исследований TCM на свиньях моделировали контузионную травму, при этом в 43% случаев использовали комбинацию удара с последующей компрессией, в 16% — только метод сброса груза, а в 11% — модифицированные компьютеризированные ударные устройства [190].

Компрессионные спинальные травмы являются вторым по частоте применения способом моделирования TCM у свиней [190]. Разработанные методики позволяют воссоздать стойкую окклюзию спинномозгового канала, наблюдаемую при TCM у человека, что важно для анализа последствий компрессии и определения оптимальных сроков проведения декомпрессионных мероприятий. Устройствами для создания компрессионной модели служат раздуваемые баллоны, сосудистые зажимы, компрессионные щипцы, винтовые устройства либо распорочные системы [38]. Часто используемым устройством является аневризматическая клипса, приводящая к ишемии и имитирующая повреждение спинного мозга [208].

Трансекционные модели травмы спинного мозга подходят для изучения влияния различных биоматериалов и нейротрофических факторов на TCM, а также для исследований регенерации, дегенерации и нейропластичности [38]. Полное или частичное пересечение спинного мозга проводят в зависимости от целей исследования [160]. После ламинэктомии у лабораторных животных перерезку спинного мозга выполняют с использованием специализированных хирургических инструментов. Данный подход позволяет избирательно разрушать определенные

проводящие пути, включая двигательные (кортикоспинальный и руброспинальный тракты) и сенсорные (дорсальные столбы), а также осуществлять полное пересечение спинного мозга [39].

В моделях острой ТСМ пересечение выполняют на разных уровнях мозга, чтобы исключить влияние вышележащих отделов мозга, к примеру пересечение на уровнях Th7–Th9 и Th12 проводят при изучении активации нейронных сетей поясничного отдела мозга. При моделировании хронической ТСМ на крысах применяют различные хирургические подходы, включая полное пересечение спинного мозга на уровне грудного отдела Th7–Th8, правую латеральную гемисекцию на уровне шейного отдела C7, а также латеральные гемисекции, производимые на противоположных сторонах спинного мозга на уровнях Th7 и Th10 [38]. В экспериментальных исследованиях на грызунах гемисекция и полное пересечение спинного мозга являются распространенными методами, в то время как в моделях на свиньях использование данных техник проводят значительно реже [207].

Основываясь на существующих медико-статистических данных и причинах возникновения ТСМ, наиболее перспективными для дальнейших исследований и разработки методов лечения являются модели, имитирующие тупую травму, что соответствует контузионной травме спинного мозга [69].

1.3 Современные методы терапии ТСМ

В настоящее время подходы к лечению острой ТСМ включают раннюю хирургическую декомпрессию, использование вазопрессорных средств для поддержания адекватной перфузии спинного мозга посредством повышения среднего артериального давления (САД), внутривенное введение высоких доз кортикостероидов, противовоспалительную терапию в острой фазе и неврологическую реабилитационную терапию в хронической фазе [7; 8; 13; 122; 250].

1.3.1 Декомпрессивно-стабилизирующие хирургические вмешательства

Общепринятые подходы к лечению осложненных травм позвоночника в качестве первоначального этапа обычно включают комбинированные декомпрессивно-стабилизирующие хирургические вмешательства [1; 22; 74; 259]. Независимо от механизма травмы, вызванного отломками позвонков или деформацией позвоночного канала, декомпрессия спинного мозга является необходимым условием для восстановления нервной ткани [75]. Как было продемонстрировано в многочисленных экспериментальных и клинических исследованиях, время проведения декомпрессии нервных структур является критически важным фактором, определяющим степень восстановления функций спинного мозга: чем раньше проведена декомпрессия, тем выше шансы на восстановление [74; 117; 227; 263]. В 2012 году были опубликованы результаты проспективного многоцентрового исследования STASCIS (Surgical Timing in Acute Spinal Cord Injury Study – Исследование сроков хирургического вмешательства при острой травме спинного мозга), в котором оценивали 6-месячные клинические исходы у пациентов с острой травмой шейного отдела спинного мозга, подвергшихся раннему хирургическому вмешательству в течение первых 24 часов после травмы либо вмешательству, выполненному позднее первых суток [75]. Анализ результатов выявил статистически значимое улучшение неврологического статуса через 6 месяцев у пациентов, подвергшихся ранней хирургической декомпрессии, по сравнению с группой пациентов, которым декомпрессивная операция была выполнена в более поздние сроки [79]. На основании полученных данных значительная часть исследователей придерживается мнения о целесообразности выполнения декомпрессивной операции в течение первых 24 часов с момента травмы [22; 227; 251]. Вместе с тем в научной литературе предметом дискуссии остается стратегия ультрараннего хирургического вмешательства, проводимого в первые 8 часов после получения травмы. Результаты лечения пациентов, подвергшихся хирургической декомпрессии в первые 8 часов после случая ТСМ, продемонстрировали более высокие показатели неврологического восстановления в отдаленном периоде [74; 244]. Однако

сравнительный анализ, проведенный G. Mattiassich и др. (2017), не выявил достоверного преимущества ультраранней хирургической декомпрессии (менее 5 часов) перед ранней операцией (5–24 часа) по критерию восстановления неврологических функций [97].

1.3.2 Контроль артериального давления

Контроль артериального давления имеет ключевое значение при острой ТСМ, так как гипотония является фактором, приводящим к неблагоприятным исходам [14]. Однако убедительных доказательств того, что повышение среднего артериального давления (САД) ведет к улучшению результатов, пока недостаточно [72; 114; 243]. Несмотря на ограниченность доказательной базы, на основании совокупности данных, включающих результаты перспективных и ретроспективных исследований, эксперты AANS/CNS в редакциях 2002 и 2013 годов сформулировали рекомендации по поддержанию гемодинамической стабильности у пациентов с ТСМ, предусматривающие избежание гипотонии и поддержание САД на уровне не менее 85–90 мм рт. ст. [13; 103]. Таким образом, на сегодняшний день поддержание САД выше 85 мм рт. ст. является общепринятым стандартом лечения травмы спинного мозга [14]. Для повышения артериального давления при ТСМ обычно применяют норадреналин, благодаря его комбинированному α - и β -адренергическому действию. Согласно данным F. Streijger с соавт. (2018) применение норадреналина при ТСМ увеличивает кровоток в спинном мозге и парциальное давление кислорода в артериальной крови (PaO_2) по сравнению с фенилэфрином [16].

1.3.3 Фармакологические препараты

1.3.3.1 Кортикостероиды

Применение кортикостероидов при острой ТСМ до сих пор остается предметом дискуссии [50; 53; 130; 150]. Изначально стероиды привлекли к себе внимание на основании предположения, что их противовоспалительное действие будет способствовать выживанию клеток за счёт ограничения вторичного

воспалительного повреждения, подавляя образование свободных радикалов и последующего перекисного окисления липидов [8; 130]. Несмотря на первоначальные признаки эффективности, последующие многочисленные исследования не подтвердили пользу от применения стероидов [90; 108; 248]. Эффективность данной группы препаратов оценивалась в серии клинических исследований, посвященных острой травме спинного мозга NASCIS (National Acute Spinal Cord Injury Study – Национальное исследование острой травмы спинного мозга). Согласно данным, полученным в рамках первичного анализа исследования, терапия высокими дозами кортикостероидов не приводила к клинически значимой положительной динамике исходов у пациентов с острой ТСМ [21]. Вместе с тем вторичный анализ продемонстрировал умеренное улучшение двигательных функций при назначении метилпреднизолона в первые 8 часов после травмы. Однако это преимущество сопровождалось серьезными побочными эффектами, связанными с применением высоких доз кортикостероидов [151]. Важно отметить, что более короткий (24-часовой) курс высоких доз стероидов был связан с меньшим количеством осложнений по сравнению с 48-часовой терапией [130]. К числу серьезных нежелательных явлений также можно отнести повышенную вероятность развития раневых инфекций, желудочно-кишечных кровотечений, тромбоэмболий лёгочной артерии и даже смерти. Учитывая эти риски, решение об их назначении следует принимать с осторожностью. В то время как руководство AANS/CNS не рекомендует применение стероидов после ТСМ из-за отсутствия убедительных доказательств [185], в то же время рекомендации AOSpine (Международное сообщество, занимающееся исследованиями в области ухода за позвоночником) допускают возможность 24-часовой инфузии высоких доз метилпреднизолона, начатой в течение первых 8 часов после травмы [15]. Таким образом, эффективность стероидов при острой ТСМ остается предметом дискуссий, поскольку отсутствуют убедительные доказательства в поддержку их применения [130].

1.3.3.2 Ингибиторы циклооксигеназы

Наряду с кортикостероидами в экспериментальных исследованиях острой

ТСМ изучали возможность применения нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВС), обладающих выраженным противовоспалительным действием. Проведенные исследования показали, что НПВС оказывают благоприятное воздействие на зону повреждения нервной ткани, проявляющееся в снижении воспалительной реакции, уменьшении отека, подавлении активности микроглии, снижении интенсивности процессов перекисного окисления липидов [112; 214]. Эффективность НПВС в лечении ТСМ, скорее всего, связана с их способностью подавлять активность белка Rho-A (*Ras homologous family member A* – Член семейства гомологов белка Ras, тип A). В работе M. J. Lambrechts и др. (2021) на животной модели ТСМ было продемонстрировано, что терапия НПВС улучшала показатели двигательной функции и стимулировала прорастание аксонов в поврежденном сегменте спинного мозга [129]. Основной проблемой при применении НПВС является определение оптимальных дозировок. Важно отметить, что дозы, продемонстрировавшие эффективность в доклинических исследованиях, в 5–7 раз превышают дозы, считающиеся безопасными для человека. Более того, несмотря на предполагаемые противовоспалительные свойства, эффективность НПВС в отношении предотвращения вторичного повреждения спинного мозга не была однозначно продемонстрирована в ряде исследований [60; 129; 200]. Поэтому вопрос о целесообразности применения НПВС и выборе эффективной и безопасной дозы при ТСМ до сих пор остается нерешенным [8].

1.3.3.3 Нейропротекторные препараты

Определенные перспективы в лечении ТСМ имеет назначение антибиотика тетрациклинового ряда миноциклина, так как препарат легко проникает через гематоэнцефалический барьер [73; 206] и проявляет нейропротекторную, противовоспалительную, антиоксидантную и антиапоптотическую активности [89; 217]. Результаты клинических исследований показали, что применение миноциклина способствовало улучшению исходов лечения у пациентов с острой неполной ТСМ шейной локализации [25; 73]. Помимо подтверждения безопасности

и целесообразности назначения миноциклина, в этих исследованиях была продемонстрирована тенденция к восстановлению двигательных функций, в частности у пациентов с тетраплегией. В целом, миноциклин имеет определенный потенциал в лечении травмы спинного мозга благодаря своему многостороннему механизму действия. Однако окончательная оценка эффективности и определение оптимального режима применения миноциклина в терапии ТСМ требует дополнительного, более тщательно проработанного изучения [228].

Экспериментальные исследования на животных моделях травмы спинного мозга эффективности ганглиозидов выявили их способность к стимулированию нейрорегенерации и функциональному восстановлению нервной системы [54]. Однако, несмотря на перспективные доклинические данные, клинические испытания не подтвердили аналогичные терапевтические эффекты у человека [144]. Систематический обзор, опубликованный в базе данных Cochrane, выявил существенные недостатки в методологии исследований ганглиозидов при ТСМ [54] и заключил, что нет достаточных доказательств их эффективности для снижения смертности или улучшения качества жизни. Поэтому до настоящего времени сведения о каких-либо новых исследованиях с применением ганглиозидов неизвестны [228].

В поисках альтернативных нейропротекторных препаратов с более обоснованным механизмом действия внимание исследователей привлек рилузол, применяемый для лечения бокового амиотрофического склероза. Его нейропротекторное действие обусловлено способностью ингибировать избыточную глутаматергическую передачу в нейронах за счет блокирования натриевых каналов [144]. Препарат обладает потенциалом для снижения апоптоза нейронов в острой фазе после травмы спинного мозга, что подтверждается обнадеживающими результатами, полученными в доклинических испытаниях на моделях ТСМ [162; 245]. Ожидается, что результаты текущего многоцентрового контролируемого исследования фазы II под названием «Рилузол в исследовании травм спинного мозга» (RISCIS, *Riluzole in Acute Spinal Cord Injury Study*) позволят дать официальные рекомендации по применению рилузола в лечении ТСМ в острой

фазе [196].

Таким образом, анализ существующих фармакологических подходов свидетельствует об отсутствии на сегодняшний день препаратов с доказанной высокой эффективностью для лечения спинной травмы. Следовательно, ни одна из рассмотренных групп лекарственных средств не может быть рекомендована в качестве стандарта терапии, гарантирующего нейропротекцию и значимое функциональное восстановление после ТСМ. Ограниченная эффективность существующих фармакологических препаратов лечения, не способных обеспечить восстановление утраченных неврологических функций, обуславливает актуальность поиска принципиально новых лекарственных средств для терапии ТСМ [222; 250].

1.4 Факторы, влияющие на сохранность и восстановление нервной ткани

Известно, что нейротрофические факторы играют ключевую роль не только в развитии нервной системы и поддержании гомеостаза зрелых нейронов, но и выступают в качестве основных медиаторов нейропластичности после повреждения нервной ткани [68; 82; 209; 232]. Многообразные функции этих молекул включают в себя регуляцию ионных каналов и нейронной возбудимости [155], участие в синаптической пластичности [189], стимулирование регенерации аксонов [204] и синаптогенеза [234]. По мере того, как исследования в области нейропротекции и нейрорегенерации, опосредованной нейротрофическими факторами, совершенствуются и достигают полного понимания взаимосвязанных механизмов, открываются новые возможности для создания нейрорегенеративных терапевтических подходов с помощью нейротрофических факторов [81].

1.4.1 Нейротрофические факторы

Среди экзогенных нейротрофических факторов, применяемых в настоящее время для лечения ТСМ в доклинических исследованиях наиболее распространены мозговой нейротрофический фактор (BDNF), нейротрофин-3 (NT-3), нейротрофин-

4/5 (NT-4/5), фактор роста нервов (NGF), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), фактор роста фибробластов (FGF), и глиальный нейротрофический фактор (GDNF). Показано, что они повышают выживаемость нервных клеток, стимулируют рост аксонов и способствуют функциональному восстановлению после TCM [81; 171; 232].

Фактор BDNF оказывает нейропротекторными свойствами, способствуя регенерации и восстановлению поврежденных аксонов в спинном мозге, а также участвует в процессе ремиелинизации [94; 113; 124; 157]. Показано, что доставка BDNF в место повреждения после TCM может способствовать функциональному восстановлению. S. Han с соавт. (2014) продемонстрировали значительное улучшение регенерации аксонов кортикоспинального тракта при длительном введении BDNF [240]. Y. Li и др. (2020) использовали генно-модифицированные мезенхимальные стволовые клетки, экспрессирующие BDNF у крыс с острой TCM. Их введение приводило к повышению выживаемости нейронов и восстановлению двигательной функции ниже уровня повреждения, что свидетельствует о защитном действии BDNF на мотонейроны передних рогов спинного мозга [110].

Другим эффективным фактором, способствующим выживанию и функциональному восстановлению нейронов после TCM, признан нейротрофин [174; 176; 202; 232]. J. Ye и др. (2020) на крысах с экспериментальной TCM установили, что NT-3 может ингибировать сигнальный путь MAPK, тем самым способствуя посттравматическому восстановлению спинного мозга [77]. Согласно исследованиям A. Blesch и др. (2004) клеточно-опосредованная доставка NT-4 индуцирует рост аксонов у крыс после дорсальной гемисекции спинного мозга в грудном отделе [48].

Нейропротекторный эффект ростового фактора NGF обусловлен его связыванием с рецепторами TrkA и p75 NTR, что запускает сигнальные каскады, поддерживающие дифференцировку и выживание нейронов [165]. Применение NGF в моделях TCM на мышах с использованием различных методов доставки приводило к улучшению выживаемости нейронов, росту аксонов, снижению апоптоза, сохранению паренхимы мозга, уменьшению образования кистозных

полостей и астроглиоза, а также к лучшему восстановлению двигательной функции [24; 156; 164].

Фактор роста фибробластов FGF облегчает выживание центральных и периферических нейронов за счет ингибирования апоптоза в месте повреждения и поддержания стабильного уровня ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} [92]. Согласно исследованию Y. Goldshmit с соавт (2014)., введение FGF взрослым мышам после TCM приводило к снижению активации микроглии и макрофагов, а также подавляло выраженность воспалительного ответа в месте повреждения [91]. Также установлено, что цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), экспрессируемый в реактивных астроцитах, формирующихся после TCM, вводимый совместно с FGF модулируют процессы формирования глиального рубца [157].

Нейротрофический фактор GDNF, экспрессируемый как нейронами, так и глиальными клетками [43; 128], стимулирует дифференцировку нейронов, предотвращает апоптоз и повышает выживаемость поврежденных мотонейронов [80; 219]. Исследования L. Zhang с соавт. (2009) показывают, что GDNF стимулирует образование миелина и влияет на астроглиоз, снижая экспрессию в астроцитах глиального фибриллярного кислого белка [100]. Эти эффекты способствуют уменьшению вторичного повреждения и стимулируют активную регенерацию аксонов [181; 201; 204]. Для доставки GDNF, не способного самостоятельно преодолевать гематоэнцефалический барьер, необходимы методы локального введения или его конъюгация с носителями, такими как вирусные белки, антитела или генетически модифицированные клетки, экспрессирующие GDNF [156]. Для стимулирования регенерации аксонов и их миелинизации после TCM предложена комбинированная стратегия, включающая введение GDNF и трансплантацию стволовых клеток [201]. Кроме того, сочетание GDNF с другими нейротрофическими факторами усиливает его терапевтические возможности [204].

1.4.2 Молекулы межклеточной адгезии

Семейство молекул клеточной адгезии (CAMs) насчитывает более 200 белков, включенных в четыре основные группы: кадгерины, суперсемейство иммуноглобулинов (IgSF), интегрины и нейрексыны/нейролигины [242]. CAMs

участвуют в широком спектре клеточных процессов, включающих передачу сигналов межклеточных взаимодействий [234], ремоделирование цитоскелета и регуляцию экспрессии генов [52]. В семейство NCAM (*Neural cell adhesion molecule* – Нейрональная молекула клеточной адгезии) входят два белка: NCAM1 и NCAM2 [242]. NCAM1, будучи первой идентифицированной молекулой клеточной адгезии в нервной системе, получила широкое научное освещение [17; 52; 163; 234]. В отличие от него, белок NCAM2 менее изучен, и его функциональная роль до конца не выяснена. NCAM1 существует в трех основных изоформах: 180 кДа, 140 кДа и 120 кДа. Изоформа NCAM180 экспрессируется главным образом в нейронах взрослого мозга, NCAM140 – в нейронах на эмбриональных и взрослых стадиях, тогда как экспрессия NCAM120 происходит в основном в глиальных клетках [242]. Полисиализация белка NCAM1 и его взаимодействие с цитоскелетом выступают ключевыми детерминантами функциональной активности данной молекулы [147]. Максимальный уровень полисиализации NCAM1 отмечен на эмбриональных стадиях развития, после чего происходит постепенное её снижение в постнатальном периоде [17]. В экспериментах на мышах, дефицитных по ферментам, катализирующим полисиализацию, показано снижение экспрессии транскрипционных факторов и нарушение процессов клеточной миграции [242].

Белок NCAM1 играет важную роль в структурной организации синапсов, способствуя его стабилизации. Экспериментально на культурах нейронов гиппокампа установлено, что повышенная экспрессия NCAM1 стимулирует образование синапсов, а его дефицит приводит к снижению общего количества дендритных шипиков [189]. Важность NCAM1 для созревания ГАМК-эргических синапсов делает его ключевым белком в формировании нейронных сетей [234]. Исследования *in vitro* продемонстрировали способность NCAM стимулировать рост нейритов [242]. Кроме того, имеются данные, свидетельствующие о том, что после острой ТСМ молекулы NCAM способствуют росту аксонов и перестройке синапсов даже в области рубца [96; 139; 163], что критически важно для восстановления функций нейронов.

1.4.3 Сосудистые факторы роста

Ключевую роль в стимуляции ангиогенеза и неоваскуляризации играет ангиогенин [230; 235]. Хотя основными продуцентами белка являются эндотелиальные клетки, ангиогенин также активно экспрессируют фибробласты, гладкомышечные и различные опухолевые клетки [173]. В своих исследованиях Н. Kishikawa с соавт. (2008) обнаружили активную экспрессию ангиогенина в моторных нейронах грызунов и человека на всех этапах онтогенеза, что указывает на его роль в поддержании жизнеспособности этих клеток [125]. Ангиогенин модулирует экспрессию генов, участвующих в развитии нейритов, обеспечивая их рост, ветвление и адресное наведение [235], проявляет нейропротекторные свойства в условиях стресса [230].

В настоящее время наибольший интерес представляет сосудистый эндотелиальный фактор роста VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) – белок, обладающий как высокой ангиогенной активностью, так и мощным нейропротекторным действием [23; 218]. У млекопитающих семейство VEGF представлено пятью факторами: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и плацентарным фактором роста (PlGF, *Placental growth factor*). Функции, в которых участвует семейство VEGF, многочисленны и включают ангиогенез, лимфангиогенез, нейрогенез, модуляцию синаптической пластичности, нейротрансмиссию, выживание нейронов и нейрорегенерацию [49; 169; 262]. Наиболее изучены свойства фактора VEGF-A, представленного шестью изоформами (VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF183, VEGF189 и VEGF206), образующимися в результате альтернативного сплайсинга одного гена. Рецепторами для VEGF служат VEGFR-1, VEGFR-2 и VEGFR-3 [32]. Члены семейства VEGF демонстрируют разную специфичность связывания: VEGF-A связывается с VEGFR-1 и VEGFR-2, VEGF-B и PlGF – с VEGFR-1, а VEGF-C и VEGF-D – с VEGFR-3 и VEGFR-2 [143; 229]. Значимость VEGFR-2 как основного рецептора, опосредующего ангиогенную и нейропротекторную активность VEGF, делает его наиболее изученным представителем семейства VEGFR [229]. Результаты исследований действия VEGF в ЦНС выявили, что нейропиплин-1 (NP-

1) является еще одним ключевым рецептором, показавший специфичность к изоформе VEGF165 [209].

Хотя первоначальное представление о роли VEGF в гомеостазе нервной системы связывали преимущественно с ангиогенезом, сосудистый эндотелиальный фактор роста также проявляет прямое нейротрофическое действие, участвует в росте аксонов при развитии ЦНС и стимулирует пролиферацию нейральных стволовых клеток [32]. Показано, что VEGF-A (VEGF165, VEGF121, VEGF189) проявляет выраженный положительный эффект на посттравматическое восстановление спинного мозга в экспериментных моделях [23]. Было также обнаружено, что терапия с применением VEGF в комбинации с тромбоцитарным фактором роста (PDGF, *Platelet-Derived Growth Factor*), основным фактором роста фибробластов (bFGF, *basic Fibroblast Growth Factor*) и ангиопоэтином-1 (Ang1) приводит к увеличению плотности кровеносных сосудов, снижению проницаемости гематоэнцефалического барьера и улучшению кровоснабжения в модели TCM [36].

1.5 Генная терапия

Стратегия генной терапии основана на доставке терапевтических генов в клетки-мишени при помощи вирусных векторов или использует альтернативные системы доставки подобных генов для коррекции генетических дефектов либо усиления продукции белковой молекулы с терапевтическим действием [42].

В случаях TCM целью генной терапии является стимулирование нейрорегенерации с помощью экзогенных нейротрофических факторов [101; 184; 199]. Данный подход включает в себя активацию эндогенных регенеративных механизмов в области повреждения мозга [120]. В настоящее время для обеспечения устойчивой продукции экзогенных нейротрофических факторов применяются различные генетические конструкции [42; 65; 141].

Основными векторными системами для доставки рекомбинантных терапевтических генов, являются аденоассоциированные вирусы (AAV), лентивирусы и аденовирусы (AdV), обладающие как индивидуальными

преимуществами, так и определенными недостатками. В частности, аденоассоциированные вирусы и аденовирусы проявляют более высокий уровень безопасности благодаря эписомальной экспрессии трансгенов [29]. Кроме того, следует отметить, что аденоассоциированные вирусы и лентивирусы обеспечивают длительную экспрессию трансгена в отличие от аденовирусов, которые обеспечивают временную экспрессию трансгена продолжительностью не более 3-х недель [252].

Клеточно-опосредованная доставка нейротрофических факторов основана на трансплантации генетически модифицированных клеток, продуцирующих целевые терапевтические факторы [101]. Генная терапия *ex vivo* представляет собой перспективный метод не прямой доставки терапевтических генов. Данный подход предполагает выделение клеток из организма пациента, последующую генетическую модификацию *in vitro*, определение уровня экспрессии трансгена в модифицированных клетках и последующую трансплантацию этих клеток реципиенту. Этот метод обеспечивает экспрессию терапевтических трансгенов исключительно в трансдуцированных клетках [20; 44].

1.5.1 Аденоассоциированные вирусы

Аденоассоциированные вирусы (AAV) представлены «голыми» парвовирусами рода *Dependoparvovirus* небольшого размера с одноцепочечной ДНК, получившими широкое распространение в качестве вектора для генной терапии [26; 42; 184; 239]. Хотя векторы на основе AAV характеризуются низкой токсичностью и патогенностью, повторное их введение способно индуцировать иммунные ответы на антигены вируса, что снижает эффективность доставки и экспрессию трансгена. Для преодоления этого барьера применяют стратегию последовательного использования векторов различных серотипов AAV с другой антигенной структурой [141]. Другим подходом является применение аденоассоциированных вирусов, упакованных в клеточные микровезикулы-экзосомы (Ехо-AAV), что позволяет снизить дозу AAV и, как следствие, уменьшить выраженность иммунного ответа против капсидного белка

аденоассоциированных вирусов [153]. Стоит отметить, что AAV отличается широкий тропизм к различным типам клеток, включая делящиеся и неделящиеся, при этом вирусы обычно сохраняются в виде внехромосомной ДНК [65; 226]. В то же время в ряде исследований зафиксирован факт интеграции AAV-доставленных генов в геном клетки-хозяина [67; 154; 265].

В разработке методов генной терапии среди серотипов AAV наиболее часто в качестве вектора выбирают аденоассоциированный вирус 2 серотипа (AAV-2), что обусловлено отсутствием патогенности для человека, широким тропизмом к различным типам клеток и простотой применения. Благодаря своим характеристикам векторы на основе вирусов серотипа AAV-2 широко используют в клинических испытаниях фазы I/II для лечения различных заболеваний [226]. Y. Hoshino (2019) с соавт. показали, что среди различных протестированных серотипов аденоассоциированных вирусов AAVrh10 показал больший тропизм к нейронам, астроцитам и олигодендроцитам на мышцах с моделью хронической TSM [239].

AAV-опосредованная генная терапия нашла применение в ряде одобренных препаратов, назначаемых для лечения соматических заболеваний, например, Luxturna и Zolgensma (Novartis, Швейцария). Препарат Luxturna применяют для доставки гена RPE65 при наследственной дистрофии сетчатки, а препарат Zolgensma – для экспрессии гена SMN1 в мотонейронах при терапии спинальной мышечной атрофии [26; 264]. При всей привлекательности аденоассоциированных векторов для генной терапии, обусловленной их высокой генетической стабильностью [65], следует учитывать ограничения, связанные с риском инсерционного мутагенеза и иммунотоксичностью, проявляющейся активацией Т-клеток, специфичных к антигенам капсида AAV, что было зафиксировано в ряде клинических исследований [154].

1.5.2 Лентивирусы

Лентивирусные векторы (ЛВ) представлены «одетыми» вирусами, разработанными на основе вирусов иммунодефицита человека 1 типа, геном

которых представлен одноцепочечной +РНК [152]. Они обеспечивают длительную и стабильную экспрессию генов благодаря своей способности трансдуцировать как пролиферирующие, так и покоящиеся клетки посредством интеграции трансгена в геном клетки-хозяина [101]. Кроме того, важным преимуществом лентивирусных векторов является их низкая иммуногенность, что и обусловило к ним высокий интерес [42].

В результате применения лентивирусных векторов, кодирующих нейротрофические факторы, при спинномозговой травме показан ряд благоприятных эффектов, включая стимулирование роста аксонов и миелинизации [120; 161]. В исследовании Y. Zhang и др. (2013) на крысах с пересеченными дорсальными столбами спинного мозга показано, что ЛВ эффективны для одновременной доставки фактора роста нервов (NGF) и ингибитора рецептора Nogo (sNgR) в виде слитого трансгена, что обеспечивало синергидный эффект. Последний включал как стимулирование регенерации аксонов, так и блокаду миелин-ассоциированных ингибиторов [133]. Также существуют данные об успешном применении ЛВ для доставки нейроглобина (Ngb) в стромальные клетки костного мозга (BMSC) для предотвращения прогрессирования вторичного повреждения при TCM [76].

Несмотря на то, что лентивирусные векторы проявляют значительно меньшую мутагенную активность по сравнению с ретровирусными векторами, их профиль безопасности, учитывая их происхождение, остается предметом серьезных дискуссий при использовании в генной терапии [42]. Принимая во внимание потенциальные риски, лентивирусные векторы успешно применяют в генной терапии для доставки генов, кодирующих химерный антигенный рецептор (CAR), В-клеточный антиген созревания (BCMA), белок ABCD1 (*ATP-binding cassette sub-family D member 1* – АТФ-связывающий кассетный транспортер, подсемейство D, член 1) и β -A-T87Q-глобин [65; 132; 152].

1.5.3 Аденовирусы

Аденовирусы представлены «голыми» ДНК-овыми вирусами семейства *Adenoviridae*, способными доставлять генетический материал в клетку без интеграции в геном клетки-хозяина [58]. Семейство аденовирусов, патогенных для человека, разделено на семь типов (A-G), каждый из которых, в свою очередь, подразделяется на многочисленные серотипы [131].

По сравнению с альтернативными вирусными системами для трансдукции клеток, аденовирусные векторы имеют ряд преимуществ: широкий тропизм, позволяющий проводить эффективную трансдукцию практически во все типы клеток, а также способность к достижению высокой экспрессии трансгенов. Кроме того, их достоинством является значительная ёмкость капсида для упаковки необходимого генетического материала (до 36 кб после удаления вирусных генов) и возможность получения высокоочищенных вирусных препаратов с высокими титрами [199]. В настоящее время разработано три основных поколения аденовирусных векторов, при этом векторы третьего поколения демонстрируют более низкий уровень иммуногенности в сравнении с векторами первого и второго поколений [131].

В настоящее время наиболее часто инструментом, используемым в клинических испытаниях (примерно 26% исследований), являются векторы, созданные на основе аденовируса 5 серотипа (Ad5) благодаря их способности к трансдукции как пролиферирующих, так и покоящихся клеток [199]. В условиях глобальной пандемии SARS-CoV-2/COVID-19, аденовирусные векторные платформы привлекли внимание научного сообщества в качестве потенциально ценного инструмента для разработки вакцин [56]. Специалистами Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи Минздрава России была создана комбинированная векторная вакцина Гам-КОВИД-Вак («Спутник V») против COVID-19, состоящая из двух компонентов: рекомбинантного аденовируса 26 серотипа (rAd26) и рекомбинантного аденовируса 5 серотипа (rAd5), несущих ген S-белков шипов коронавируса SARS-CoV-2 [55; 121; 210–212].

Аденовирусные векторы, сконструированные на основе 5 серотипа, широко применяют в генной терапии TCM [27; 199; 223]. Существуют как прямые, так и непрямые способы доставки аденовирусных векторов с терапевтическими трансгенами в область травмы спинного мозга.

Прямые методы включают в себя введение аденовирусного вектора непосредственно в область повреждения спинного мозга или в близлежащие структуры посредством интравентрикулярных, интрапаренхиматозных или интратекальных инъекций. Несмотря на эффективную экспрессию трансгенов, при использовании этих подходов следует учитывать возможность усугубления травматического повреждения, включая развитие некроза и апоптоза в нервной ткани [199]. В качестве менее инвазивного подхода возможна селективная ретроградная генная доставка аденовирусных векторов, вводимых внутримышечно или перинервально [252].

Результаты многочисленных исследований подтверждают, что доставка нейротрофинов с помощью аденовирусных векторов в рамках терапии TCM способна стимулировать морфологическое [78; 223; 266] и функциональное восстановление спинного мозга после повреждения [27; 99]. В частности, прямая генная доставка аденовирусного вектора, несущего терапевтический ген GDNF, так и клеточно-опосредованная генная терапия с помощью моноклеарных клеток пуповинной крови, трансдуцированных аденовирусным вектором, несущим GDNF, приводила к улучшению двигательной функции у крыс со спинномозговой травмой [27].

Для расширения спектра применения аденовирусных векторов предпринимаются попытки их модификации, включая изменение лигандных свойств шипов вирионов за счет модификации структуры S-белка. Одним из результатов этих усилий стал химерный вектор на базе аденовируса человека 5 серотипа (Ad5) с S-белком шипов аденовируса 35 серотипа (Ad5/F35), характеризующийся расширенным тропизмом и способностью инфицировать CAR-негативные клетки через CD46 рецептор. Это свойство отличает его от векторов Ad5. Кроме того, его эффективность доказана в условиях *in vitro* и *in vivo*,

что делает данную конструкцию наиболее перспективной и безопасной для проведения клинических исследований [18].

1.5.4 Невирусные системы доставки рекомбинантных генов

Помимо вирусных векторов, для доставки трансгенов можно использовать невирусные генные векторы, обеспечивающие более безопасную альтернативу в генной терапии, поскольку они существуют в клетке-мишени в эписомальной форме, сохраняя способность к синтезу функциональных белков. Невирусные генные векторы, в отличие от вирусных, не имеют ограничений по размеру переносимой ДНК, что обеспечивает им большую ДНК-несущую способность. Дополнительным преимуществом является возможность модифицировать невирусные векторы для таргетной доставки генов в конкретные подтипы нейронов [197].

Существуют два основных способа доставки невирусных векторов: физические и химические. Физические включают такие методы, как электропорация, сонопорация, магнитопорация, микроинъекция, применение генной пушки. Химические способы представлены полимерными и липидными носителями, а также неорганическими материалами, такими как углеродные нанотрубки, металлические наночастицы и системы на основе диоксида кремния [42]. Физические методы доставки генов позволяют обходить основные препятствия, снижающие эффективность трансфекции, включающие взаимодействие вектора с компонентами крови, расщепление сывороточными нуклеазами, клеточное поглощение и выход из эндосом [263]. Применение биоматериалов, например, сополимера молочной и гликолевой кислот – поли(лактид-ко-гликолид) (PLGA), в качестве каркаса, формирующего конструкции в области поражения, вместе с невирусными векторами, способствует направленной регенерации поврежденных структур спинного мозга [101]. Несмотря на ряд преимуществ, невирусные системы доставки генов отличает и ряд недостатков: высокая чувствительность к вне- и внутриклеточным барьерам, сниженная эффективность трансфекции и более низкая экспрессия трансгена [197].

На основании сравнительного анализа характеристик вирусных и невирусных векторных систем, можно заключить, что векторы на основе аденовируса человека 5 серотипа (Ad5) представляют собой наиболее оптимальный инструмент для генной терапии ТСМ. В отличие от аденоассоциированных вирусов, чье применение лимитировано риском иммунного ответа при повторном введении и потенциальной интеграцией в геном, аденовирусные векторы обеспечивают высокую экспрессию трансгенов и обладают значительной упаковочной ёмкостью для рекомбинантных нуклеиновых кислот. По сравнению с лентивирусными векторами, способными к интеграции трансгена в геном клетки-хозяина (что несет риск мутаций), аденовирусы сохраняются в эписомальной форме, обеспечивая высокую генетическую безопасность. Инженерная модификация в виде химерных векторов Ad5/F35, обладающих расширенным тропизмом через рецептор CD46 и сниженной иммуногенностью, позиционирует платформу на основе аденовируса 5 серотипа как наиболее перспективную для клинического применения.

1.6 Клеточная терапия

В терапии ТСМ источником факторов роста, стимулирующих нейрорегенерацию, и средством обеспечения физической поддержки при ремоделировании мозга в зоне повреждения могут служить различные клетки, что делает их перспективным инструментом для стимулирования нейрорегенерации [225]. Существуют три основных механизма, посредством которых трансплантированные клетки оказывают терапевтическое воздействие: 1) замещение погибших клеток [70]; 2) активация эндогенных стволовых клеток [205]; 3) секреция трансплантированными клетками нейротрофических факторов, обеспечивающих нейропротекцию и нейрорегенерацию [225].

1.6.1 Эмбриональные стволовые клетки

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), полученные из внутренней клеточной массы бластоцисты, обладают потенциалом дифференцировки в

клеточные типы всех трех зародышевых листков [232]. Существуют протоколы, обеспечивающие дифференцировку эмбриональных стволовых клеток в нейрональные предшественники, а также в специфические нейронные [107] и глиальные клеточные типы [238]. При исследовании на крысах с ТСМ было показано, что пре-дифференцированные эмбриональные стволовые клетки мыши, трансплантированные в область повреждения, дифференцировались в нейрональные и глиальные клетки, способствуя частичному восстановлению функций [159]. В других исследованиях на животных моделях контузионной и умеренной компрессионной ТСМ было продемонстрировано, что олигодендроциты, полученные из ЭСК, экспрессируют основной белок миелина и поддерживают миелинизацию аксонов [34; 254]. Кроме того, нейрональные клетки, дифференцированные из ЭСК, способствуют преодолению ингибирующего барьера хондроитинсульфатных протеогликанов (CSPG), стимулируя регенерацию аксонов, что указывает на их терапевтический потенциал при ТСМ [225].

В 2014 году проведено клиническое исследование, результаты которого подтвердили безопасность трансплантации олигодендроглиальных клеток-предшественников, полученных из человеческих ЭСК, у пациентов с ТСМ [215]. В ретроспективном исследовании Shroff и соавт. (2016) показано, что клеточная терапия с использованием эмбриональных стволовых клеток человека способствует частичному восстановлению неврологических функций у пациентов с хронической ТСМ и не сопровождалась серьёзными осложнениями [216]. Однако применение нейральных клеток, полученных из ЭСК, в терапии ТСМ сопряжено с определенными трудностями, в частности, с этическими соображениями относительно источника клеток [9] и потенциальным риском их злокачественной трансформации, связанным с неполной или aberrантной дифференцировкой, в результате чего могут образовываться не-нейральные клетки [106].

1.6.2 Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) получают перепрограммированием соматических клеток, выделенных из ткани пациента, что

позволяет обойти этические сложности, обеспечить аутологичную трансплантацию и предотвратить иммунное отторжение [225]. Открытие метода получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток принадлежит К. Takahashi и S. Yamanaka (2006), доказавшим возможность перепрограммирования фибробластов в плюрипотентные клетки [236].

В исследованиях на животных моделях ТСМ было показано, что нейрональные стволовые клетки, полученные из ИПСК, оказывали позитивные эффекты в месте повреждения, проявлявшиеся ингибированием демиелинизации, стимуляцией синаптогенеза и секрецией нейротрофических факторов [225]. На моделях ТСМ у крыс было продемонстрировано, что нейральные стволовые клетки (НСК), полученные из ИПСК 86-летнего здорового мужчины, дифференцировались в нейроны и глию, при этом наблюдали удлинение аксонов на большие расстояния и формирование синапсов [137]. Однако имеются и противоположные данные, указывающие, что нейральные клетки-предшественники (НКП), полученные из человеческих ИПСК, не имели положительного действия при ТСМ, возможно, из-за проблемы, связанной с выживаемостью трансплантированных клеток [268]. Высокий риск злокачественной трансформации ИПСК и неэкономичность их применения в терапевтических целях являются основными препятствиями для их клинического применения [225].

1.6.3 Нейральные стволовые клетки

К нейральным стволовым клеткам (НСК) относят полипотентные клетки, идентифицированные в субвентрикулярной области желудочков и гиппокампе головного мозга [106; 225]. Потенциал данных клеток к дифференцировке в нейроны и клетки глии, а также их способность ускорять процесс ремиелинизации и секретировать нейротрофические факторы делают их перспективными для применения в клеточной трансплантации при ТСМ [225]. Отмечено, что вероятность дифференцировки этих клеток в нейроны в тканях спинного мозга происходит редко, в то время как они преимущественно дают начало олигодендроцитам [247]. Выбор пути дифференцировки клеток в значительной

степени определяют факторы микроокружения. При создании благоприятных условий и стимуляции нейрогенного потенциала, НСК способны к дифференцировке в нейроны *in vivo* [10].

Особенно важным свойством НСК является способность секретировать нейротрофические факторы (NGF, CNTF, BDNF, GDNF, IGF-1 [*Insulin-like Growth Factor 1*, Инсулиноподобный фактор роста 1]), стимулируя, таким образом, восстановление спинного мозга после травмы [225]. Помимо этого, НСК оказывают иммуномодулирующее действие, ингибируя секрецию провоспалительных медиаторов реактивными макрофагами и Т-клетками [30]. Результаты клинического исследования с участием двенадцати пациентов с амиотрофическим боковым склерозом показали, что трансплантация НСК, полученных из спинного мозга человека, является безопасной процедурой, что способствовало началу дальнейших клинических испытаний [140]. Однако существующие ограничения, включая этические соображения, связанные с получением клеток эмбрионального происхождения, трудности в получении клинически значимого количества клеток от взрослых доноров, а также отсутствие возможности использовать аутологичные клетки ограничивают применение человеческих НСК [106; 247].

1.6.4 Шванновские клетки

Миелинобразующие шванновские клетки широко применяют при ТСМ для доставки нейротрофических факторов [40; 203; 213]. Шванновские клетки могут быть получены из аутологичных периферических нервов с последующим культивированием *in vitro* для клеточной терапии спинальной травмы [158]. Были проведены два клинических испытания первой фазы под контролем FDA (*Food and Drug Administration*, Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств), в которых аутологичные шванновские клетки, полученные из икроножного нерва, трансплантировали пациентам с подострой [213] и хронической спинномозговой травмой [186]. Результаты исследования продемонстрировали безопасность данного метода лечения, а также показали

улучшение двигательных и сенсорных функций у одного из участников испытания. Ограничения в применении шванновских клеток, полученных из периферических нервов взрослых пациентов, сопряжены с проблемами вариабельности выделяемых клеточных популяций, что затрудняет надежную оценку их роли в ходе лечения [158].

1.6.5 Обоияательные нейроэпиталиальные клетки

Обоияательные нейроэпиталиальные клетки (ОНК) – специализированные глиальные клетки в составе обоияательного эпителия показали способность стимулировать регенерацию аксонов после трансплантации в спинной мозг на животных моделях [101; 178]. Трансплантация ОНК, трансдуцированных аденовирусным вектором, несущим гены BDNF и NT-3, в спинной мозг взрослых крыс с односторонней перерезкой дорсолатерального канатика приводила к улучшению двигательной функции задних конечностей, снижению объема поражения и усилению регенерации руброспинального тракта через 4 месяца после травмы по сравнению с контрольной группой [86]. Однако в последующих исследованиях той же научной группы не было обнаружено статистически значимых различий в функциональных показателях между группой, получавшей ОНК, экспрессирующие NT-3, и контрольной группой. При этом гистологический анализ выявил значительный рост аксонов ниже места повреждения спинного мозга [175]. В клинических исследованиях с применением ОНК, по данным некоторых авторов, значимый терапевтический эффект также не был достигнут [41; 101].

1.6.6 Мезенхимальные стволовые клетки

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) могут быть получены из костного мозга, жировой ткани, плаценты и периферической крови. Благодаря легкости получения и культивирования аутологичные МСК широко применяют в исследованиях способов терапии ТСМ [111; 149; 257]. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что терапевтическое действие МСК связано, вероятно, с их

способностью секретировать нейротрофины, инициировать ангиогенез и оказывать противовоспалительное действие [149; 225].

Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга (МСК-КМ) являются частично дифференцированными прогениторными клетками, играющими ключевую роль в поддержании гемопоэза и обеспечении регенерации костной ткани во взрослом организме [257]. Результаты раннего исследования показали, что трансплантация МСК-КМ в область контузии спинного мозга у крыс приводила к образованию скоплений астроцитов и нейрональных предшественников [145]. Более позднее исследование выявило положительные эффекты на функциональное восстановление спинного мозга после травмы при использовании генетически модифицированных МСК-КМ, сверхэкспрессирующих рекомбинантные NGF, BDNF и VEGF [255]. Клиническое исследование III фазы показало, что однократное применение МСК безопасно, но выявило лишь незначительный терапевтический эффект. S.K. Oh и др. (2016) предполагают, что данный факт связан с выбором сроков трансплантации, поскольку эффективность хоминга стволовых клеток снижается при хронической TCM [19]. Наличие противоречивых данных об эффективности терапии МСК-КМ требует дополнительных исследований для подтверждения ее клинической значимости [225].

МСК жировой ткани (МСК-ЖТ) являются перспективными кандидатами для применения в клеточной терапии, поскольку жировая ткань содержит больше соматических стволовых клеток, чем костный мозг, и является более доступным источником [149]. Y. Ohta с соавт. (2017) установили, что внутривенное введение МСК-ЖТ крысам с травмой спинного мозга способствует восстановлению двигательной функции задних конечностей. Данное улучшение коррелировало с активацией ангиогенеза и повышением экспрессии сигнальных белков ERK и Akt [119]. В другом исследовании на компрессионной модели TCM у крыс было обнаружено, что за счет экспрессии BDNF и CNTF, МСК-ЖТ оказывают положительное влияние на выживаемость клеток и регенерацию нервной ткани [241]. Кроме того, МСК, полученные из жировой ткани, демонстрируют способность к дифференцировке в нейроноподобные клетки, что сопровождается

уменьшением размера полостей, подавлением иммунного ответа за счет секреции противовоспалительных факторов и препятствием активации астроцитов [225].

Мезенхимальные стволовые клетки пуповины (МСКП) обладают потенциалом дифференцировки в гомогенную популяцию, проявляющую нейрональные фенотипические свойства [257]. В ранних исследованиях было установлено, что МСКП оказывают комплексное терапевтическое воздействие, предотвращая апоптоз нейронов, подавляя образование астроглиального рубца, уменьшая последствия ишемического повреждения спинного мозга, и снижая количество реактивных астроцитов [98; 118]. Клиническое исследование, проведенное Н. Cheng с соавт. (2014) показало, что у 7 из 10 пациентов с тораколюмбальной спинномозговой травмой, получившим трансплантацию МСКП, наблюдали значительное улучшение двигательной функции, мышечного тонуса, функции мочевого пузыря и контроля над мочеиспусканием по сравнению с группой, получавшей только реабилитационную терапию [57].

1.6.7 Гемопозитические стволовые клетки

В мае 2016 года Европейское агентство лекарственных средств (ЕАЛС) одобрило геннотерапевтический продукт Strimvelis (Kyowa Kirin, Япония), предназначенный для лечения пациентов с тяжелым комбинированным иммунодефицитом, ассоциированным с дефицитом аденозиндезаминазы (АДА-ТКИД) [65]. Этот терапевтический подход основан на трансплантации аутологичных гемопозитических стволовых клеток, трандуцированных γ -ретровирусным вектором, несущим нормальный ген АДА [33; 44; 182].

В качестве стандартного метода лечения церебральной адренолейкодистрофии, обусловленной мутацией гена ABCD1 (*ATP-binding cassette, subfamily D, member 1* – АТФ-связывающая кассета, подсемейство D, член 1), применяют аллогенную трансплантацию гемопозитических стволовых клеток для подавления прогрессирования заболевания [132; 271]. В то же время аллогенная трансплантация гемопозитических стволовых клеток имеет ряд ограничений,

включающих в себя нехватку HLA-совместимых доноров, высокий риск отторжения трансплантата и развитие реакции «трансплантат против хозяина» [104; 261]. По этой причине аутологичная терапия с помощью гемопоэтических клеток является более предпочтительной из-за отсутствия перечисленных рисков [132]. В июле 2021 года Европейский Союз и США одобрили препарат Skysona для лечения мальчиков с церебральной формой аденолейкодистрофии [123]. Его применение включает выделение из периферической крови пациентов CD34-положительных гемопоэтических стволовых клеток с последующей трансдукцией репликативно-дефектным лентивирусным вектором, содержащим комплементарную ДНК гена ABCD1 [231; 261].

1.6.8 Мононуклеарные клетки пуповинной крови

Мононуклеарная фракция пуповинной крови представлена лейкоцитами (преимущественно лимфоцитами и моноцитами), а также пулом прогениторных и стволовых клеток, концентрация которых в пуповинной крови сопоставима или выше, чем в костном мозге [12]. Стволовые клетки пуповинной крови представлены гемопоэтическими, эндотелиальными и мезенхимальными клетками [260]. Их характерными особенностями, отличающими от клеток костного мозга, являются сниженная иммуногенность, низкий риск отторжения и значительно более высокий пролиферативный потенциал [12]. R. Islamov и др. (2017) клеточно-опосредованную (*ex vivo*) генную терапию контузионных ТСМ у крыс проводили с помощью человеческих генетически модифицированных мононуклеарных клеток пуповинной крови (МКПК), сверхэкспрессирующих комбинации нейротрофических факторов (VEGF, GDNF, NCAM или VEGF, ANG, NCAM) в сравнении с прямой (*in vivo*) генной терапией с применением аденовирусных векторов, несущих терапевтические гены, в таких же комбинациях. Было установлено, что генная терапия *ex vivo* была более эффективной по сравнению с генной терапией *in vivo* [85].

Эффективность использования генетически модифицированных мононуклеарных клеток пуповинной крови, сверхэкспрессирующих VEGF, GDNF,

NCAM, была также продемонстрирована на животных моделях бокового амиотрофического склероза [237], инсульта [258] и контузионной ТСМ [20; 223]. Несмотря на использование клеток пуповинной крови в различных клинических испытаниях [177; 187; 233], в настоящее время не существует утвержденных протоколов их применения.

1.6.9 Аутологичные лейкоциты

Несмотря на то, что мононуклеарные клетки пуповинной крови активно применяют в исследованиях и клинической практике для клеточной терапии [20; 237], все же они обладают и рядом недостатков. К таким ограничениям можно отнести ограниченное количество клеток при однократном введении, невозможность повторного забора МПКК от исходного донора, аллотрансплантационные риски. Другим доступным и безопасным клеточным носителем для клеточно-опосредованной генной терапии могут служить аутологичные лейкоциты пациента. На сегодняшний день проводятся многочисленные исследования по их применению в качестве клеточных носителей для клеточно-опосредованной генной терапии различных заболеваний [5; 45; 51; 269].

Генетически модифицированные Т-лимфоциты, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), применяют для лечения злокачественных заболеваний кроветворной системы [270]. Клеточная терапия CAR-T (*Chimeric Antigen Receptor T-cell therapy* – Терапия Т-клетками с химерным антигенным рецептором) представляет собой значительный прорыв в онкологии, продемонстрировав высокую эффективность при лечении гематологических злокачественных новообразований [269]. CAR-T-клетки являются генетически модифицированными Т-лимфоцитами, экспрессирующими химерный антигенный рецептор (CAR) для распознавания и связывания с поверхностными опухолевыми антигенами [51].

Для проведения CAR-T-клеточной терапии Т-лимфоциты обычно получают из периферической крови самого пациента, что обеспечивает иммунологическую

совместимость и снижает вероятность аллогенного иммунного ответа. Однако иногда специалисты сталкиваются с проблемой недостаточного количества этих клеток, у пациентов, перенесших химиотерапию [5]. Для преодоления таких проблем, как реакция «трансплантат против хозяина» и реакция «хозяин против трансплантата», создают готовые препараты на основе универсальных CAR-T-клеток [269]. Важно отметить, что продолжительность жизни аллогенных CAR-T-клеток может быть ограничена вследствие их повышенной гиперактивации и экспрессии большего числа эпитопов, стимулирующих отторжение. С целью элиминации генов, кодирующих эти эпитопы, применяют особые технологии редактирования генома, такие как цинк-пальцевые нуклеазы (ZFN), системы TALEN и CRISPR/CAS9 [5].

В настоящее время Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США одобрено и доступно для клинического применения шесть препаратов CAR-T-клеточной терапии [51]. Кроме этого, Национальное управление медицинской продукции Китая (NMPA- National Medical Products Administration) одобрило применение еще двух препаратов CAR-T-клеточной терапии [269].

Клеточно-опосредованная генная терапия TCM подразумевает применение доступного и безопасного клеточного материала для доставки терапевтических генов к месту повреждения нервной ткани. Одним из важных аспектов в клеточно-опосредованной генной терапии является использование аутологичного клеточного материала, как например, использование аутологичных лейкоцитов крови для персонализированной генно-клеточной терапии TCM.

Лейкоциты, полученные из периферической крови пациента, в сравнении с другими потенциальными клеточными носителями генов, имеют ряд преимуществ: доступность для использования в генно-клеточной терапии, способность к миграции из крови в различные ткани организма, высокая синтетическая и секреторная активность, возможность многократной аутоинфузии местно или системно [172].

В данной работе для терапии TCM у мини-свиней было предложено

использование генно-клеточного препарата на основе аутологичных лейкоцитов и репликативно-дефектного химерного вирусного вектора на базе аденовируса человека 5 серотипа с белками шипов аденовируса 35 серотипа (Ad5/F35), обладающего повышенным сродством к молекуле CD46 в мембране лейкоцитов [28]. Терапевтическая эффективность аутологичных лейкоцитов свиньи, трансдуцированных аденовирусными векторами на базе Ad5/F35, несущих рекомбинантные терапевтические гены *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, была ранее показана на модели ишемического инсульта у мини-свиней [45]. Таким образом, на основании данных, представленных в литературе и полученных ранее результатов, можно сделать вывод, что генетически модифицированные аутологичные лейкоциты, обогащенные генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, имеют высокий терапевтический потенциал для терапии травмы спинного мозга.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

2.1 Дизайн эксперимента

Для патогенетической коррекции посттравматических нарушений в спинном мозге мини-свиней из периферической крови подопытных животных готовили аутологичный лейкоконцентрат, обогащенный генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, который внутривенно вводили мини-свиньям через 4 часа после моделирования контузионной ТСМ. Для эффективной трансдукции лейкоцитов был использован химерный аденовирусный вектор (Ad5/35F) с модифицированным фибром, обладающий высокой аффинностью к кластеру дифференцировки 46 (CD46), который экспрессируется на мембране всех ядродержащих клеток крови. По оригинальной технологии генетически обогащенный лейкоконцентрат с подтвержденной экспрессией терапевтических генов готовили в пластиковых контейнерах для крови, что исключает манипуляции *in vitro*, а также использование биопродуктов животного происхождения и антибиотиков. Морфологические, клеточные и молекулярные изменения в области повреждения спинного мозга у мини-свиней в условиях воздействия рекомбинантных молекул VEGF, GDNF и NCAM оценивали с группой сравнения, в которой животным после моделирования нейротравмы внутривенно вводили нативный аутологичный лейкоконцентрат. Отдельной задачей с помощью аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного репортерным геном *gfp*, исследован миграционный потенциал лейкоцитов, продуцирующих зеленый флуоресцентный белок, позволяющий установить механизм действия рекомбинантных молекул VEGF, GDNF и NCAM на посттравматическую регенерацию спинного мозга мини-свиней (Рисунок 1).

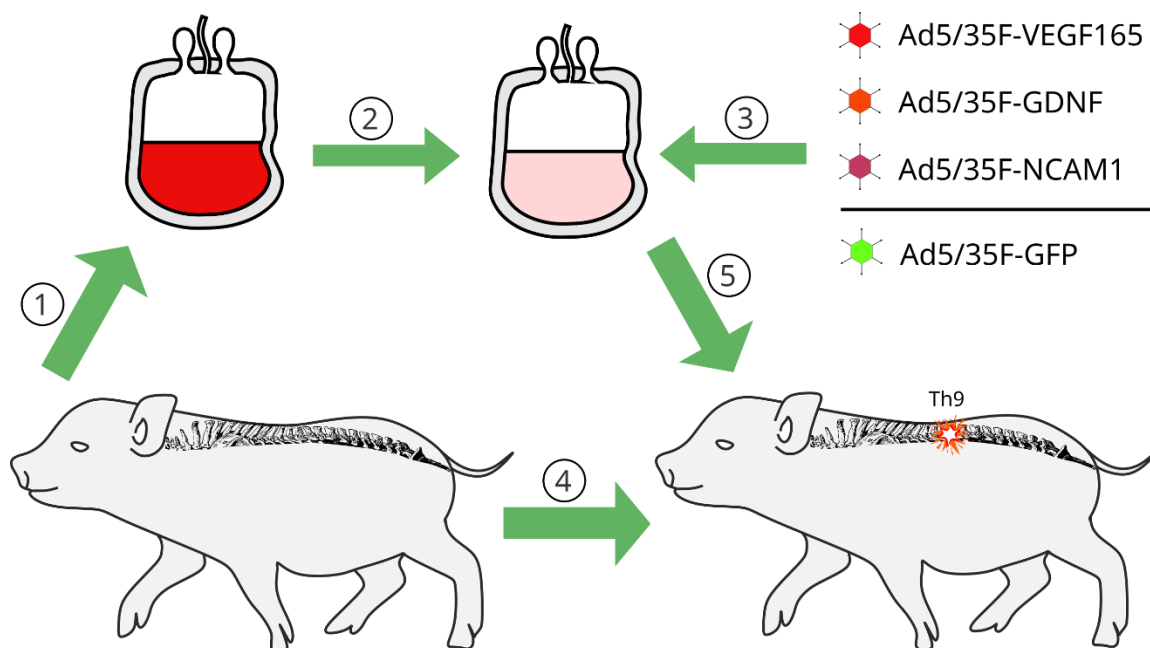


Рисунок 1 – Дизайн эксперимента: (1) забор 50 мл венозной крови из подключичной вены; (2) получение взвеси аутологических лейкоцитов (лейкоконцентрата); (3) одновременная трансдукция лейкоцитов тремя химерными аденовирусными векторами Ad5/35-VEGF165, Ad5/35-GDNF и Ad5/35-NCAM1 в равном соотношении или 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 *ncam1* или репортерным геном зеленого флуоресцентного белка, через 4 часа после операции. VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста; GDNF – глиальный нейротрофический фактор; NCAM – нейрональная молекула клеточной адгезии; GFP – зеленый флуоресцентный белок.

2.2 Моделирование контузионной травмы спинного мозга

В исследовании были использованы половозрелые 8-месячные самки мини-свиней (вьетнамская вислобрюхая) весом 25–30 кг ($n = 14$). Каждая свинья содержалась по одной в загоне, где поддерживалась стабильная температура (24–25°C), с 12-часовым циклом чередования светлого и темного времени суток, а также с неограниченным доступом к воде и корму. Все действия с животными проводились в соответствии с приказом Минздравсоцразвития № 708н от 23.08.2010 «Об утверждении правил лабораторной практики» и с разрешения

Локального этического комитета Казанского государственного медицинского университета (протокол №5 26.05.2020).

2.2.1 Предоперационный период и анестезия

Хирургические вмешательства выполняли в операционной, отвечающей всем установленным санитарным нормам. Перед проведением хирургических манипуляций животным проводили премедикацию, включающую подкожное введение атропина 1 мл в сочетании с внутримышечным введением ксилазина 1,5 мл (0,10 мл/кг) с золетилом 100 1,5мл (0,10 мл/кг). Индукцию наркоза осуществляли внутримышечным введением золетила 100 (10 мг/кг). Поддерживающую ингаляционную анестезию проводили с помощью наркозно-дыхательного аппарата Minor Vet Optima (Zoomed, Россия) изофлураном (Laboratorios Karizoo, Испания) в концентрации 2,0–2,5% в смеси с медицинским кислородом. На следующем этапе устанавливали мочевого силиконовый катетер, который оставался в мочевом пузыре в послеоперационном периоде, и венозный катетер, который установили в ушную вену для восполнения потерянной крови в ходе операции (инфузия 400,0 мл раствора Рингера) и для дальнейших послеоперационных назначений. Для поддержания температуры тела в пределах 38°C в ходе оперативного вмешательства использовали ветеринарный матрас с электроподогревом (VetNode, Россия).

2.2.2 Оперативный доступ

Операционное поле на спине животного освобождали от волосистого покрова с последующей обработкой спиртовым раствором хлоргексидина биглюконата 0,05% и 10% раствором повидона йода. Для получения доступа к спинному мозгу выполняли продольный разрез кожи и подкожно-жировой клетчатки по задней срединной линии над остистыми отростками Th7–Th12 грудных позвонков. На следующем этапе проводили препарирование скелетных мышц от остистых отростков и дужек позвонков с рассечением межостистых и надостистых связок на уровне Th8–Th9 позвонков. Для создания открытого участка спинного мозга

скусывали остистые отростки Th8 и Th9 позвонков и удаляли их дужки (ламинэктомия). Твердая мозговая оболочка оставалась интактной.

2.2.3 Контузионная травма

Дозированную контузионную ТСМ моделировали на уровне Th8-Th9. На расстоянии 1 мм от открытой поверхности твердой мозговой оболочки спинного мозга фиксировали металлический цилиндр импактора. Перед нанесением контузионной ТСМ животное было зафиксировано в оптимальной позе с вытянутым прямым позвоночником, после чего был произведен однократный удар металлическим стержнем по спинному мозгу мини-свиньи. Дозированную контузионную ТСМ осуществляли при помощи груза весом 50 г, падающего с высоты 50 см. Сокращение скелетных мышц задних конечностей и появление гематомы в месте удара металлическим стержнем служили объективными признаками контузионной нейротравмы, после чего рану послойно зашивали.

2.2.4 Послеоперационный период

После операции экспериментальным животным проводили антибактериальную (цефотаксим, 1 г/5мл, 1 раз в день, внутримышечно), обезболивающую (кеторол, 30 мг/мл, 2 раза в день, внутримышечно) и противовоспалительную (дексаметазон, 1 мл, 1 раз в день, подкожно) терапию по показаниям. Дополнительно мини-свиньи получали витаминную терапию: цианокобаламин (2 мл, 1 раз в день, внутримышечно), тиамин /пиридоксин (2 мл, 1 раз в день, внутримышечно), аскорбиновая кислота (4 мл, 1 раз в день, внутримышечно). Ежедневно в течение 8 недель эксперимента животных осматривали и проводили перевязку послеоперационной раны.

2.3 Неврологический осмотр

После моделирования контузионной ТСМ у мини-свиней еженедельно проводили неврологический осмотр, который включал в себя оценку типа паралича с гипотонусом/гипертонусом мышц, пассивных и активных движений в задних

конечностях, мочеиспускания. Осмотр проводился независимо двумя исследователями.

Согласно цели диссертационной работы, заключающейся в исследовании клеточных и молекулярных механизмов развития спинальной травмы у мини-свиней и последующей регенерации нервных структур в условиях генно-клеточной терапии, в дизайн исследования не входили задачи оценки морфологических, функциональных и поведенческих тестов скелетных мышц и суставов задних конечностей подопытных животных для комплексного анализа восстановления двигательной функции спинного мозга.

2.4 Гистологические методы исследования спинного мозга

Через 8 недель после моделирования нейротравмы животных выводили из эксперимента. Для этого мини-свиньям вводили внутримышечно Золетил 100 (10 мг/кг) и Ксилазин (40 мг/кг). Далее, после подключения к ингаляционному наркозу, поддерживаемому 2,5% изофлураном, через ушную вену вводили хлорид калия (150 мг/кг).

Спинной мозг выделяли из позвоночного столба, фиксировали в 4% параформальдегиде (Sigma, Сент-Луис, Миссури, США) в фосфатно-солевом буфере (рН = 7,4) и делили на три сегмента: роstralный (РС) и каудальный (КС) сегменты (длина каждого 15 мм) и эпицентр травмы, который был разделен на роstralный (ЭР) и каудальный (ЭК) фрагменты длиной по 7 мм (Рисунок 2).

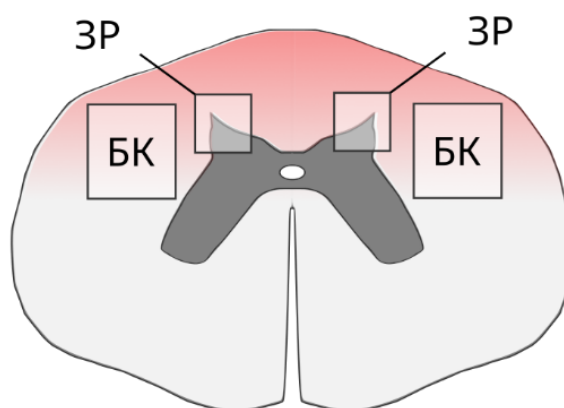
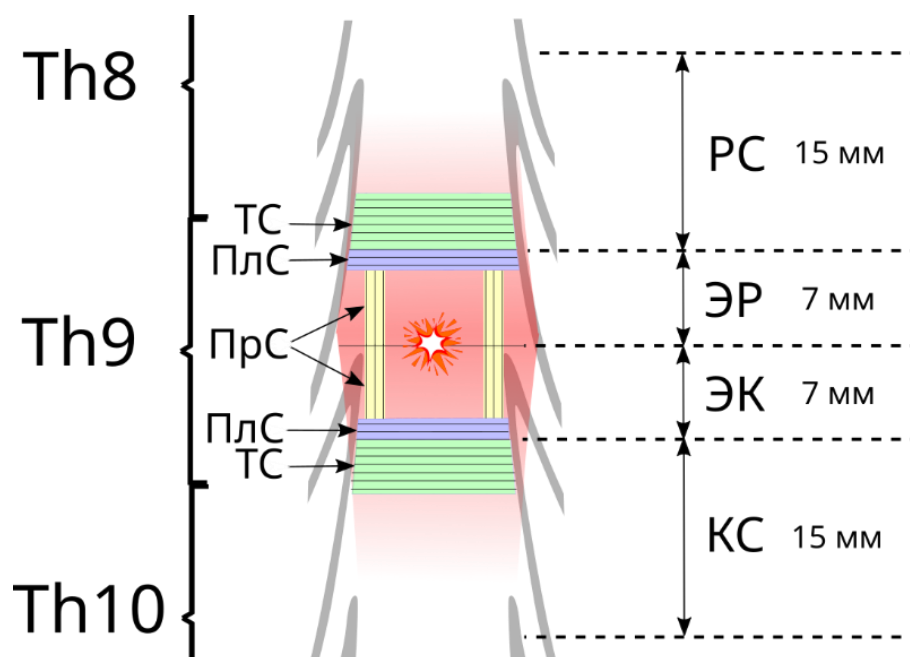


Рисунок 2 – Приготовление образцов спинного мозга для гистологического исследования через 8 недель после моделирования нейротравмы. По отношению к эпицентру травмы, спинной мозг был разделен на четыре сегмента: роstralный сегмент (РС), каудальный сегмент (КС), роstralный сегмент эпицентра (ЭР) и каудальный сегмент эпицентра (ЭК). Исследование спинного мозга проводили в проекции удара металлическим стержнем, а именно в задних рогах (ЗР) и боковых канатиках (БК), для чего были приготовлены тотальные срезы (ТС) спинного мозга для окрашивания гематоксилином и эозином и для иммунофлуоресцентного окрашивания, полутонкие поперечные срезы (ПлС) боковых канатиков для окрашивания метиленовым синим и продольные срезы (ПрС) боковых канатиков для иммунофлуоресцентного окрашивания.

2.4.1 Приготовление срезов

Образцы спинного мозга из рострального (РС) и каудального (КС) сегментов с целью криопротекции инкубировали в 30% растворе сахарозы. Поперечные свободно плавающие срезы спинного мозга толщиной 20 мкм готовили с помощью криостата (Microm HM 560, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Полученные срезы использовали для морфометрического анализа сохранности серого вещества и для иммунофлуоресцентного исследования.

Для морфометрического анализа сохранности белого вещества из рострального (ЭР) и каудального (ЭК) сегментов эпицентра травмы выделяли фрагменты латерального кортикоспинального тракта (Рисунок 2) толщиной 1 мм, которые фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида с последующей постфиксацией в 1% растворе тетраоксида осмия (Sigma, США) и заливали в полимерную смолу (EMbed 812, Electron Microscopy Sciences, Хатфилд, Пенсильвания, США). Полутонкие поперечные срезы толщиной 0,5 мкм готовили с помощью ультрамикротомы LKB-3 (LKB, Соллентуна, Швеция) и окрашивали метиленовым синим.

Продольные сегменты спинного мозга, выделенные из ЭР и ЭК в проекции боковых канатиков, насыщали 30% раствором сахарозы и готовили с помощью криостата замороженные срезы толщиной 20 мкм, которые монтировали на предметное стекло для последующего иммунофлуоресцентного исследования.

2.4.2 Морфометрический анализ сохранности серого вещества

Поперечные срезы (20 мкм) из рострального (РС) и каудального (КС) сегментов окрашивали с использованием гематоксилина (АбрисПлюс, Санкт-Петербург, Россия) и эозина (Элемент, Россия). На оцифрованных изображениях, полученных с помощью микроскопа Axioscope A1 (Carl Zeiss, Германия) при использовании 4-кратного объектива, измеряли площадь патологических полостей (S_n) в задних рогах спинного мозга относительно исследуемой площади серого вещества (S_o). Анализ проводили в программе ImageJ (NIH). Площадь сохранившегося серого вещества (S_c) выражали в процентах, согласно формуле 1:

$$S_c = 100 - (S_{\pi} / S_o) \times 100\% \quad (1)$$

2.4.3 Морфометрический анализ сохранности белого вещества

Оцифрованные изображения полутонких срезов боковых канатиков, включающих в себя латеральный кортикоспинальный тракт (КСТ), получали с помощью 20-кратного объектива исследовательского микроскопа (Axioscope A1) и анализировали с использованием программного обеспечения ImageJ (NIH). Площадь кистозной дегенерации ($S_{\text{кд}}$) измеряли в области латерального КСТ в квадрате ($0,2 \text{ мм}^2$) с обеих сторон в ЭР и ЭК фрагментах относительно исследуемой площади белого вещества (S_o). Относительную площадь кистозной дегенерации ($S_{\text{пкд}}$) выражали в процентах, согласно формуле 2:

$$S_{\text{пкд}} = S_{\text{кд}} / S_o \times 100\% \quad (2)$$

2.4.4 Иммунофлуоресцентное исследование спинного мозга

Для проведения иммунофлуоресцентного исследования были приготовлены свободно плавающие тотальные поперечные срезы из рострального и каудального сегментов спинного мозга. Перед окрашиванием срезы промывали в растворе фосфатно-солевого буфера с 1% Triton X-100 в течение 5 минут 3 раза и блокировали неспецифические места связывания в фосфатно-солевом буфере, содержащем 1% Тритон X-100 и 5% сыворотку лошади, в течение 1 часа при комнатной температуре.

Для анализа выживаемости клеток спинного мозга были использованы антитела (АТ) против белка теплового шока Hsp27 (Abcam, 1:200), экспрессия которого возрастает при оксидативном стрессе, и АТ против проапоптозного белка Caspase3 (Abcam, 1:200), свидетельствующие о гибели клеток. Для оценки астроглиоза применяли АТ против глиального фибриллярного кислого белка GFAP (Santa Cruz, 1:250), являющимся маркером реактивных астроцитов, и АТ к белку ионизированной Са-связывающей адаптерной молекулы 1 Iba1 (Biocare, 1:200), который представляет собой маркер активированной микроглии. Олигодендроциты изучали с помощью АТ против фактора транскрипции

олигодендроцитов Olig2 (Santa Cruz, 1:200). Для анализа экспрессии синаптических белков использовали АТ против синаптофизина (Synaptophysin, Abcam, 1:150) и белка постсинаптической плотности 95 кДа (PSD95, Abcam, 1:200) в задних рогах спинного мозга.

Продольные срезы из сегментов ЭР и ЭК, монтированные на предметные стекла, окрашивали АТ к специфическому для нейронов тубулину (β III-тубулин) для идентификации аксонов в области латерального КСТ.

Инкубацию с первичными АТ проводили в течение 12 ч при температуре 4°C. Далее срезы промывали с помощью фосфатно-солевого буфера и инкубировали со вторичными АТ, конъюгированными с флуорохромом, в течение 2 часов при комнатной температуре. В качестве вторичных АТ были использованы ослиные Ig, конъюгированные с Alexa 488 (Invitrogen, 1:200) и Alexa 647 (Invitrogen, 1:200) (Таблица 1). Для визуализации ядер клеток срезы окрашивали DAPI (10 мкг/мл в PBS, Sigma) в течение 10 минут при комнатной температуре.

Оцифрованные изображения микропрепаратов получали с помощью конфокальной (LEICA TCS SP5 MP, Leica Microsystems, Германия) и флуоресцентной микроскопии (Axioscope A1). Количество Caspase3-позитивных клеток и Olig2-позитивных клеток подсчитывали при совпадении специфического ядерного иммуноокрашивания и DAPI-позитивных ядер. Экспрессию синаптических белков (синаптофизин и PSD95), глиальных (GFAP, Iba1) и нейральных (β III-тубулин) маркеров, а также белка теплового шока Hsp27 оценивали как иммунопозитивную площадь и выражали в процентах. Паттерн экспрессии каждого антигена-мишени оценивали на площади 0,05 мм² с использованием программного обеспечения ImageJ (NIH).

Таблица 1– Первичные и вторичные антитела, использованные для иммунофлуоресцентного исследования

Антитела	Хозяин	Разведение	Производитель
Beta III Tubulin*	Кролик	1:200	Abcam (Cat # ab18207)
Caspase3*	Кролик	1:200	Cell Signaling Technology (Cat # 9661)
Glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) *	Кролик	1:100	Santa Cruz(Cat # sc-9010)
Glial fibrillary acidic protein (GFAP)*	МЫШЬ	1:200	Santa Cruz (Cat # sc-33673)
Ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1) *	Кролик	1:150	Abcam (Cat # ab178847)
Heat shock protein 27 kDa (Hsp27) *	Кролик	1:200	Abcam (Cat # ab12351)
Oligodendrocyte transcription factor 2 (Olig2) *	Кролик	1:100	Abcam (Cat # ab18258)
Neural cell adhesion molecule (NCAM) *	Кролик	1:100	Abcam (Cat # ab9272)
Postsynaptic density protein 95 kDa (PSD95) *	Кролик	1:200	Abcam (Cat # ab18258)

Продолжение Таблицы 1

Антитела	Хозяин	Разведение	Производитель
Synaptophysin*	Кролик	1:100	Abcam (Cat # ab32127)
Vascular endothelial growth factor (VEGF) *	Кролик	1:300	Santa Cruz (Cat # sc-152)
Mouse IgG conjugated with Alexa 488**	Осел	1:200	Invitrogen (Cat # A-21202)
Mouse IgG conjugated with Alexa 647**	Осел	1:200	Invitrogen (Cat # A-31571)
Rabbit IgG conjugated with Alexa 488**	Осел	1:200	Invitrogen (Cat # A-21206)
Rabbit IgG conjugated with Alexa 647**	Осел	1:200	Invitrogen (Cat # A-31573)

Примечание – * – первичные антитела; ** – вторичные антитела

2.5 Приготовление генно-клеточного препарата

Для изучения эффективности трансдукции лейкоцитов и их миграционного потенциала, на первом этапе аутологичный лейкоконцентрат, полученный из периферической крови мини-свиней, трансдуцировали химерным аденовирусным вектором (Ad5/F35), несущим репортерный ген зеленого флуоресцентного белка (GFP). На следующем этапе для оценки терапевтического потенциала аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного терапевтическими генами, в условиях ТСМ для трансдукции лейкоцитов использовали комбинацию из трех

генетических конструкций в равном соотношении (Ad5/35-VEGF165, Ad5/35-GDNF и Ad5/35-NCAM1).

2.5.1 Получение химерных аденовирусных векторов Ad5/F35

Для эффективной доставки в лейкоциты мини-свиньи трех терапевтических генов (*vegfl165*, *gdnf* и *ncam1*) были созданы химерные аденовирусные векторы на основе аденовируса человека серотипа 5 с фибром аденовируса 35 серотипа (Ad5/F35). Фибер аденовируса 35 серотипа имеет высокое сродство к мембранному рецептору CD46, который экспрессируется на всех ядерных клетках и обеспечивает эффективную трансдукцию лейкоцитов. Аденовирусные векторы Ad5/35, несущие терапевтические гены, кодирующие VEGF165, GDNF, NCAM1 и репортерный ген зеленого флуоресцентного белка GFP, были наработаны на базе Федерального научно-исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (Москва, Россия) по ранее описанной методике. Данная методика основана на FLP-опосредованной сайт-специфической рекомбинации. Для этого были сконструированы две плазмиды. Одна из них (pAd5-F35-*frt*) содержала полный геном Ad5 (дельта E1/E3) с фибром аденовируса 35 серотипа, ITR, экспрессионную кассету с промотором CMV, ген Flp-рекомбиназы, SV40-полиА и сайт рекомбинации *frt*. Вторая плазида (pGamal) содержала ITR, сайт инкапсуляции Ad5, сайт рекомбинации *frt* и кассету экспрессии с промотором CMV, интересующий ген и SV40-polyA. Нуклеотидные последовательности, кодирующие VEGF165 (Gene Bank NM_001171626.1), GDNF (Gene Bank NM_000514.4) и NCAM1 (Gene Bank NM_001076682.2), были получены путем химического синтеза в Еврогене (Москва, Россия). Сначала гены человека клонировали в плазмидный вектор pGamal. Затем была проведена рекомбинация pGamal-VEGF, pGamal-GDNF, pGamal-NCAM1 с плазмидами pAd5-F35-*frt* в клетках линии HEK293. После получения рекомбинантных репликативно-дефектных вирусных векторов в культуре клеток HEK 293, данные препараты проходили многоступенчатую хроматографическую очистку. Затем, после стерилизующей фильтрации, их разливали по флаконам.

Химерный аденовирусный вектор на основе аденовируса человека серотипа 5 с фибром аденовируса 35 серотипа (Ad5/F35), несущий репортерный ген зеленого флуоресцентного белка (GFP), был создан путем гомологичной рекомбинации в *Escherichia coli*. Плазмида pZ35 содержала полный геном Ad5 с делецией области E1 и knob-домен фибера Ad35. pZ35 был линейаризован с помощью рестриктазы *PacI* и смешан с плазмидой pShuttle-CMV-GFP (Stratagene, Ла-Хойя, Калифорния, США), расщепленной с помощью *PmeI*. Клетки *E. coli* BJ5183 электропорировали смесью ДНК с использованием электропорационного аппарата MicroPulser (Bio-Rad, Геркулес, Калифорния, США) в соответствии с инструкциями производителя. Бактериальные колонии, полученные после 18–24 часов инкубации при температуре 30°C, анализировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и рестрикционного картирования. Полученный молекулярный клон тестировали с помощью множественных расщеплений ферментами рестрикции, а затем с помощью секвенирования. Рекомбинантный химерный аденовирус Ad5/F35-GFP получали путем липофекции линейаризованной *PacI* плазмиды pAd5/F35-GFP в линию эмбриональных клеток почек человека 293 (клетки HEK-293, ATCC CRL-11268) с использованием липофектамина 2000 (Thermo Fisher Scientific, Карлсбад, Калифорния, США) в соответствии с инструкцией производителя. Накопление рекомбинантного вируса Ad5/F35-GFP в клетках линии HEK-293 было обнаружено визуально по развитию характерного цитопатического эффекта. Идентичность химерного вируса была подтверждена с помощью ПЦР и рестрикционного картирования. Рекомбинантный химерный вирус Ad5/F35-GFP был очищен с помощью методов гель-фильтрации и анионообменной хроматографии.

Титры аденовирусных векторов, измеренные методом бляшкообразования в клетках HEK-293, составили: Ad5/35-VEGF165 ($2,0 \cdot 10^9$ БОЕ/мл), Ad5/35- GDNF ($7,0 \cdot 10^{10}$ БОЕ/мл), Ad5/35-NCAM1 ($5,0 \cdot 10^{10}$ БОЕ/мл) и Ad5/35-GFP ($2,5 \cdot 10^9$ БОЕ/мл).

2.5.2 Забор крови

За 12 часов до моделирования контузионной ТСМ у мини-свиней забирали 50 мл периферической крови из подключичной вены. Во время этой процедуры использовали внутримышечную анестезию путем инъекции Тилетамина/Золазепама (Zoletil 100, Virbac Laboratoires, Карпо, Франция; 10 мг/кг) и Ксилазина (Interchemie werken 'De Adelaar' B.V., Кастенрэй, Нидерланды; 40 мг/кг) в трапециевидную мышцу. Кровь от каждого животного собирали в гематологический контейнер объемом 250 мл с 35 мл ЦФДА-1 (Green Cross, Южная Корея). Общий анализ нативной периферической крови (ОАК) проводили с использованием гематологического автоматического анализатора Sysmex XP-300 (Sysmex Corporation, Кобе, Япония).

2.5.3 Получение взвеси аутологичных лейкоцитов (лейкоконтрата) из периферической крови

Первый этап включал в себя добавление в контейнер с лейкоцитами 50 мл 6% гидроксиэтилкрахмала, центрифугирование при $34\times g$ в течение 10 минут при 10°C с помощью напольной центрифуги с охлаждением DP-2065 R PLUS (Centrifugal Presvac RV; Presvac, Буэнос-Айрес, Аргентина) и экстрагирование фракционатором медицинским компонентов крови (ФК-01 «Дельрус», Россия) плазмы и лейкотромбослая по магистрали вверх в пустой контейнер.

На втором этапе контейнер, содержащий экстрагированный продукт, соединяли с пустым гематологическим контейнером и центрифугировали при таких же условиях, как на первом этапе. После чего плазму экстрагировали в пустой гематологический контейнер, а оставшийся клеточный осадок считали лейкоконцентратом.

2.5.4 Трансдукция лейкоцитов химерными аденовирусными векторами

Трансдукцию лейкоцитов химерным аденовирусным вектором, несущим ген репортерного зеленого флуоресцентного белка (Ad5/F35-GFP), проводили в гематологическом контейнере при MOI (multiplicity of infection — множественность

инфицирования) равным 10. Контейнер находился на шейкере при комнатной температуре. После 12-часовой трансдукции лейкоцитов для удаления свободных вирусных частиц в гематологический контейнер добавляли физиологический раствор в соотношении 1:9, затем смесь центрифугировали при $500 \times g$ в течение 10 мин при 10°C . После центрифугирования из контейнера удаляли супернатант. Оставшуюся в гематологическом контейнере клеточную взвесь (объемом 30 мл) рассматривали как лейкоконцентрат, продуцирующий репортерный зеленый флуоресцентный белок.

Трансдукцию лейкоцитов химерными аденовирусными векторами, несущими терапевтические гены *vegfl65*, *gdnf* и *ncaml*, также проводили в гематологическом контейнере в течение 12 часов на шейкере при комнатной температуре. При трансдукции лейкоцитов терапевтическими генами учитывали количество лейкоцитов, титр аденовирусных векторов и равное соотношение каждого вектора: 1/3 Ad5/35-VEGF165 ($2,0 \times 10^9$ БОЕ/мл), 1/3 Ad5/35-GDNF ($7,0 \times 10^{10}$ БОЕ/мл) и 1/3 Ad5/35-NCAM1 ($5,0 \times 10^{10}$ БОЕ/мл), где MOI также был равен 10. Процедуру удаления свободных вирусных частиц проводили по той же методике, что и при приготовлении лейкоконцентрата, обогащенного геном *gfp*. Оставшуюся в гематологическом контейнере клеточную взвесь (объемом 30 мл) рассматривали как лейкоконцентрат, обогащенный терапевтическими генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncaml*.

2.6 Анализ эффективности экспрессии трансгенов *in vitro*

2.6.1 Изучение эффективности трансдукции лейкоцитов химерным аденовирусным вектором, несущим ген репортерного зеленого флуоресцентного белка *gfp*

Эффективность трансдукции лейкоцитов мини-свиньи химерным аденовирусом, несущим ген репортерного зеленого флуоресцентного белка (Ad5/F35-GFP) исследовали *in vitro*. Образцы лейкоцитов, трансдуцированных Ad5/F35-GFP, высевали на 10-сантиметровые необработанные чашки для культивирования и инкубировали их в течение 72 часов в среде RPMI-1640

(ПанЭко, Москва, Россия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS; Biosera, Ньюай, Франция) и смеси 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Клетки культивировали при 37°C в увлажненном инкубаторе с 95% O₂ и 5% CO₂. GFP-положительные клетки визуализировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа (Zeiss Z1AxioObserver, Zeiss, Оберкохен, Германия) и с помощью метода проточной цитометрии с использованием BD FACS Aria III (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния, США). Данные проточной цитометрии выражали как процент GFP-положительных клеток.

2.6.2 Изучение эффективности трансдукции лейкоцитов химерными аденовирусными векторами, несущими терапевтические гены *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*

Эффективность трансдукции лейкоцитов одновременно тремя аденовирусными векторами (Ad5/35-VEGF165, Ad5/35-GDNF и Ad5/35-NCAM1) в равном соотношении исследовали методом полимеразной цепной реакции в реальном времени ПЦР-РВ.

Образцы лейкоцитов мини-свиньи, одновременно трансдуцированных комбинацией из трех химерных аденовирусных векторов Ad5/35-VEGF165, Ad5/35-GDNF и Ad5/35-NCAM1, культивировали в течение 72 часов, как было описано выше. Общую РНК из лейкоцитов выделяли в соответствии с инструкцией производителя набора ExtractRNA (Евроген). Для синтеза кДНК использовали шестинуклеотидные рандомные праймеры, а также набор MMLV RT (Евроген). Реакционная смесь включала в свой состав qPCRmix-HS SYBR (Евроген), образцы кДНК и праймеры, специфичные для *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*. Для проведения ПЦР был использован амплификатор CFX96 (BioRad). Каждую реакцию проводили с двумя техническими повторностями. Метод $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak) применялся для расчета относительного уровня экспрессии мРНК трансгенов с учетом значений, полученных для референсного гена 18S [135]. Последовательности праймеров, использованных в работе, и продуктов ПЦР представлены в Таблице 2.

Таблица 2 – Нуклеотидные последовательности праймеров и продуктов ПЦР в реальном времени

Гены и нуклеотидные последовательности	Длина продукта, bp	GC%	T _{пл} , °C
<i>vegfl65</i> F: CTTGCTCTATCTTTCTTTGG R: GCTGCTCTACCTCCACCATG	400	40.00	45
		60.00	45
<i>gdnf</i> F: GGATGTCGTGGCTGTCTGCCTGG R: TGCCCCTCTGGCCTCTCCGACC	300	65.20	55
		72.70	55
<i>ncaml</i> F: GCCGTGATTGTGTGTGATGT R: GCCTCGTCGTTCTTATCCAC	450	50.00	45
		55.00	45
<i>18S rRNA</i> F: AGTCCCTGCCCTTTGTACACA R: GATCCGAGGGCCTCACTAAAC	120	52.40	58
		57.10	60

Примечание – GC%: содержание GC, T_{пл}: температура плавления

2.7 Исследование миграционного потенциала лейкоцитов, трансдуцированных Ad5/F35-GFP, и экспрессии *gfp in vivo*

Эффективность продукции GFP и миграционный потенциал лейкоцитов, трансдуцированных химерным аденовирусным вектором, несущим репортерный ген зеленого флуоресцентного белка (Ad5/F35-GFP), изучали на мини-свиньях с TCM. У животных (n=3) забирали 50 мл периферической крови и готовили лейкоконцентрат, обогащенный репортерным геном *gfp*, согласно пунктам 2.5.2, 2.5.3, 2.5.4. На следующем этапе подопытным животным моделировали контузионную TCM согласно пунктам 2.2.1, 2.2.2, 2.2.3 и через 4 часа внутривенно (*v. auricularis*) вводили данный генно-клеточный препарат. Через 7 суток

подопытных животных ($n=3$) выводили из эксперимента согласно п. 2.4, выделяли сегмент спинного мозга длиной 5 см, центрированный по эпицентру повреждения, и фрагмент селезенки. Образцы спинного мозга и селезенки фиксировали в 4% параформальдегиде (Sigma), насыщали 30% раствором сахарозы и готовили криостатные срезы толщиной 20 мкм, которые монтировали на предметных стеклах. Далее, для визуализации ядер срезы инкубировали в растворе DAPI (10 мкг/мл в PBS; Sigma), заключали с помощью антифейдинговой монтирующей среды и изучали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа (LSM 510- Meta) (Zeiss, Йена, Германия).

2.8 Способ применения аутологичных лейкоцитов, трансдуцированных Ad5/35-VEGF165, Ad5/35-GDNF и Ad5/35-NCAM1, для стимулирования посттравматической регенерации спинного мозга у мини-свиней

Через 4 часа после TCM мини-свиньям из терапевтической группы ($n=4$) однократно через ушную вену вводили 30 мл генно-клеточного препарата на основе аутологичных лейкоцитов, трансдуцированных комбинацией из трех химерных аденовирусных векторов Ad5/35-VEGF165, Ad5/35-GDNF и Ad5/35-NCAM1 в равном соотношении. Животным из контрольной группы ($n=4$) через 4 часа после моделирования TCM внутривенно вводили нативный лейкоконцентрат. Интактных (здоровых) животных ($n=3$) использовали для получения референсных показателей для последующего сравнительного анализа с данными мини-свиней с TCM из контрольной и терапевтической групп.

Согласно дизайну эксперимента, подопытные животные были разделены на 4 экспериментальные группы (Таблица 3).

Таблица 3 – Экспериментальные группы животных

Группа	Манипуляции
I. Исследование миграционного потенциала лейкоцитов, трансдуцированных Ad5/F35-GFP, и экспрессии <i>gfp in vivo</i>	
GFP-группа (n=3)	Контузионная TCM, введение препарата на основе генетически модифицированных лейкоцитов, трансдуцированных аденовирусным вектором, несущий репортерный ген зеленого флуоресцирующего белка (Ad5/F35-GFP)
II. Исследование эффективности применения аутологичных лейкоцитов, трансдуцированных Ad5/35-VEGF165, Ad5/35-GDNF и Ad5/35-NCAM1	
Контрольная группа (n=4)	Контузионная TCM в условиях введения нативной взвеси аутологичных лейкоцитов
Терапевтическая группа (n=4)	Контузионная TCM в условиях введения генно-клеточного препарата на основе аутологичных лейкоцитов, трансдуцированных комбинацией из трех химерных аденовирусных векторов Ad5/35-VEGF165, Ad5/35-GDNF и Ad5/35-NCAM1 в равном соотношении
Интактная группа (n=3)	Здоровые животные без моделирования нейротравмы

2.9 Статистический анализ

Для анализа и визуализации данных гистологического исследования использовали среду для статистических вычислений R 3.4.4 (R Foundation for Statistical Computing, Вена, Австрия). Для группового сравнения применяли тест Крускала-Уоллиса совместно с тестом Данна в качестве апостериорного метода. С помощью боксплотов визуализировали выборочные распределения количественных значений. Описательная статистика представлена в виде медианы (1–3 квантили).

ГЛАВА 3 ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СПИННОМ МОЗГЕ ПОСЛЕ НЕЙРОТРАВМЫ У МИНИ-СВИНЕЙ

Для сравнительного анализа эффективности аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами с нейротрофическим действием, на посттравматическую регенерацию спинного мозга согласно дизайну эксперимента на первом этапе исследования были получены данные о патологических молекулярных и клеточных сдвигах в спинном мозге мини-свиней с ТСМ на фоне внутривенного введения нативного аутологичного лейкоконцентрата.

3.1 Неврологический статус

После моделирования контузионной ТСМ у контрольных животных было зарегистрировано резкое падение показателей двигательной активности. Неврологическое исследование мини-свиней выявило центральный тип паралича задних конечностей. Животные утратили способность к активным движениям, не могли использовать задние конечности для стояния и ходьбы. При этом наблюдался гипертонус в мышцах-разгибателях. Нарушение произвольного мочеиспускания у мини-свиней с ТСМ требовало регулярного (каждые 3 часа) опорожнения мочевого пузыря путем катетеризации.

Через три недели после нанесения травмы, у животных отсутствовала положительная динамика как в отношении функционального восстановления, так и в плане произвольного мочеиспускания. Через 4 недели после контузионной ТСМ у мини-свиней были зафиксированы первые попытки вставания с использованием передних конечностей и эпизодическое восстановление произвольного мочеиспускания. Через 5 недель контрольные мини-свиньи пытались самостоятельно встать на передние конечности, а также наблюдалась тенденция к нормализации произвольного мочеиспускания. К концу 8 недели эксперимента животные использовали исключительно передние конечности для движения,

подтягивая задние, при этом наблюдалось отсутствие попыток сгибания в суставах задних конечностей.

3.2 Сохранность серого вещества

На тотальных поперечных срезах РС и КС спинного мозга оценивали площадь патологических полостей в сером веществе задних рогов, так как в данном исследовании модель контузионной ТСМ предполагает удар металлическим стержнем по дорсальной поверхности спинного мозга.

У интактных животных относительная площадь серого вещества в нижнегрудном отделе составляет 98,78 [97,84–99,40]. У мини-свиней через 8 недель после моделирования контузионной ТСМ относительная площадь серого вещества за счет кистозных полостей уменьшалась до 95,92 [92,15–96,69] в РС, и до 70,71 [68,00–76,70] в КС ($p < 0,0001$, Рисунок 3).

3.3 Сохранность белого вещества

Сохранность белого вещества исследовали в области латерального КСТ в роstralном (ЭР) и каудальном (ЭК) фрагментах относительно эпицентра травмы.

При исследовании участка спинного мозга в проекции латерального КСТ у интактных животных патологические области не обнаружены. На 56 день после моделирования ТСМ относительная площадь кистозной дегенерации в области латерального КСТ у контрольных мини-свиней составляла 92,88 [90,25-95,63] выше эпицентра травмы и 96,22 [94,31-97,56] ниже эпицентра, соответственно (Рисунок 4).

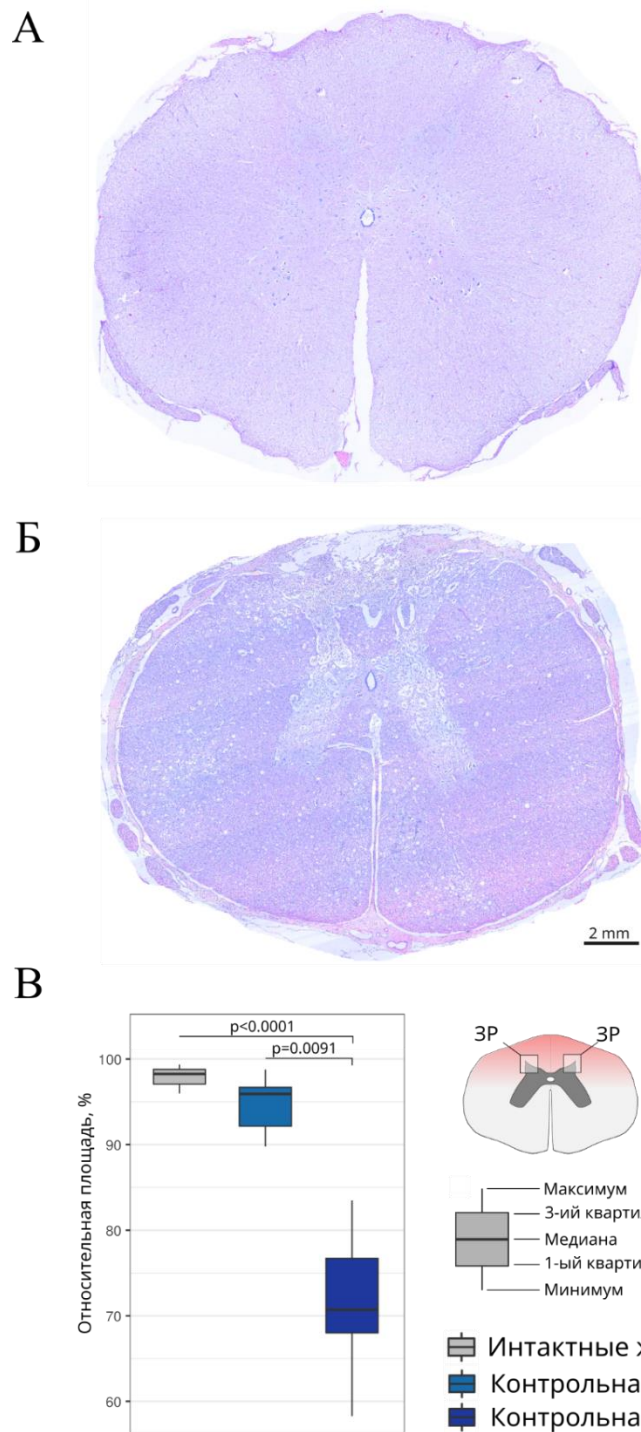


Рисунок 3 – Сохранность серого вещества спинного мозга мини-свиней из интактной и контрольной групп через 8 недель после моделирования нейротравмы. А – поперечный срез спинного мозга интактной мини-свиньи; окраска гематоксилином и эозином. Б – поперечный срез каудального сегмента спинного мозга контрольной мини-свиньи; окраска гематоксилином и эозином. В – морфометрический анализ относительной площади (%) сохранного серого вещества в ростральном (РС) и каудальном (КС) сегментах спинного мозга животных из интактной и контрольной групп. Данные представлены с помощью боксплотов.

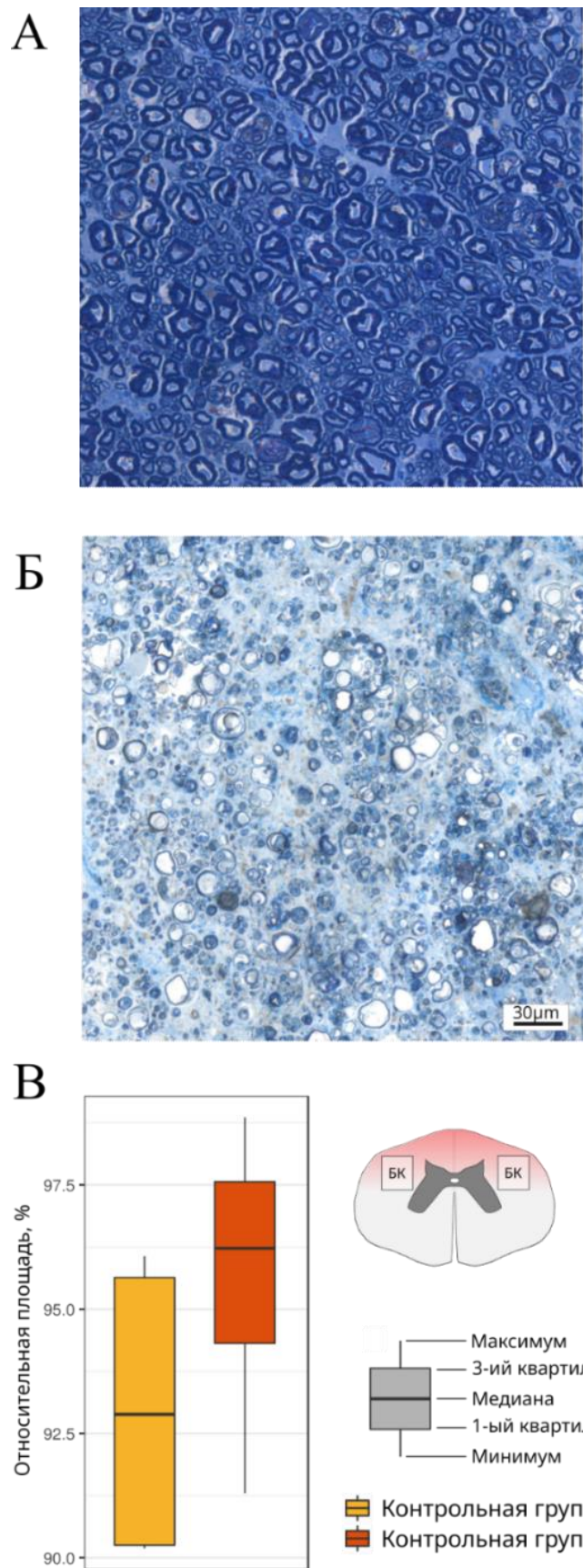


Рисунок 4 – Сохранность белого вещества спинного мозга в области латерального КСТ мини-свиней из интактной и контрольной групп через 8 недель

после моделирования нейротравмы. А – полутонкий поперечный срез бокового канатика в области латерального КСТ интактной мини-свиньи; окраска метиленовым синим. Б – полутонкий поперечный срез бокового канатика в области латерального КСТ из каудального сегмента относительно эпицентра нейротравмы контрольной мини-свиньи; окраска метиленовым синим. В – Относительная площадь кистозной дегенерации (%) белого вещества спинного мозга из рострального (ЭР) и каудального (ЭК) фрагмента относительно эпицентра нейротравмы животных из терапевтической и контрольной групп. На схеме спинного мозга квадратами обозначены анализируемые области; БК – боковой канатик. Данные представлены с помощью боксплотов.

3.4 Анализ иммунофлуоресцентного окрашивания спинного мозга

Молекулярные и клеточные изменения в задних рогах и боковых канатиках белого вещества в ростральном и каудальном сегментах спинного мозга относительно эпицентра травмы изучали с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания.

3.4.1 Маркеры стресса и апоптоза

Жизнеспособность клеток в задних рогах спинного мозга после нейротравмы оценивали с помощью АТ против Hsp27 и Caspase3. Иммунофлуоресцентный анализ задних рогов спинного мозга у контрольных мини-свиней выявил Caspase3-позитивные клетки как в РС (25,50 [24,25–26,00], так и в КС (20,50 [19,25–24,75] (Рисунок 5).

Результаты иммунофлуоресцентного исследования выявили значительное увеличение экспрессии Hsp27 у контрольных животных 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 животными из интактной группы (0,24 [0,16–0,87]) (Рисунок 6).

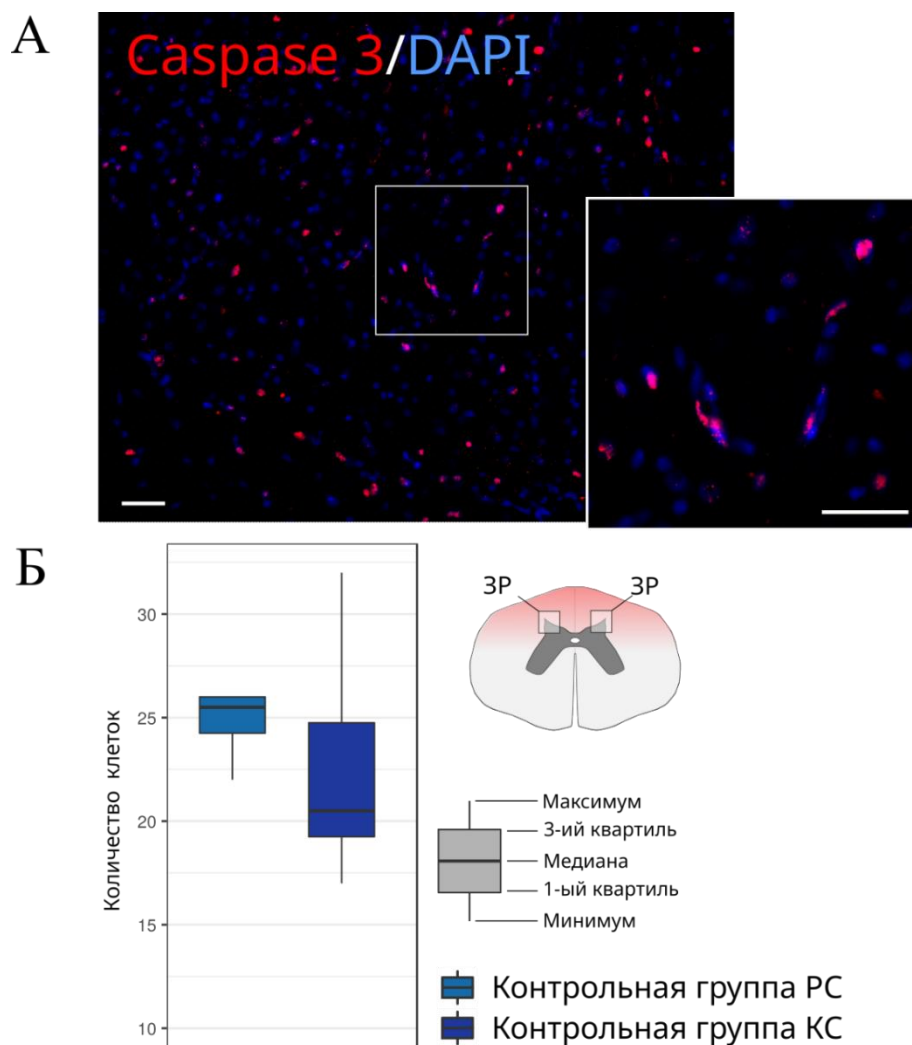


Рисунок 5 – Экспрессия проапоптозного белка (Caspase3) в задних рогах спинного мозга мини-свиней из контрольной группы через 8 недель после моделирования нейротравмы. А – Caspase3-позитивные ядра (красное свечение) в задних рогах каудального сегмента спинного мозга контрольных животных; ядра (синее свечение) докрашены DAPI. Б – Количество Caspase3-позитивных клеток в задних рогах в ростральном (РС) и каудальном (КС) сегментах спинного мозга животных из контрольной группы. На схеме спинного мозга квадратами обозначены анализируемые области; ЗР – задние рога. Данные представлены с помощью боксплотов. Масштаб: 50 мкм.

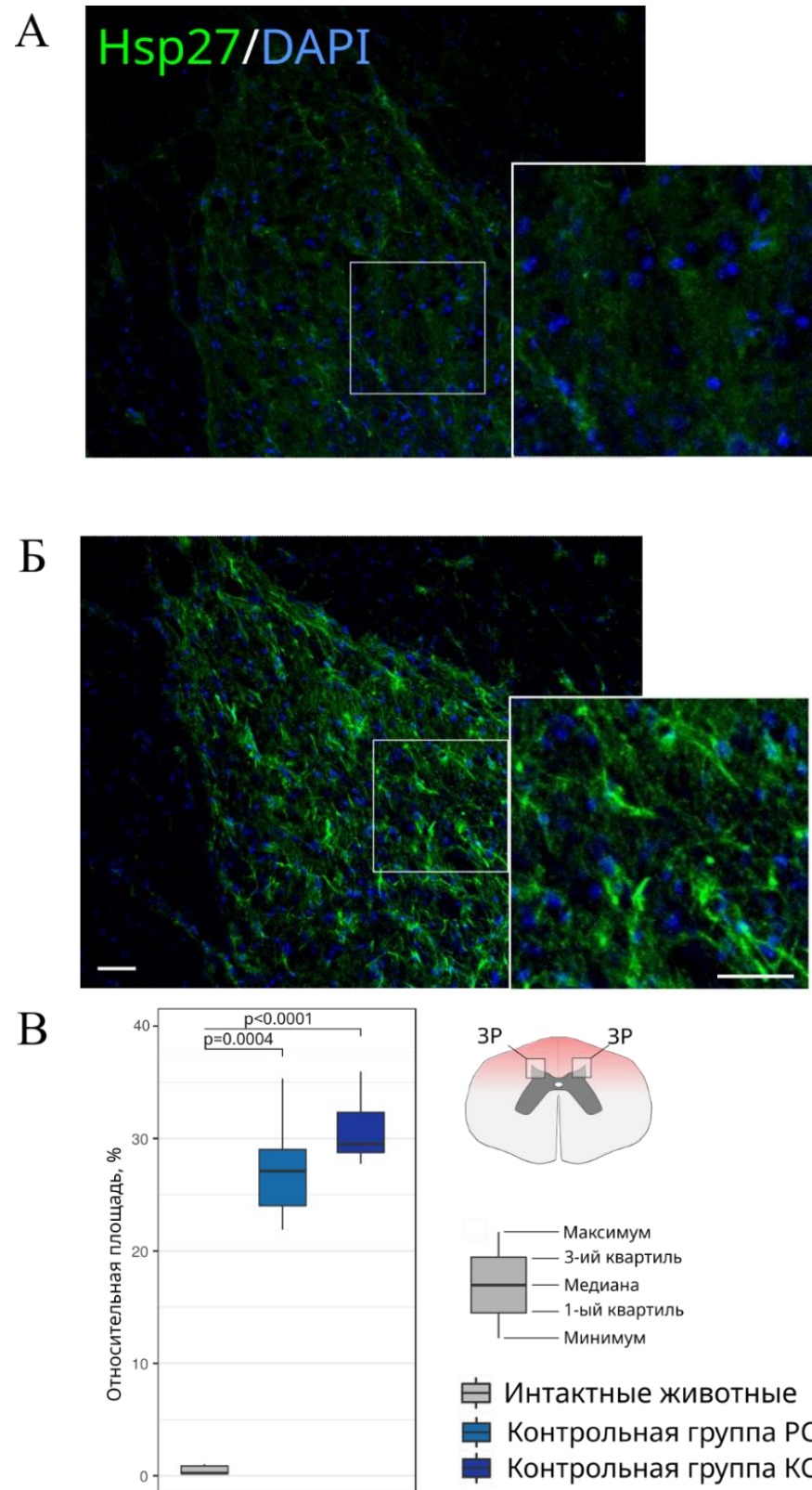


Рисунок 6 – Экспрессия белка теплового шока 27 кДа (Hsp27) в задних рогах спинного мозга мини-свиней из интактной и контрольной групп через 8 недель после моделирования нейротравмы. А – Hsp27-позитивная область (зеленое свечение) в задних рогах каудального сегмента спинного мозга интактного животного; ядра (синее свечение) докрашены DAPI. Б – Hsp27-позитивная область

(зеленое свечение) в задних рогах каудального сегмента спинного мозга контрольного животного; ядра (синее свечение) докрашены DAPI. В – Относительная Hsp27-иммунопозитивная площадь (%) в задних рогах в ростральном (РС) и каудальном (КС) сегментах спинного мозга животных из интактной и контрольной групп. На схеме спинного мозга квадратами обозначены анализируемые области; ЗР – задние рога. Данные представлены с помощью боксплотов. Масштаб: 50 мкм.

3.4.2 Экспрессия синаптических белков

Антитела против синаптофизина и белка постсинаптической плотности 95 кДа были использованы для изучения состояния синаптических контактов в задних рогах спинного мозга.

Анализ иммунофлуоресцентного исследования выявил значительное уменьшение иммунопозитивной площади синаптофизина в РС (20,01 [19,10–21,82], $p=0,0173$) и КС (13,79 [11,25–16,28], $p<0,0001$) спинного мозга контрольных животных по сравнению с интактной группой (25,23 [23,75–27,72]). У животных из контрольной группы экспрессия синаптофизина в каудальном сегменте была существенно ниже по сравнению с ростральным сегментом ($p = 0,0251$; Рисунок 7).

Значительное уменьшение PSD95-иммунопозитивной площади в КС (18,66 [16,73–22,72], $p=0,0019$) и отсутствие различий в РС выявлены у животных из контрольной группы (27,61 [16,80–31,63]) по сравнению с интактными мини-свиньями (30,31 [25,60–33,00]) (Рисунок 8).

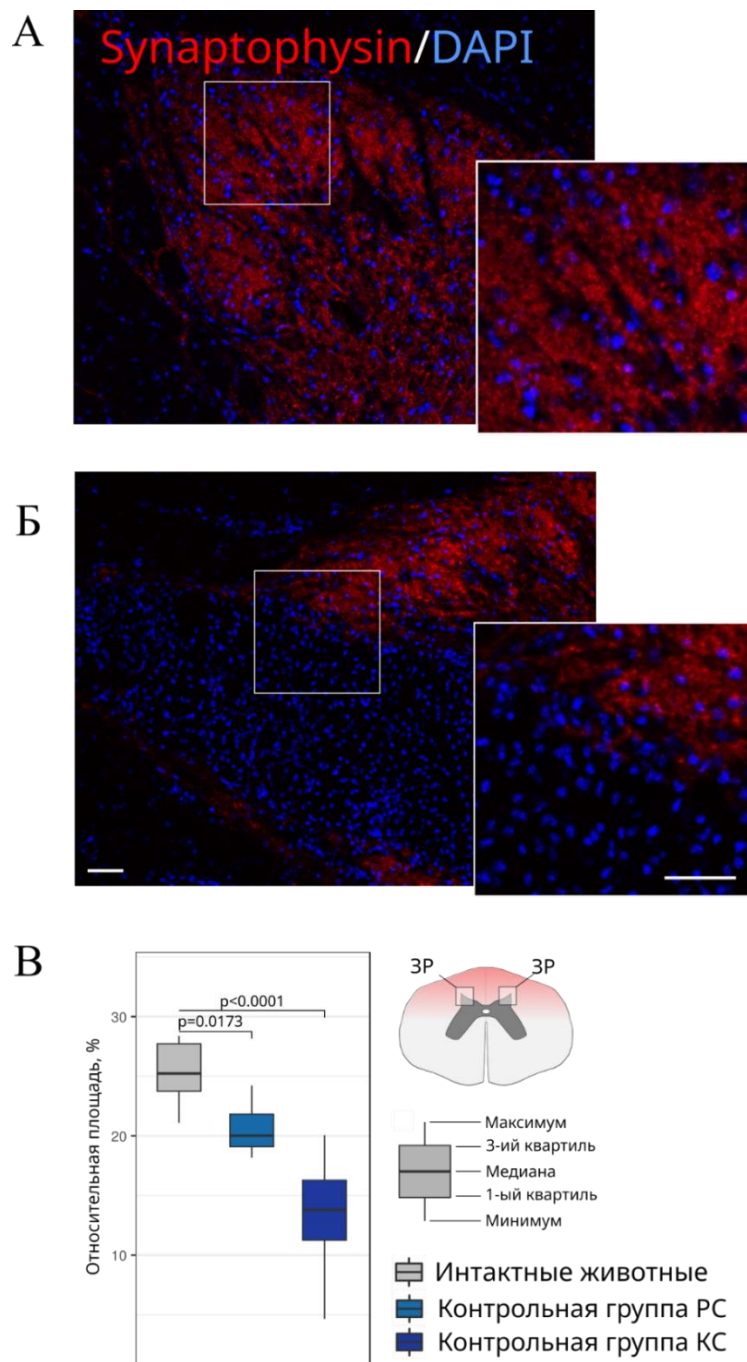


Рисунок 7 – Экспрессия белка синаптических везикул (синаптофизина) в задних рогах спинного мозга мини-свиней из интактной и контрольной групп через 8 недель после моделирования нейротравмы. А – синаптофизин-позитивная область (красное свечение) в задних рогах каудального сегмента спинного мозга интактного животного; ядра (синее свечение) докрашены DAPI. Б – синаптофизин-позитивная область (красное свечение) в задних рогах каудального сегмента спинного мозга контрольного животного; ядра (синее свечение) докрашены DAPI. В – Относительная синаптофизин-позитивная площадь (%) в задних рогах в ростральном (РС) и каудальном (КС) сегментах спинного мозга животных из интактной и контрольной групп. На схеме спинного мозга квадратами обозначены анализируемые области; ЗР – задние рога. Данные представлены с помощью боксплотов. Масштаб: 50 мкм.

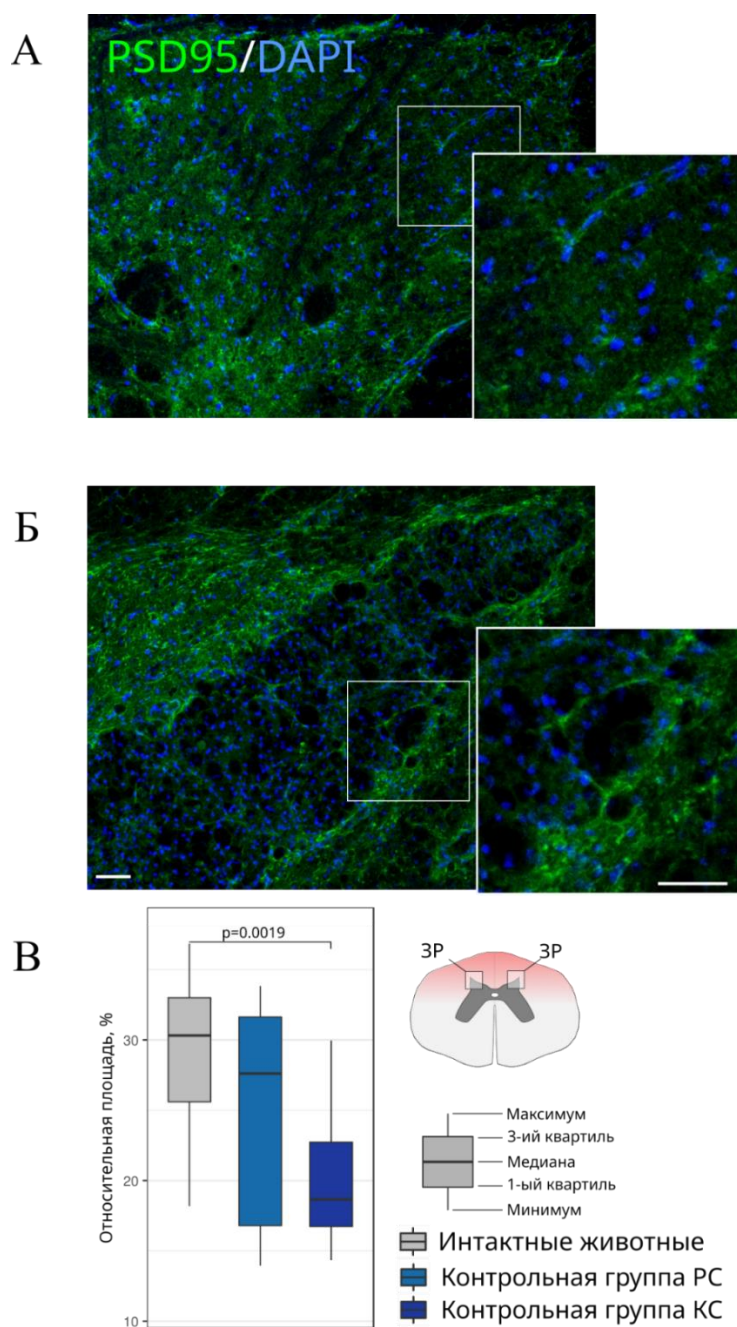


Рисунок 8 – Экспрессия белка постсинаптической плотности 95 кДа (PSD95) в задних рогах спинного мозга мини-свиней из интактной и контрольной групп через 8 недель после моделирования нейротравмы. А – PSD95-иммунопозитивная область (зеленое свечение) в задних рогах каудального сегмента спинного мозга интактного животного; ядра (синее свечение) докрашены DAPI. Б – PSD95-иммунопозитивная область (зеленое свечение) в задних рогах каудального сегмента спинного мозга контрольного животного; ядра (синее свечение) докрашены DAPI. В – Относительная PSD95-иммунопозитивная площадь (%) в задних рогах в ростральном (РС) и каудальном (КС) сегментах спинного мозга животных из интактной и контрольной групп. На схеме спинного мозга квадратами обозначены анализируемые области; ЗР – задние рога. Данные представлены с помощью боксплотов. Масштаб: 50 мкм.

3.4.3 Реакция клеток нейроглии на травму спинного мозга

Активацию астроцитов и клеток микроглии анализировали в задних рогах спинного мозга с помощью АТ против глиального фибриллярного кислого белка GFAP и против белка ионизированной Са-связывающей адаптерной молекулы 1 Iba1. Количество миелинообразующих клеток оценивали с помощью АТ против фактора транскрипции олигодендроцитов Olig2.

Реактивный астроглиоз возникает при активации клеток микроглии и астроцитов. Иммунофлуоресцентное окрашивание задних рогов спинного мозга АТ против глиального фибриллярного кислого белка обнаружило увеличение GFAP-иммунопозитивной площади у контрольных мини-свиней в РС (12,75 [10,83–13,84], $p=0,0105$) и в КС (12,53 [11,69–13,73], $p=0,0173$) по сравнению с интактными животными (6,23 [4,36–8,73]) (Рисунок 9).

Иммунофлуоресцентное исследование реактивности клеток микроглии продемонстрировало увеличение Iba1-иммунопозитивной площади в контрольной группе 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 мини-свиньями из интактной группы (26,10 [23,89–28,09]) (Рисунок 10).

На тотальных поперечных срезах РС и КС в области латерального КСТ оценивали количество миелинообразующих олигодендроцитов. Было выявлено значительное снижение числа Olig2-позитивных олигодендроглиальных клеток в контрольной группе как в РС (13,50 [13,00–14,75], $p=0,0303$), так и в КС (10,50 [10,00–11,75], $p=0,0016$) по сравнению с интактной группой (24,50 [24,00–25,00]) (Рисунок 11).

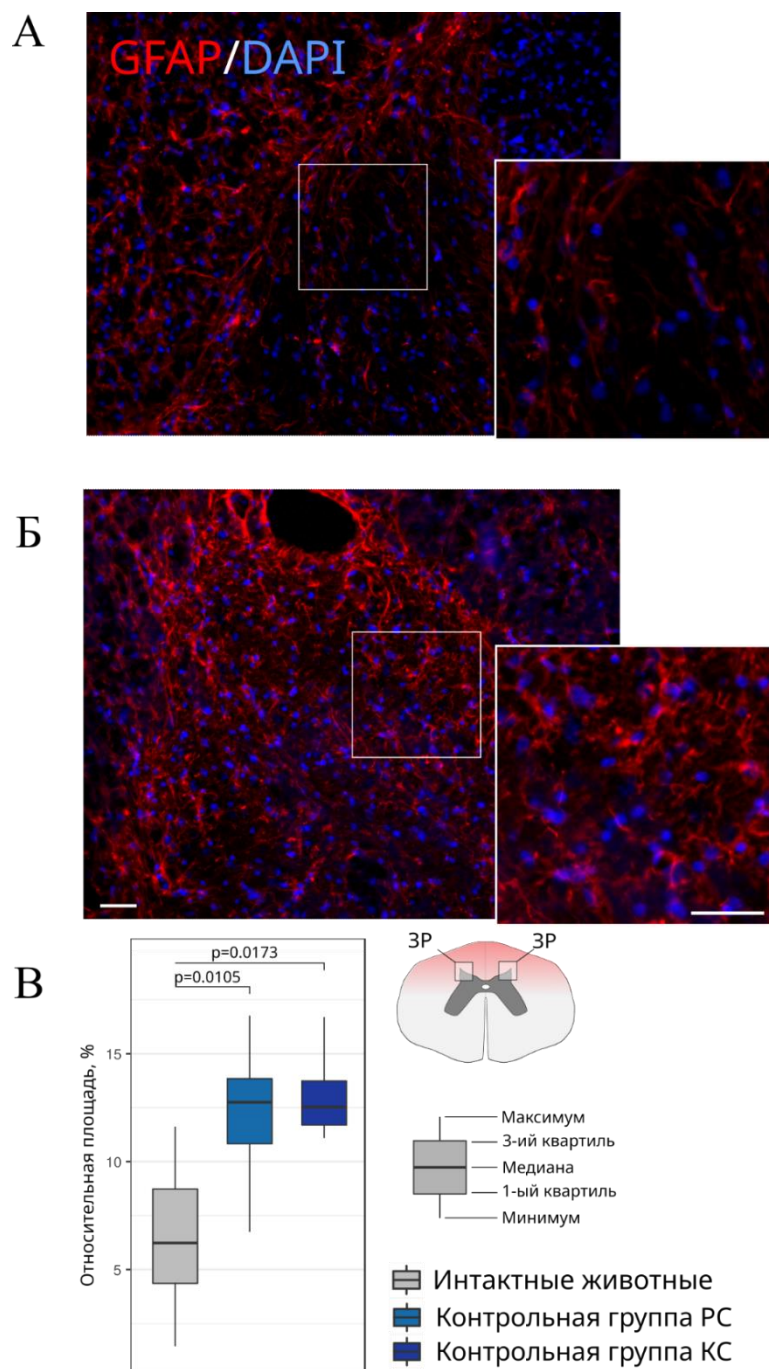


Рисунок 9 – Экспрессия глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) в задних рогах спинного мозга мини-свиней из интактной и контрольной групп через 8 недель после моделирования нейротравмы. А – GFAP-иммунопозитивная область (красное свечение) в задних рогах каудального сегмента спинного мозга интактного животного; ядра (синее свечение) докрашены DAPI. Б – GFAP-иммунопозитивная область (красное свечение) в задних рогах каудального сегмента спинного мозга контрольного животного; ядра (синее свечение) докрашены DAPI. В – морфометрический анализ относительной GFAP-иммунопозитивной площади (%) в задних рогах в ростральном (РС) и каудальном (КС) сегментах спинного мозга животных из интактной и контрольной групп. На схеме спинного мозга квадратами обозначены анализируемые области; ЗР – задние рога. Данные представлены с помощью боксплотов. Масштаб: 50 мкм.

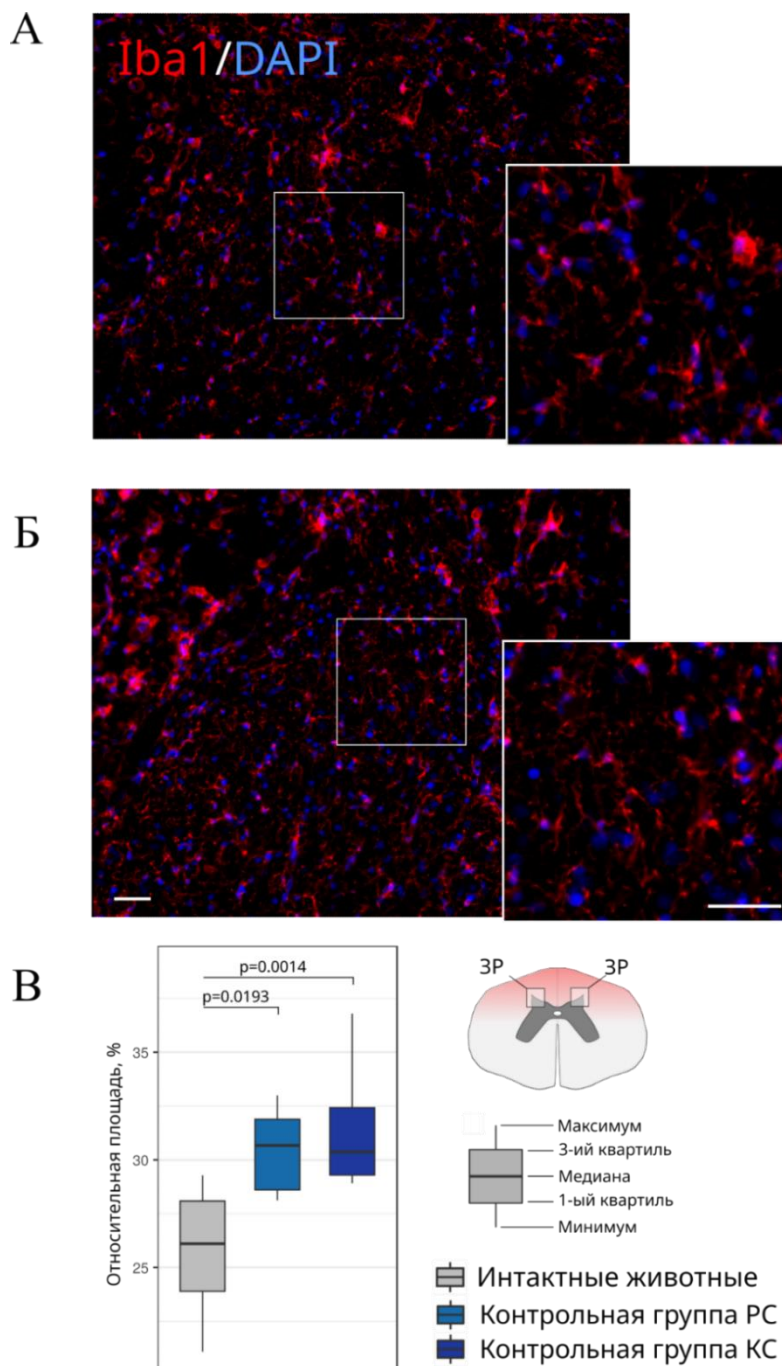


Рисунок 10 – Экспрессия ионизированной кальций-связывающей адаптерной молекулы 1 (Iba1) в задних рогах спинного мозга мини-свиней из интактной и контрольной групп через 8 недель после моделирования нейротравмы. А – Iba1-иммунопозитивная область (красное свечение) в задних рогах каудального сегмента спинного мозга интактного животного; ядра (синее свечение) докрашены DAPI. Б – Iba1-иммунопозитивная область (красное свечение) в задних рогах каудального сегмента спинного мозга контрольного животного; ядра (синее свечение) докрашены DAPI. В – Относительная Iba1-иммунопозитивная площадь (%) в задних рогах в ростральном (РС) и каудальном (КС) сегментах спинного мозга животных из интактной и контрольной групп. На схеме спинного мозга квадратами обозначены анализируемые области; ЗР – задние рога. Данные представлены с помощью боксплотов. Масштаб: 50 мкм.

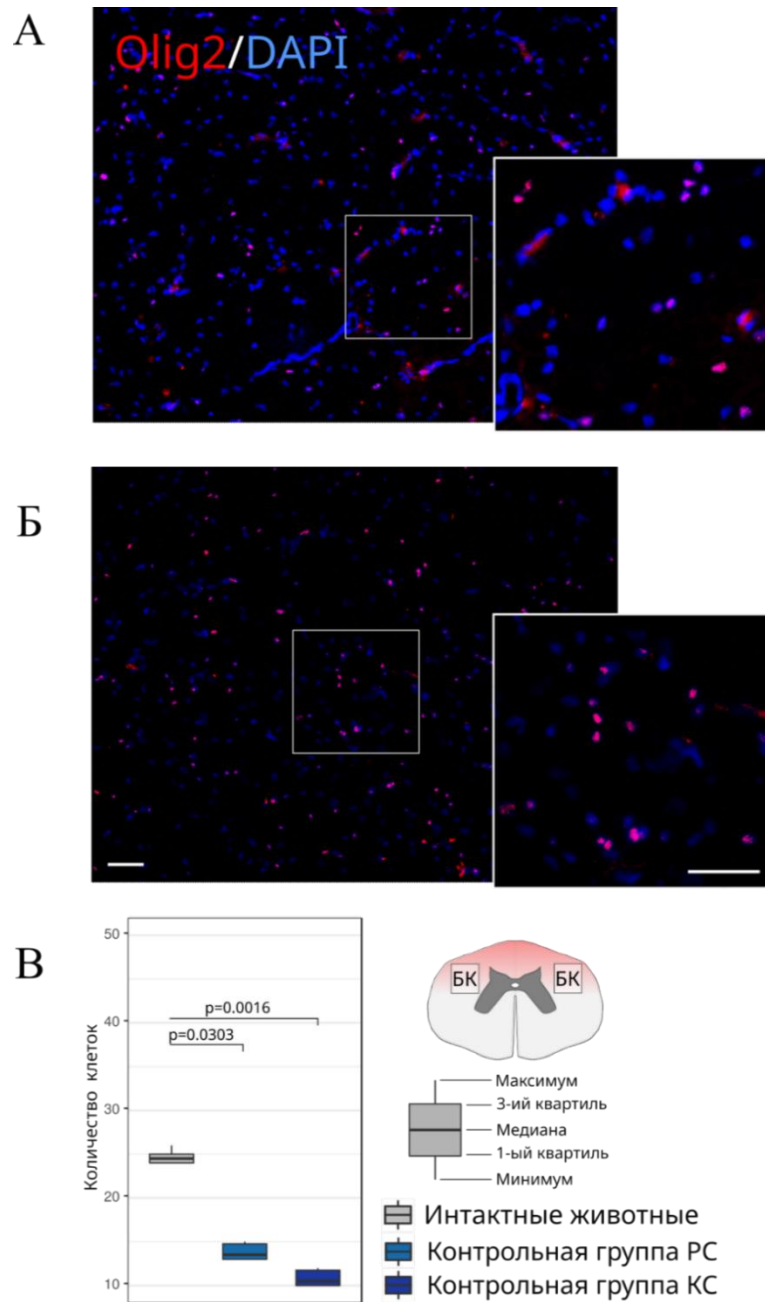


Рисунок 11 – Экспрессия Olig2 в области латерального КСТ боковых канатиков спинного мозга мини-свиней из интактной и контрольной групп через 8 недель после моделирования нейротравмы. А – Olig2-позитивные ядра (красное свечение) в области латерального КСТ в каудальном сегменте спинного мозга интактного животного; ядра (синее свечение) окрашены DAPI. Б – Olig2-позитивные ядра (красное свечение) в области латерального КСТ в каудальном сегменте спинного мозга контрольного животного; ядра (синее свечение) докрашены DAPI. В – Количество Olig2-позитивных ядер в области латерального КСТ в ростральном (РС) и каудальном (КС) сегментах спинного мозга животных интактной и контрольной групп. На схеме спинного мозга квадратами обозначены анализируемые области; БК – боковые канатики. Данные представлены с помощью боксплотов. Масштаб: 50 мкм.

3.4.4 Сохранность аксонов

Сохранность аксонов оценивали в белом веществе бокового канатика в области латерального КСТ на продольных срезах, полученных из ЭР и ЭК фрагментов спинного мозга, с использованием АТ к специфическому для нейронов тубулину (β III-тубулин).

Иммунофлуоресцентное исследование выявило, что β III-тубулин-иммунопозитивная площадь была значительно уменьшена в ЭК в контрольной группе (10,0 [8,41–11,48], $p < 0,0001$) по сравнению с интактной группой (17,70 [15,89–19,79]). В ЭР у животных из контрольной группы (14,74 [12,81–16,43]) β III-тубулин-иммунопозитивная область не отличалась от таковой у интактных мини-свиней (Рисунок 12).

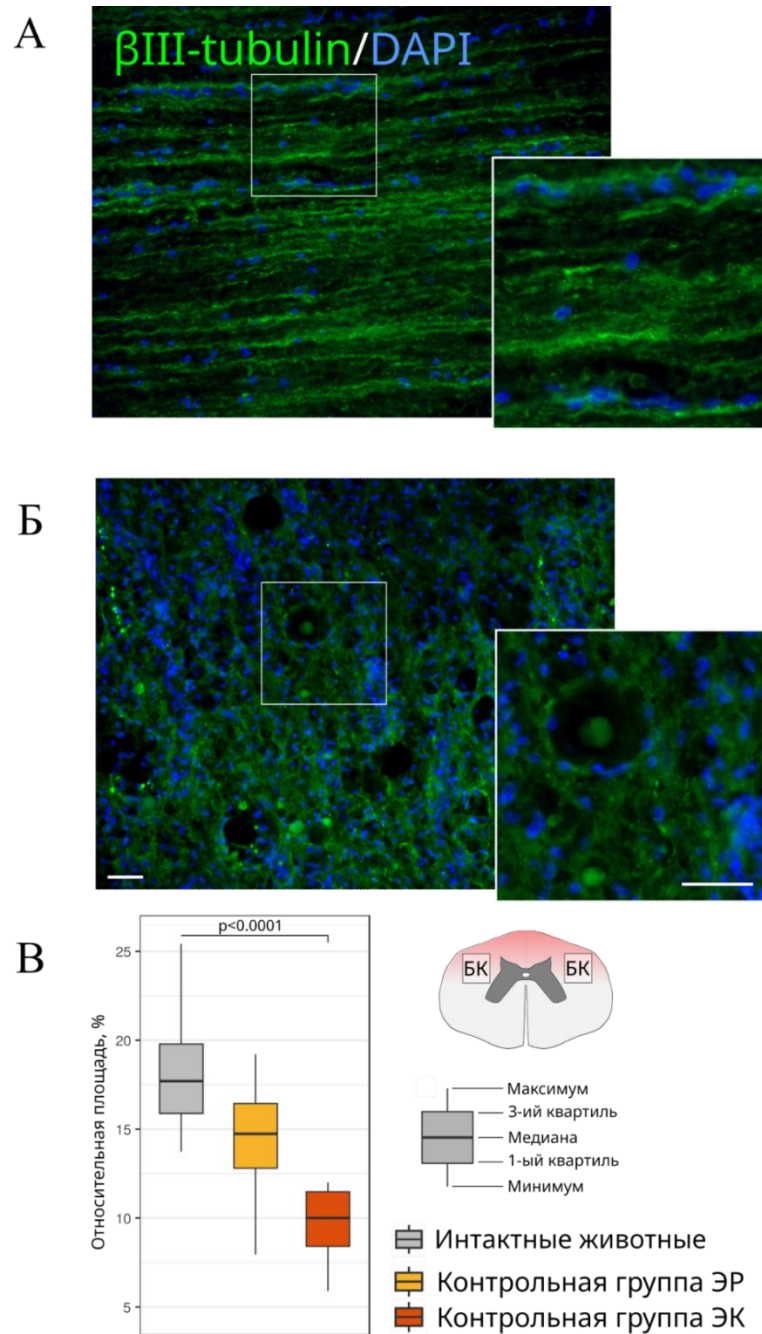


Рисунок 12 – Экспрессия β III-тубулина в боковых канатиках в области латерального КСТ спинного мозга мини-свиней из интактной и контрольной групп через 8 недель после моделирования нейротравмы. А – β III-тубулин-иммунопозитивная область (зеленое свечение) в боковых канатиках в области латерального КСТ спинного мозга интактного животного; ядра (синее свечение) докрашены DAPI. Б – β III-тубулин-позитивная область (зеленое свечение) в боковых канатиках в области латерального КСТ спинного мозга контрольного животного; ядра (синее свечение) докрашены DAPI. В – Относительная β III-тубулин-иммунопозитивная площадь (%) в области латерального КСТ в ростральном (ЭР) и каудальном (ЭК) фрагментах спинного мозга животных из интактной и контрольной групп. На схеме спинного мозга квадратами обозначены анализируемые области; БК – боковые канатики. Данные представлены с помощью боксплотов. Масштаб: 50 мкм.

ГЛАВА 4 СТИМУЛИРОВАНИЕ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ СПИННОГО МОЗГА С ПОМОЩЬЮ АУТОЛОГИЧНОГО ЛЕЙКОКОНЦЕНТРАТА, ОБОГАЩЕННОГО ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМИ ГЕНАМИ С НЕЙРОТРОФИЧЕСКИМ ДЕЙСТВИЕМ

4.1 Анализ экспрессии рекомбинантных генов в лейкоцитах мини- свиньи *in vitro*

4.1.1 Общая характеристика лейкоконцентрата, трансдуцированного аденовирусным вектором, несущим репортерный ген зеленого флуоресцентного белка

Общий анализ генно-клеточного препарата на основе лейкоцитов, трансдуцированных аденовирусным вектором, несущим репортерный ген зеленого флуоресцентного белка, 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 (Таблица 4).

Таблица 4 – Исследование нативной периферической крови и генно-клеточного препарата на основе лейкоцитов, трансдуцированных аденовирусами, несущими репортерный ген зеленого флуоресцентного белка (Ad5/F35-GFP) до внутривенной аутоинфузии мини-свинье

Образец	WBC ($\times 10^9$ кл/л)	RBC ($\times 10^{12}$ кл/л)	HGB (г/л)	HCT (%)	PLT ($\times 10^9$ кл/л)	LYM (%)	MON (%)	GRAN (%)	Объем (мл)
Периферическая кровь	8,3 ±	4,54 ±	74,75	25±	265,75±	51,75±	5,75±	42±	130±
	1,77	1,52	± 24,6	7,93	5,72	24,23	2,06	25,87	17,32
Препарат-GFP	14,8±	1,18±	19,25±	8.1±	246±	73,75±	2,5±	23,75±	26±0
	2,07	0,84	12,84	5,68	67,46	8,42	1	7,93	

Примечание – Препарат GFP – генно-клеточный препарат на основе лейкоцитов, трансдуцированных аденовирусами, несущими репортерный ген зеленого

флуоресцентного белка (Ad5/F35-GFP); WBC – лейкоциты; RBC – эритроциты, HGB – гемоглобин; HCT – гематокрит; PLT – тромбоциты; LYM – лимфоциты; MON – моноциты; GRAN – гранулоциты

Количество лимфоцитов было примерно равным, а количество эритроцитов было в 19 раз ниже ($P = 0,001$) в полученном препарате по сравнению с периферической кровью. Значительно сниженное количество эритроцитов в лейкоконцентрате позволяет эффективно трансдуцировать лейкоциты непосредственно в гематологическом контейнере.

4.1.2 Экспрессия репортерного гена зеленого флуоресцентного белка в лейкоцитах, трансдуцированных Ad5/F35-GFP

Эффективность трансдукции лейкоцитов мини-свиньи определяли с помощью флуоресцентного окрашивания и метода проточной цитометрии.

Для изучения экспрессии гена зеленого флуоресцентного белка *in vitro* образцы лейкоцитов после трансдукции с помощью Ad5/F35-GFP культивировали в течение 72 часов. Флуоресцентная микроскопия с использованием зеленого канала выявила GFP-положительные лейкоциты с интенсивной зеленой флуоресценцией, которые были окружены негативными эритроцитами. GFP-положительные клетки по их размеру и морфологии были классифицированы как моноциты и лимфоциты (Рисунок 13 А).

Методом проточной цитометрии было показано, что в образцах лейкоконцентрата, обогащенного геном *gfp*, 0,6% лейкоцитов эффективно продуцируют зеленый флуоресцентный белок. Таким образом, через 3 дня после трансдукции лейкоцитов мини-свиньи аденовирусным вектором Ad5/F35-GFP при $MOI = 10$, полученный генно-клеточный препарат содержал 0,6% GFP-положительных лейкоцитов (Рисунок 13 Б).

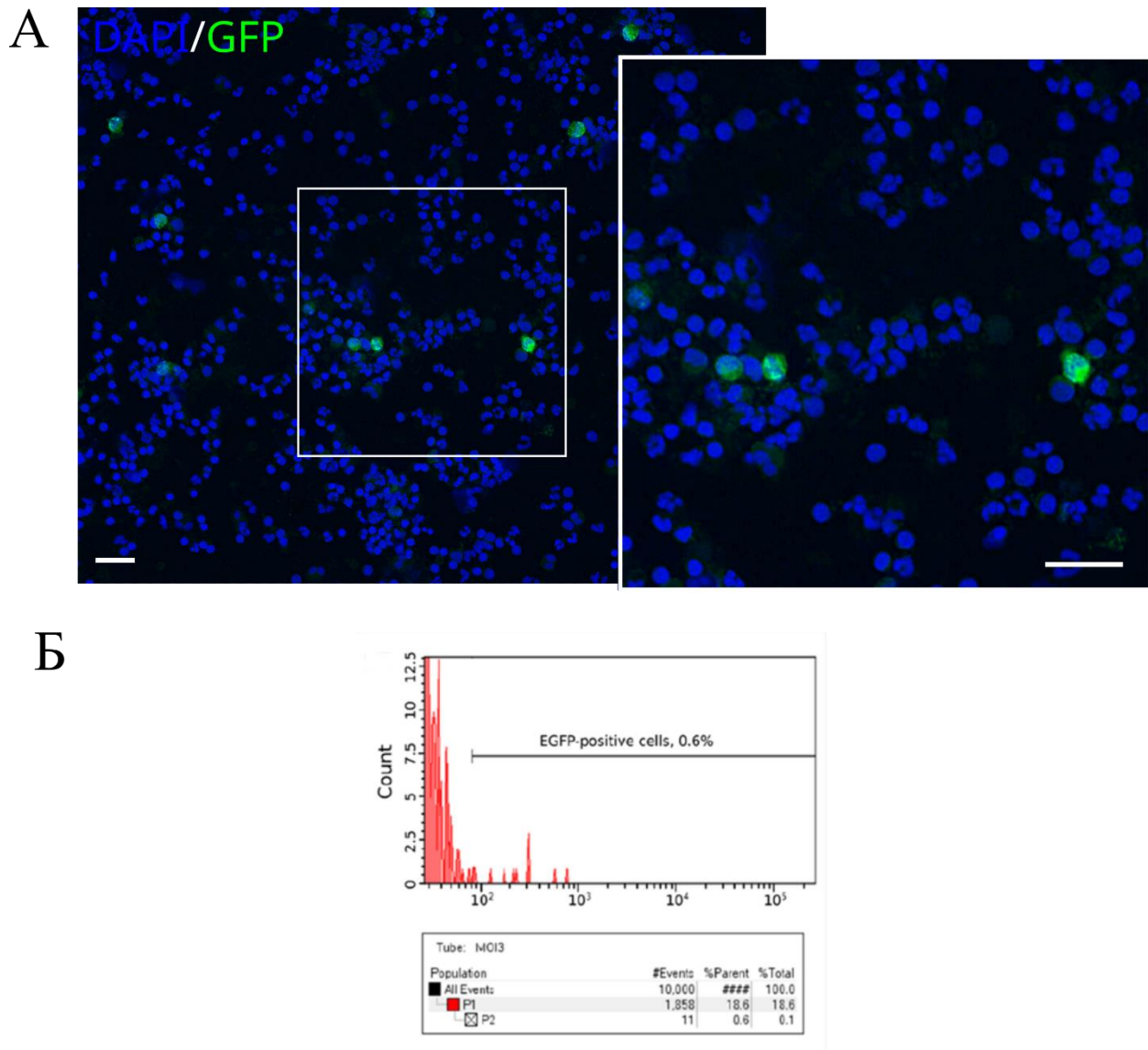


Рисунок 13 – Исследование экспрессии репортерного гена зеленого флуоресцентного белка в лейкоцитах мини-свиньи *in vitro* через 72 часа после трансдукции аденовирусным вектором Ad5/F35-GFP (MOI = 10). (А) Флуоресцентная микроскопия демонстрирует присутствие GFP-положительных лейкоцитов в культуре клеток, масштаб: 50 мкм. (Б) Проточная цитофлуориметрия в образце лейкоконцентрата, обогащенного геном *gfp*, выявила 0,6% GFP-положительных лейкоцитов.

4.1.3 Общая характеристика лейкоконцентрата, трансдуцированного аденовирусными векторами, несущими терапевтические гены *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*

Клеточный анализ генно-клеточного препарата на основе лейкоцитов мини-свиньи, трансдуцированных комбинацией аденовирусных векторов Ad5/35-

VEGF165, Ad5/35-GDNF и Ad5/35-NCAM1 в равном соотношении показал схожие показатели по сравнению с генно-клеточным препаратом на основе лейкоцитов мини-свиньи и Ad5/F35-GFP (Таблица 5).

Таблица 5 – Исследование нативной периферической крови и генно-клеточного препарата на основе аутологичных лейкоцитов, трансдуцированных аденовирусами Ad5/35-VEGF165, Ad5/35-GDNF и Ad5/35-NCAM1 в равном соотношении до внутривенной инфузии мини-свинье

Образец	WBC ($\times 10^9$ кл/л)	RBC ($\times 10^{12}$ кл/л)	HGB (г/л)	HCT (%)	PLT ($\times 10^9$ кл/л)	LYM (%)	MON (%)	GRAN (%)	Объем (мл)
Периферическая кровь	9,6 $\pm$	4,24 $\pm$	79,79	24 $\pm$	366,21 $\pm$	49,75 $\pm$	4,28 $\pm$	45,97 $\pm$	127 $\pm$
	1,62	1,67	$\pm 22,3$	5,33	10,99	24,23	2,06	19,69	19,49
ГКП	13,4 $\pm$	1,08 $\pm$	14,65 $\pm$	7,8 $\pm$	346 $\pm$	77,75 $\pm$	3,50 $\pm$	18,75 $\pm$	26 ± 0
	1,88	0,54	10,80	5,48	42,56	8,42	1,00	5,21	

Примечание – ГКП – препарат на основе генетически модифицированных лейкоцитов, трансдуцированных аденовирусами Ad5/35-VEGF165, Ad5/35-GDNF и Ad5/35-NCAM1; WBC – лейкоциты; RBC – эритроциты, HGB – гемоглобин; HCT – гематокрит; PLT – тромбоциты; LYM – лимфоциты; MON – моноциты; GRAN – гранулоциты

4.1.4 Экспрессия рекомбинантных генов *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1* в лейкоцитах, трансдуцированных комбинацией аденовирусных векторов Ad5/35-VEGF165, Ad5/35-GDNF и Ad5/35-NCAM1 в равном соотношении

Эффективность трансдукции лейкоцитов терапевтическими генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1* была подтверждена методом ПЦР-РВ. Установлено, что уровень относительной экспрессии мРНК генов *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1* при одновременной трансдукции тремя аденовирусными векторами (MOI=10) был увеличен в $3,2 \pm 1,2$ для *vegfl65*, в $3,0 \pm 1,5$ для *gdnf* и в $5,5 \pm 1,7$ для *ncam1* раз по сравнению с нетрансдуцированными лейкоцитами (Рисунок 14).

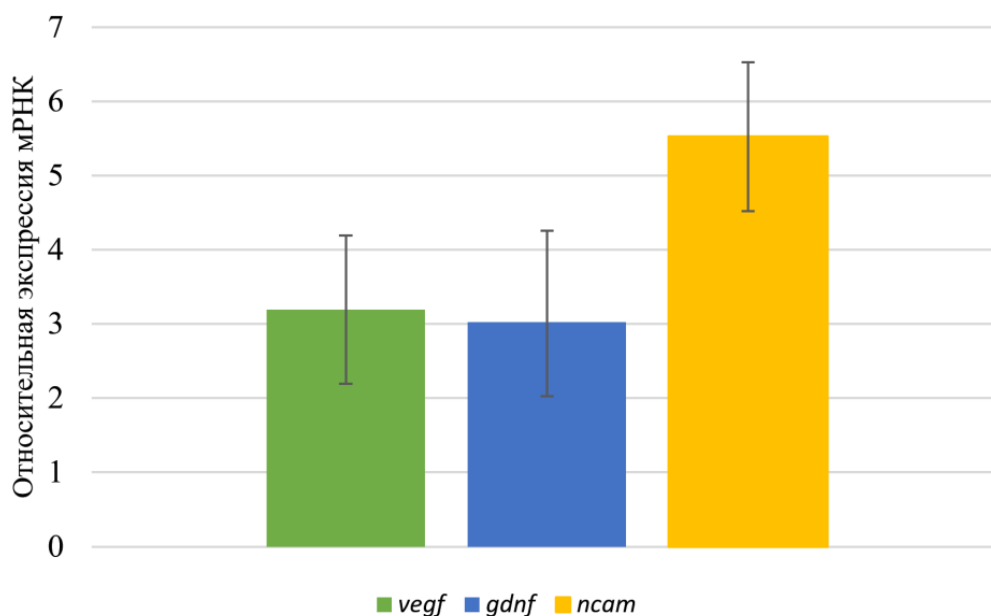


Рисунок 14 – Относительная экспрессия мРНК генов *vegf165*, *gdnf* и *ncsm1* в лейкоцитах мини-свиньи через 72 часа после трансдукции комбинацией аденовирусных векторов Ad5/35-VEGF165, Ad5/35-GDNF и Ad5/35-NCAM1 в равном соотношении. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение. Интактный контроль принят за единицу. Нормализация по гену 18S.

4.2 Анализ продукции GFP в аутологичных лейкоцитах *in vivo* и миграционного потенциала лейкоцитов, продуцирующих зеленый флуоресцентный белок

Экспрессию репортерного гена *gfp* изучали с помощью флуоресцентной микроскопии через 7 суток в спинном мозге мини-свиней после моделирования ТСМ и последующей внутривенной аутоинфузии лейкоконцентрата, обогащенного геном *gfp*. В роstralном, каудальном сегментах и в эпицентре спинного мозга были обнаружены GFP-позитивные клетки. В каждом изученном поперечном срезе спинного мозга толщиной 20 мкм можно было обнаружить одну или две GFP-позитивные клетки. Морфология GFP-позитивных клеток соответствовала мононуклеарным лейкоцитам с округлыми ядрами (Рисунок 15 А).

Исследование гистологических срезов селезенки с помощью флуоресцентной микроскопии также показало присутствие GFP-позитивных клеток в паренхиме

органа (Рисунок 15 Б).

Таким образом, лейкоциты, трансдуцированные Ad5/35-GFP после внутривенной аутоинфузии могут циркулировать в кровотоке по всему организму, а также мигрировать в область контузионной ТСМ, заселять селезенку и эффективно продуцировать зеленый флуоресцентный белок.

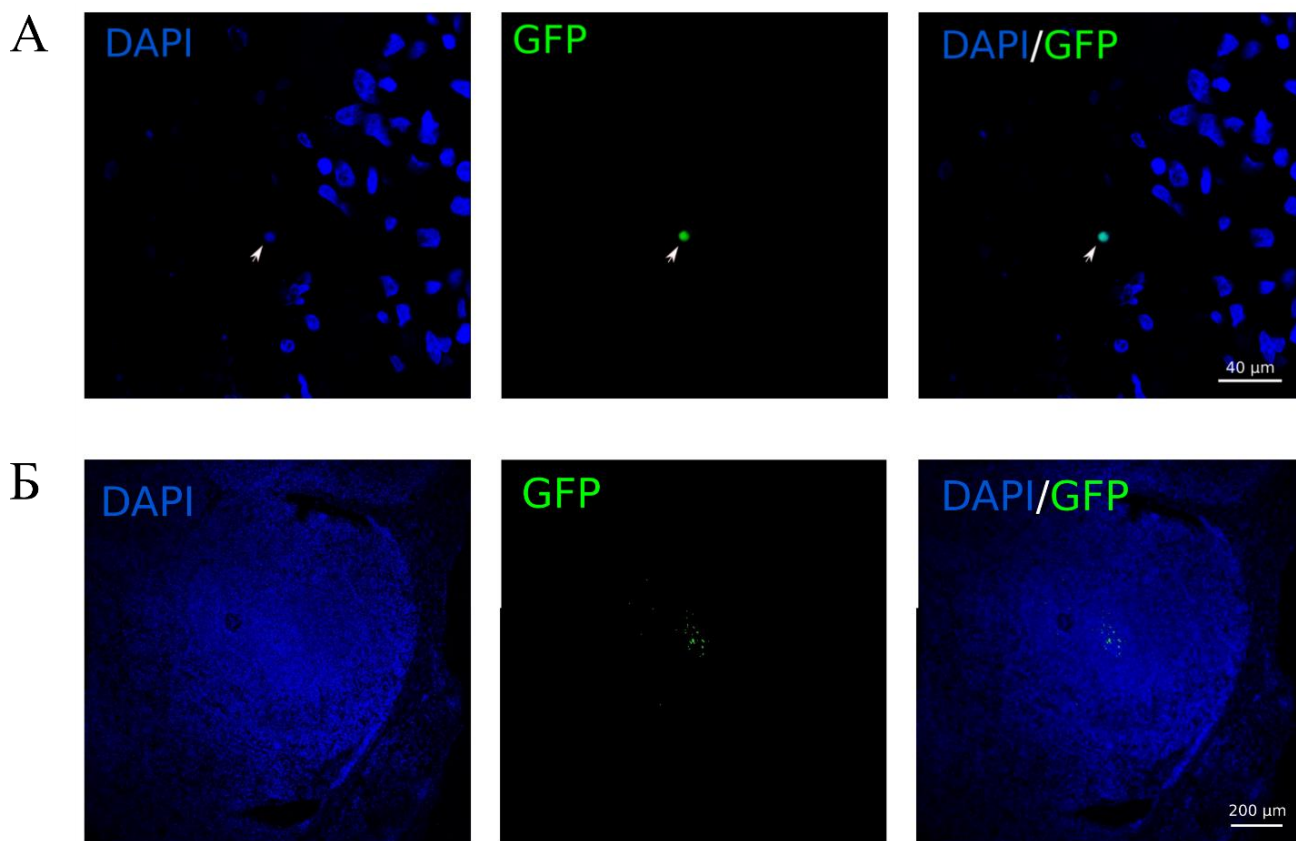


Рисунок 15 – Флуоресцентная микроскопия спинного мозга (А) и селезенки (Б) мини-свиньи через 7 дней после моделирования нейротравмы и последующей аутоинфузии лейкоцитов, обогащенных геном зеленого флуоресцентного белка. В спинном мозге на уровне контузионной травмы и в селезенке представлены GFP-позитивные лейкоциты. Цветовые каналы: зеленый – GFP; синий – DAPI.

4.3 Посттравматическая регенерация спинного мозга мини-свиней после ТСМ в условиях внутривенного введения аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного терапевтическими генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*

Согласно дизайну эксперимента, мини-свиньям через 4 часа после

моделирования контузионной ТСМ внутривенно вводили аутологичный лейкоконцентрат, обогащенный терапевтическими генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*. Анализ эффективности генно-клеточного препарата на посттравматическую регенерацию спинного мозга проводили в сравнении с результатами, полученными в исследованиях на мини-свиньях с ТСМ на фоне внутривенного введения нативного аутологичного лейкоконцентрата.

4.3.1 Неврологический статус

При неврологическом осмотре через неделю после моделирования контузионной ТСМ у животных из терапевтической группы, как и у животных из контрольной группы был выявлен центральный тип паралича задних конечностей, а также задержка мочи в результате невозможности произвольного мочеиспускания. Через 3 недели после операции у животных наблюдались попытки подтягивания задних конечностей к телу и также первые попытки мочеиспускания в малых объемах. К этому сроку у животных из контрольной группы неврологический статус оставался без изменений. Через 4 недели после ТСМ мини-свиньи из терапевтической группы уже могли самостоятельно стоять на четырех конечностях. Контрольные животные в это время делали лишь первые попытки подняться на передние конечности. Через 5 недель у животных из терапевтической группы восстановился нормальный характер мочеиспускания, и они демонстрировали активность в тазобедренном суставе, в то время как у контрольных мини-свиней отмечались лишь попытки самостоятельного подъема на передние конечности, а нормализация мочеиспускания находилась на начальной стадии. Через 7 недель после ТСМ наблюдалось дальнейшее улучшение поведенческих показателей у мини-свиней из терапевтической группы (больше попыток встать на четыре конечности, более длительное нахождение в положении стоя, сгибание задней конечности в коленном суставе). У контрольных животных восстанавливалось мочеиспускание и способность стоять на четырех конечностях. Через 8 недель после операции мини-свиньи из терапевтической группы демонстрировали успешные попытки стоять и ходить на четырех конечностях,

активность в тазобедренных, коленных и голеностопных суставах. В это же время у мини-свиней из контрольной группы отсутствовало сгибание в суставах задних конечностей, и они могли перемещаться, используя только передние конечности, волооча задние.

4.3.2 Сохранность серого вещества

Морфометрический анализ выявил разницу между сохранной областью серого вещества в РС и КС спинного мозга экспериментальных животных (Рисунок 16). Сохранная площадь серого вещества не отличалась между контрольной (95,92 [92,15–96,69]) и терапевтической группами (95,73 [90,57–98,43]) в РС. В КС у мини-свиней из терапевтической группы сохранность серого вещества была лучше (98,13 [96,73–98,45]) по сравнению с таковой у контрольных животных (70,71 [68,00–76,70]), $p < 0,0001$).

4.3.3 Сохранность белого вещества

Морфометрический анализ сохранности белого вещества в области латерального КСТ в ЭР и ЭК фрагментах спинного мозга относительно эпицентра травмы не выявил различий между терапевтической и контрольной группами ($P = 0,4397$; Рисунок 17).

4.3.4 Иммунофлуоресцентный анализ спинного мозга

4.3.4.1 Маркеры стресса и апоптоза

Было выявлено, что у контрольных мини-свиней количество Caspase3-позитивных клеток в задних рогах 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 задних рогах 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]) ($p > 0,05$); Рисунок 18).

А



Б

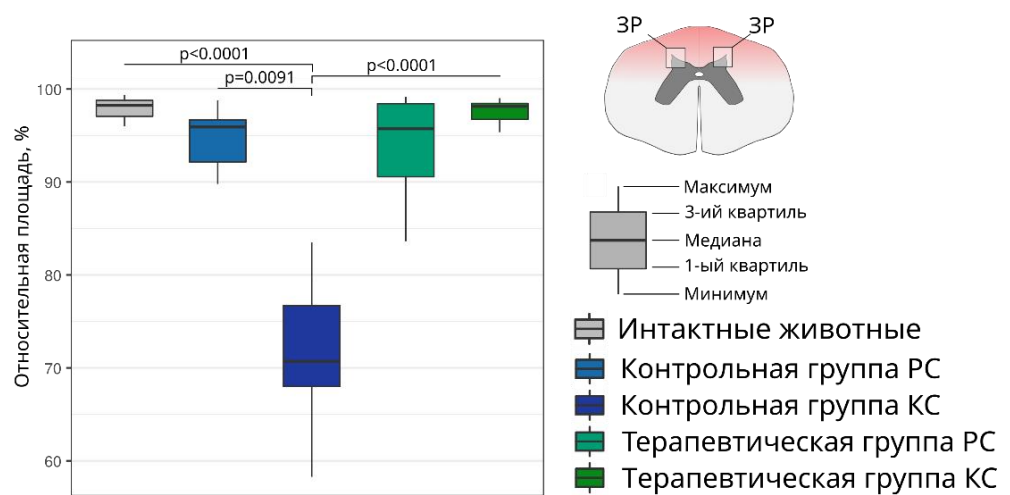
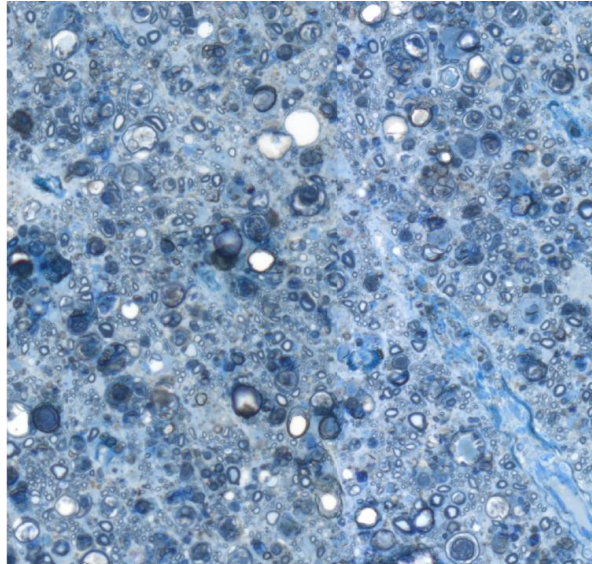


Рисунок 16 – Сохранность серого вещества спинного мозга мини-свиней через 8 недель после моделирования нейротравмы. А – поперечный срез каудального сегмента спинного мозга мини-свиньи из терапевтической группы; окраска гематоксилином и эозином. Б – Относительная площадь (%) сохранного серого вещества в ростральном (РС) и каудальном (КС) сегментах спинного мозга подопытных животных. Данные представлены с помощью боксплотов.

А



Б

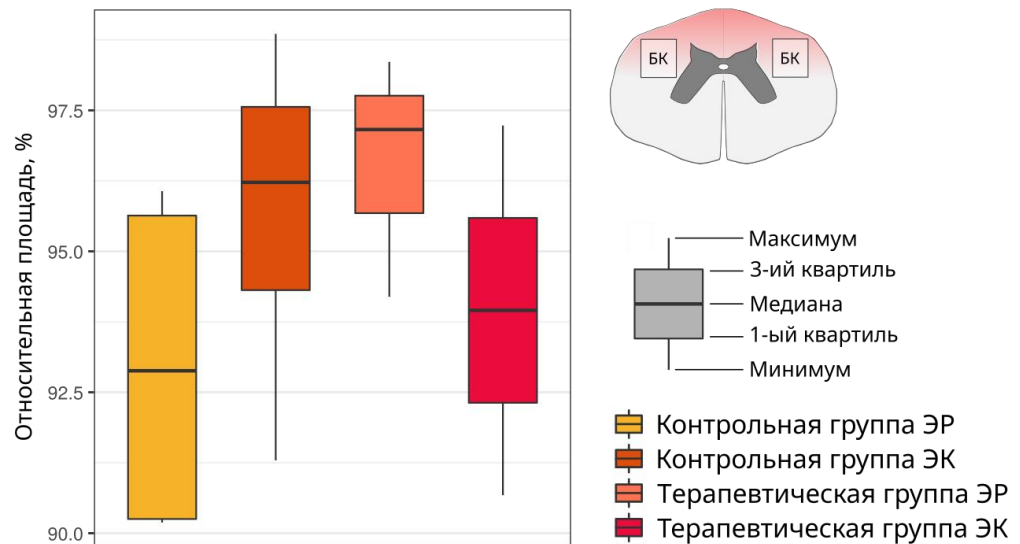


Рисунок 17 – Сохранность белого вещества спинного мозга в области латерального КСТ мини-свиней через 8 недель после моделирования нейротравмы. А –полутонкий поперечный срез бокового канатика в области латерального КСТ из каудального сегмента относительно эпицентра нейротравмы мини-свиньи из терапевтической группы; окраска метиленовым синим. Б – Относительная площадь кистозной дегенерации (%) белого вещества спинного мозга подопытных из роstralного (ЭР) и каудального (ЭК) фрагментов относительно эпицентра нейротравмы. На схеме спинного мозга квадратами обозначены анализируемые области; БК – боковой канатик. Данные представлены с помощью боксплотов.

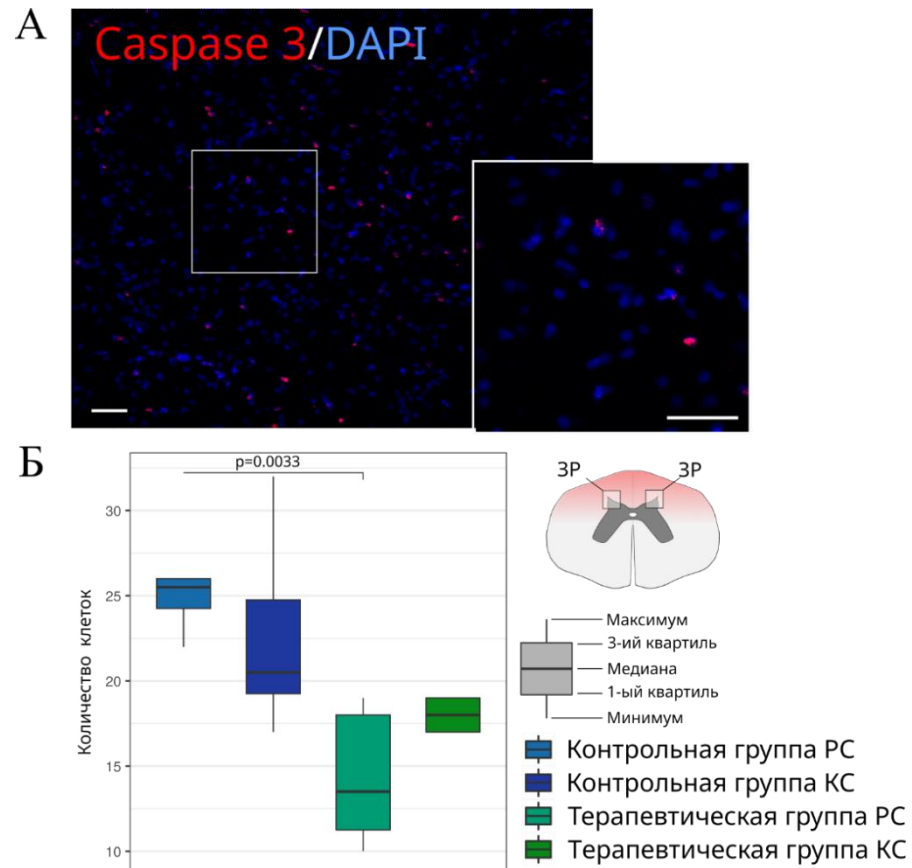


Рисунок 18 – Экспрессия проапоптозного белка (Caspase3) в задних рогах спинного мозга мини-свиней через 8 недель после моделирования нейротравмы. А – Caspase3-позитивные ядра (красное свечение) в задних рогах каудального сегмента спинного мозга животных из терапевтической группы; ядра (синее свечение) докрашены DAPI. Б – Количество Caspase3-позитивных клеток в задних рогах в ростральном (РС) и каудальном (КС) сегментах спинного мозга подопытных животных. На схеме спинного мозга квадратами обозначены анализируемые области; ЗР – задние рога. Данные представлены с помощью боксплотов. Масштаб: 50 мкм.

Уровень экспрессии Hsp27 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]). (Рисунок 19).

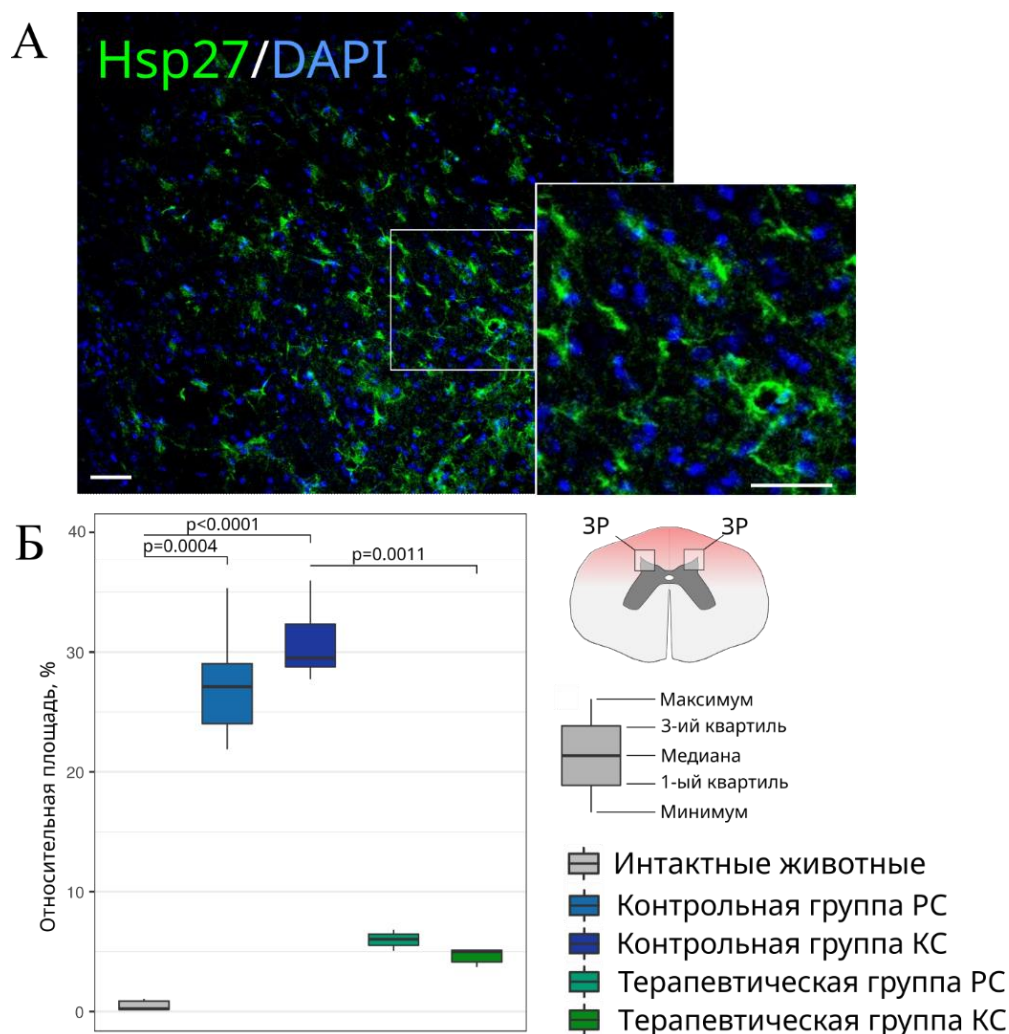


Рисунок 19 – Экспрессия белка теплового шока 27 кДа (Hsp27) в задних рогах спинного мозга мини-свиней через 8 недель после моделирования нейротравмы. А – Hsp27-иммунопозитивная область (зеленое свечение) в задних рогах каудального сегмента спинного мозга животного из терапевтической группы; ядра (синее свечение) докрашены DAPI. Б – Относительная Hsp27-иммунопозитивная площадь (%) в задних рогах в ростральном (РС) и каудальном (КС) сегментах спинного мозга подопытных животных. На схеме спинного мозга квадратами обозначены анализируемые области; ЗР – задние рога. Данные представлены с помощью боксплотов. Масштаб: 50 мкм.

4.3.4.2 Экспрессия синаптических белков

Средняя синаптофизин-иммунопозитивная площадь была значительно меньше в ростральном и каудальном сегментах 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 группой (25,23 [23,75–27,72]). Однако синаптофизин-

иммунопозитивная площадь в КС в терапевтической группе была больше, чем в контрольной ($p=0,0251$) (Рисунок 20).

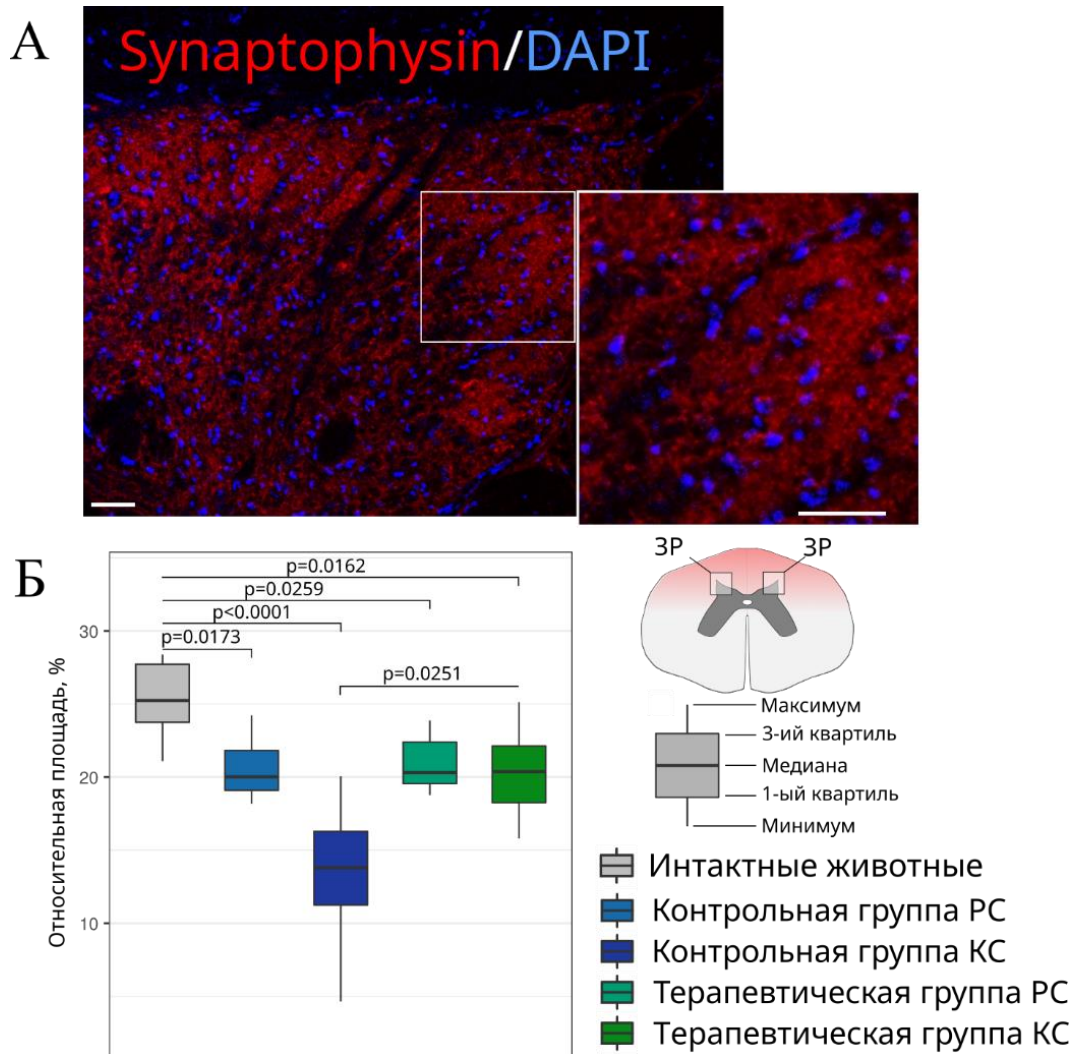


Рисунок 20 – Экспрессия белка синаптических везикул (синаптофизина) в задних рогах спинного мозга мини-свиней через 8 недель после моделирования нейротравмы. А – синаптофизин-позитивные ядра (красное свечение) в задних рогах каудального сегмента спинного мозга животных из терапевтической группы; ядра (синее свечение) докрашены DAPI. Б – Относительная синаптофизин-позитивная площадь (%) в задних рогах в ростральном (РС) и каудальном (КС) сегментах спинного мозга подопытных животных. На схеме спинного мозга квадратами обозначены анализируемые области; ЗР – задние рога. Данные представлены с помощью боксплотов. Масштаб: 50 мкм.

Анализ экспрессии белка постсинаптической плотности 95 кДа (PSD95) 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]) (Рисунок 21).

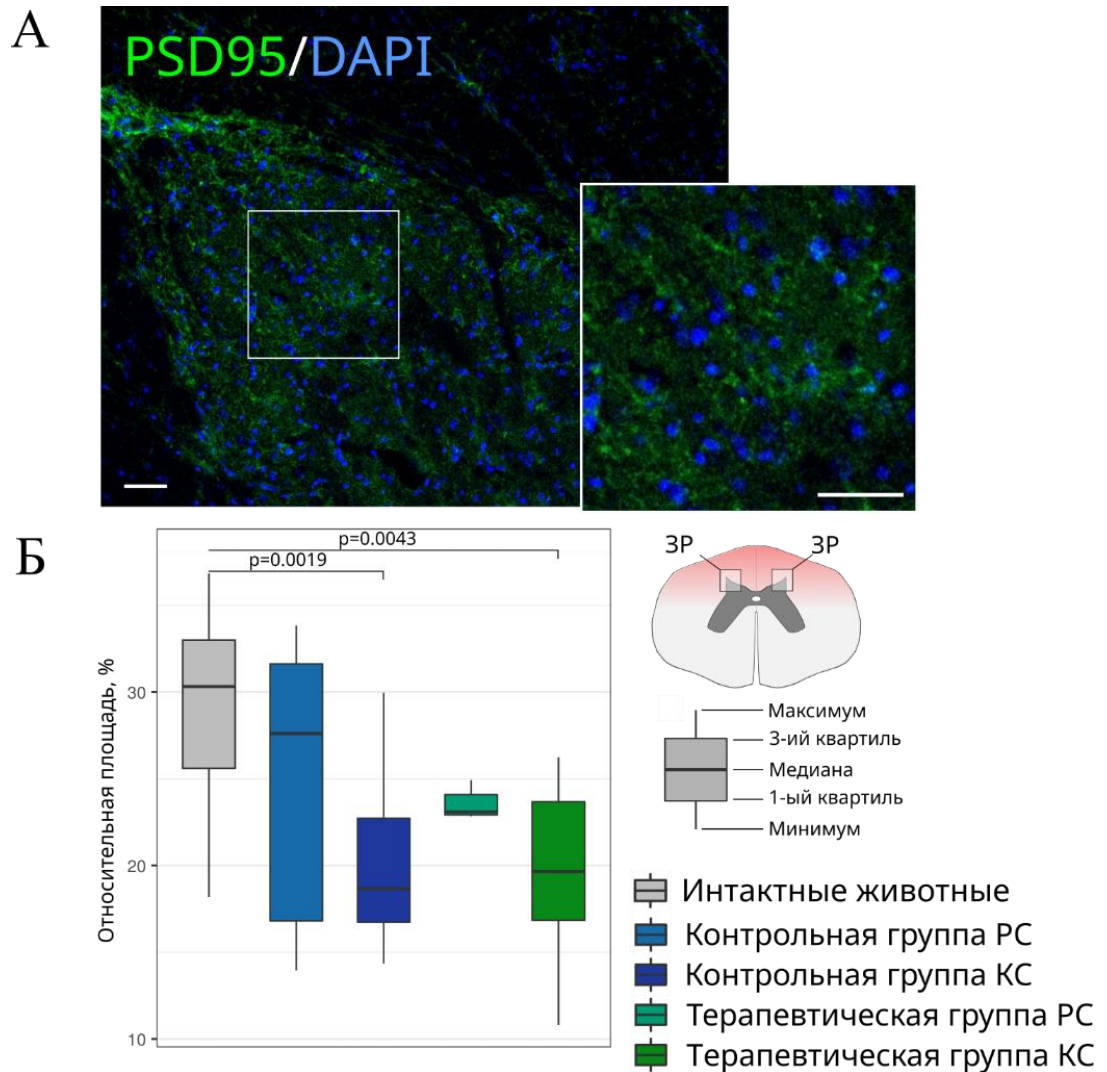


Рисунок 21 – Экспрессия белка постсинаптической плотности 95 кДа (PSD95) в задних рогах спинного мозга мини-свиней через 8 недель после моделирования нейротравмы. А – PSD95-иммунопозитивная площадь (зеленое свечение) в задних рогах каудального сегмента спинного мозга животных из терапевтической группы; ядра (синее свечение) докрашены DAPI. Б – Относительная PSD95-иммунопозитивная площадь (%) в задних рогах в роstralном (РС) и каудальном (КС) сегментах спинного мозга подопытных животных. На схеме спинного мозга квадратами обозначены анализируемые области; ЗР – задние рога. Данные представлены с помощью боксплотов. Масштаб: 50 мкм.

4.3.4.3 Реакция клеток нейроглии

Иммунофлуоресцентное окрашивание задних рогов спинного мозга АТ против глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) выявило, что в терапевтической группе значения по этому маркеру 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 (Рисунок 22). 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 ионизированной кальций-связывающей адаптерной молекулы 1 (Iba1) в задних рогах спинного мозга обнаружил, что в терапевтической группе Iba1-иммунопозитивная площадь, соответствующая клеткам микроглии, в РС (25,82 [23,51–26,80]) и в КС (28,81 [25,62–30,35]) аналогична значениям в интактной группе. Напротив, 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]) (Рисунок 23).

Анализ иммунофлуоресцентного окрашивания спинного мозга АТ против фактора транскрипции Olig2 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 контрольной группе, и не отличалось от значений в интактной группе (24,50 [24,00–25,00]) (Рисунок 24).

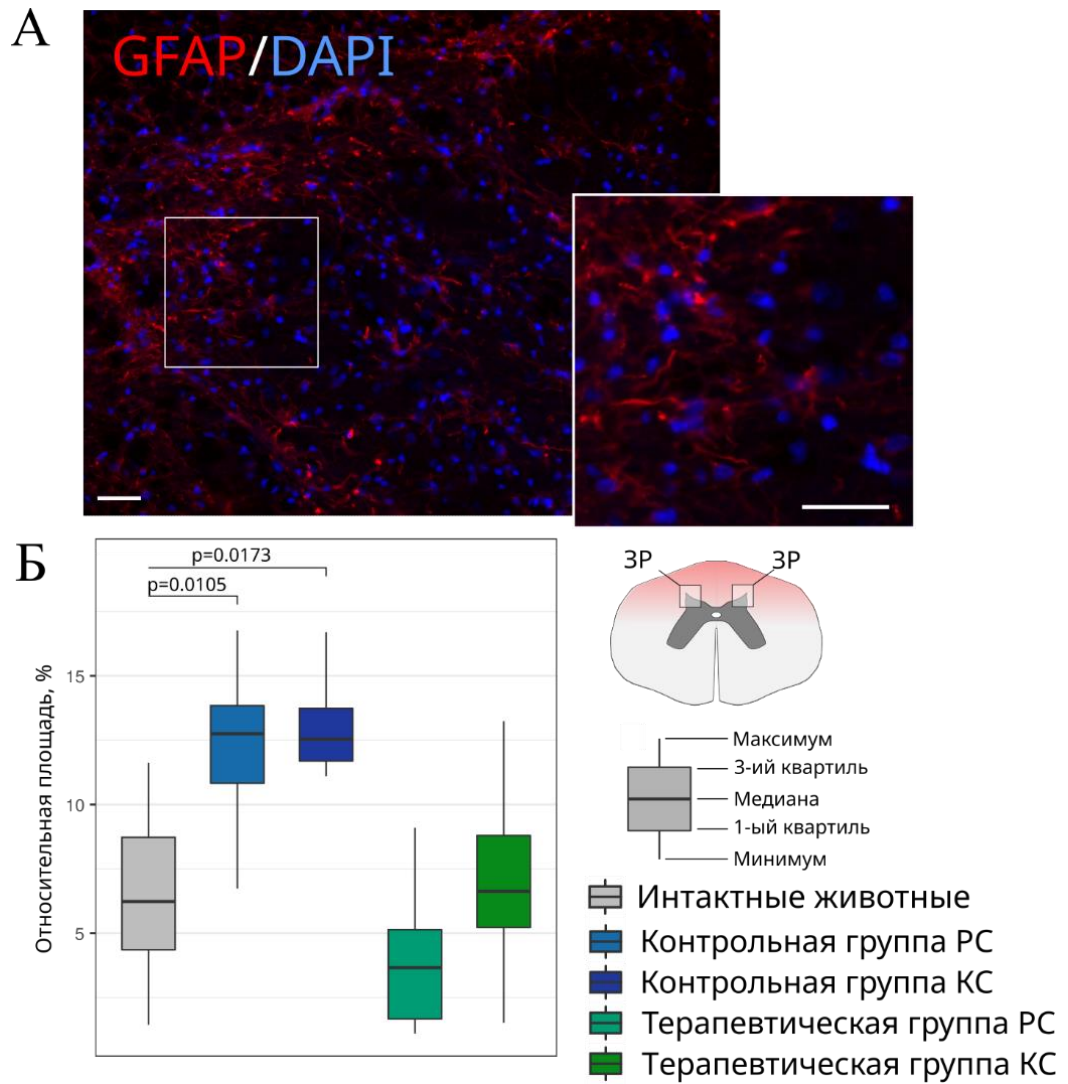


Рисунок 22 – Экспрессия глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) в задних рогах спинного мозга мини-свиней через 8 недель после моделирования нейротравмы. А – GFAP-иммунопозитивная площадь (красное свечение) в задних рогах каудального сегмента спинного мозга животных из терапевтической группы; ядра (синее свечение) докрашены DAPI. Б – GFAP-иммунопозитивная область в задних рогах в ростральном (РС) и каудальном (КС) сегментах спинного мозга подопытных животных. На схеме спинного мозга квадратами обозначены анализируемые области; ЗР – задние рога. Данные представлены с помощью боксплотов. Масштаб: 50 мкм.

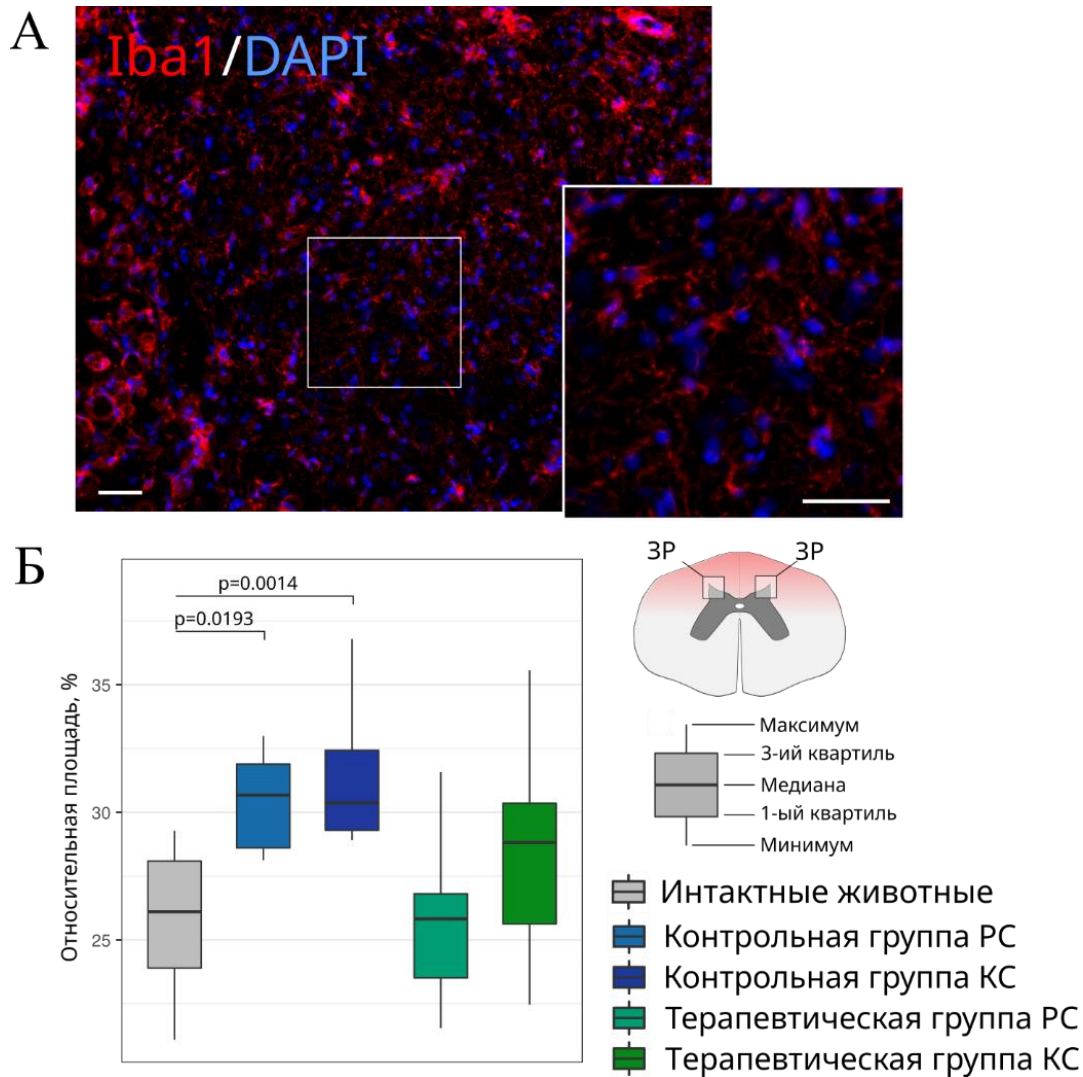


Рисунок 23 – Экспрессия ионизированной кальций-связывающей адаптерной молекулы 1 (Iba1) в задних рогах спинного мозга мини-свиней через 8 недель после моделирования нейротравмы. А – Iba1-иммунопозитивная площадь (красное свечение) в задних рогах каудального сегмента спинного мозга животных из терапевтической группы; ядра (синее свечение) докрашены DAPI. Б – Относительная Iba1-иммунопозитивная площадь в задних рогах в ростральном (PC) и каудальном (KC) сегментах спинного мозга подопытных животных. На схеме спинного мозга квадратами обозначены анализируемые области; ЗР – задние рога. Данные представлены с помощью боксплотов. Масштаб: 50 мкм.

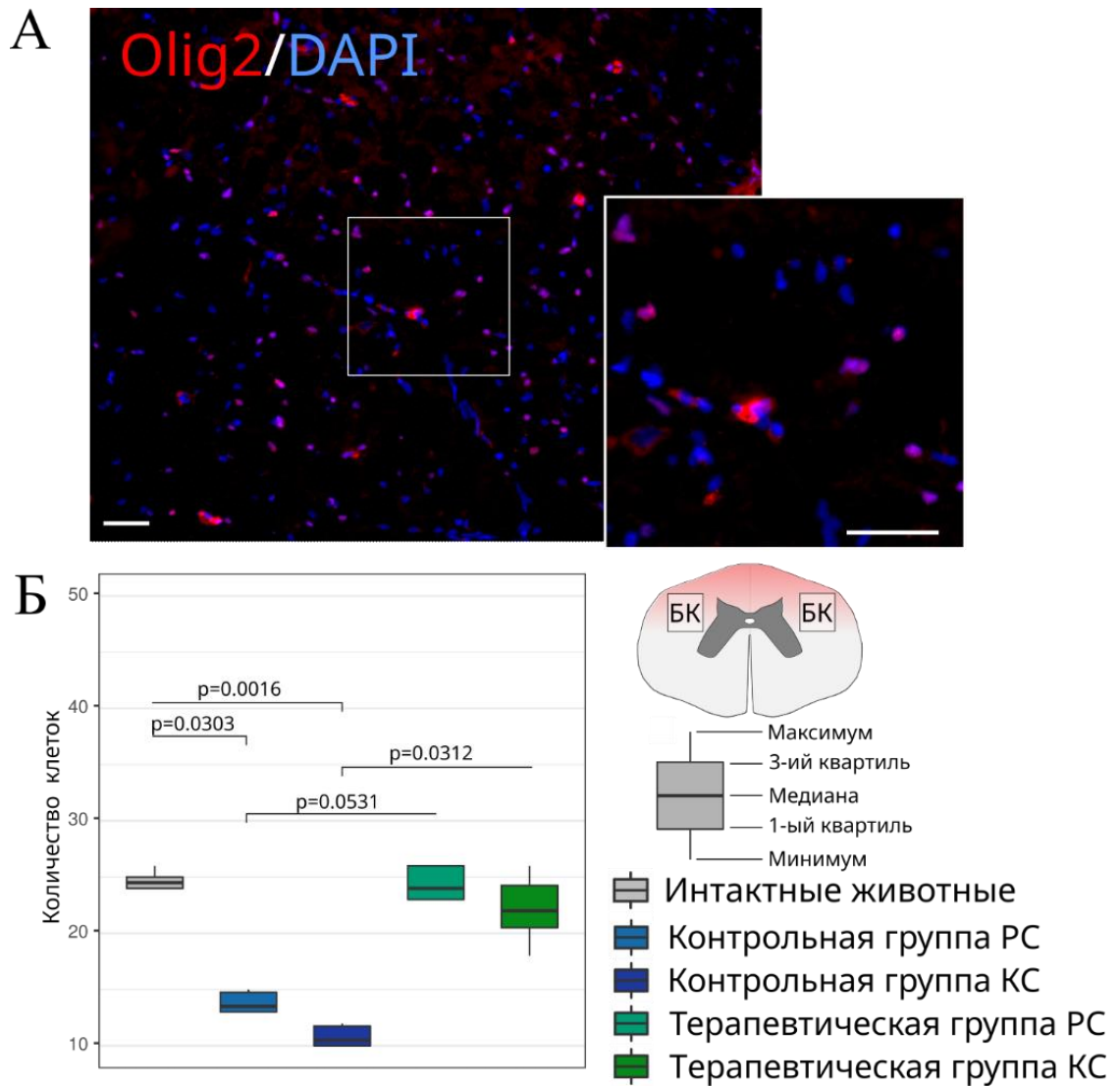


Рисунок 24 – Экспрессия фактора транскрипции олигодендроцитов (Olig2) в боковых канатиках в области латерального КСТ спинного мозга мини-свиней через 8 недель после моделирования нейротравмы. А – Olig2-позитивные ядра (красное свечение) в области латерального КСТ в каудальном сегменте спинного мозга животного из терапевтической группы; ядра (синее свечение) докрашены DAPI. Б – Количество Olig2-позитивных ядер в области латерального КСТ в ростральном (РС) и каудальном (КС) сегментах спинного мозга подопытных животных. На схеме спинного мозга квадратами обозначены анализируемые области; БК – боковые канатики. Данные представлены с помощью боксплотов. Масштаб: 50 мкм.

4.3.4.4 Сохранность аксонов

Экспрессию β III-тубулина исследовали в боковых канатиках в области латерального КСТ на продольных срезах в ЭР и ЭК фрагментах спинного мозга. 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 каудальном фрагменте эпицентра нейротравмы 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 (Рисунок 25).

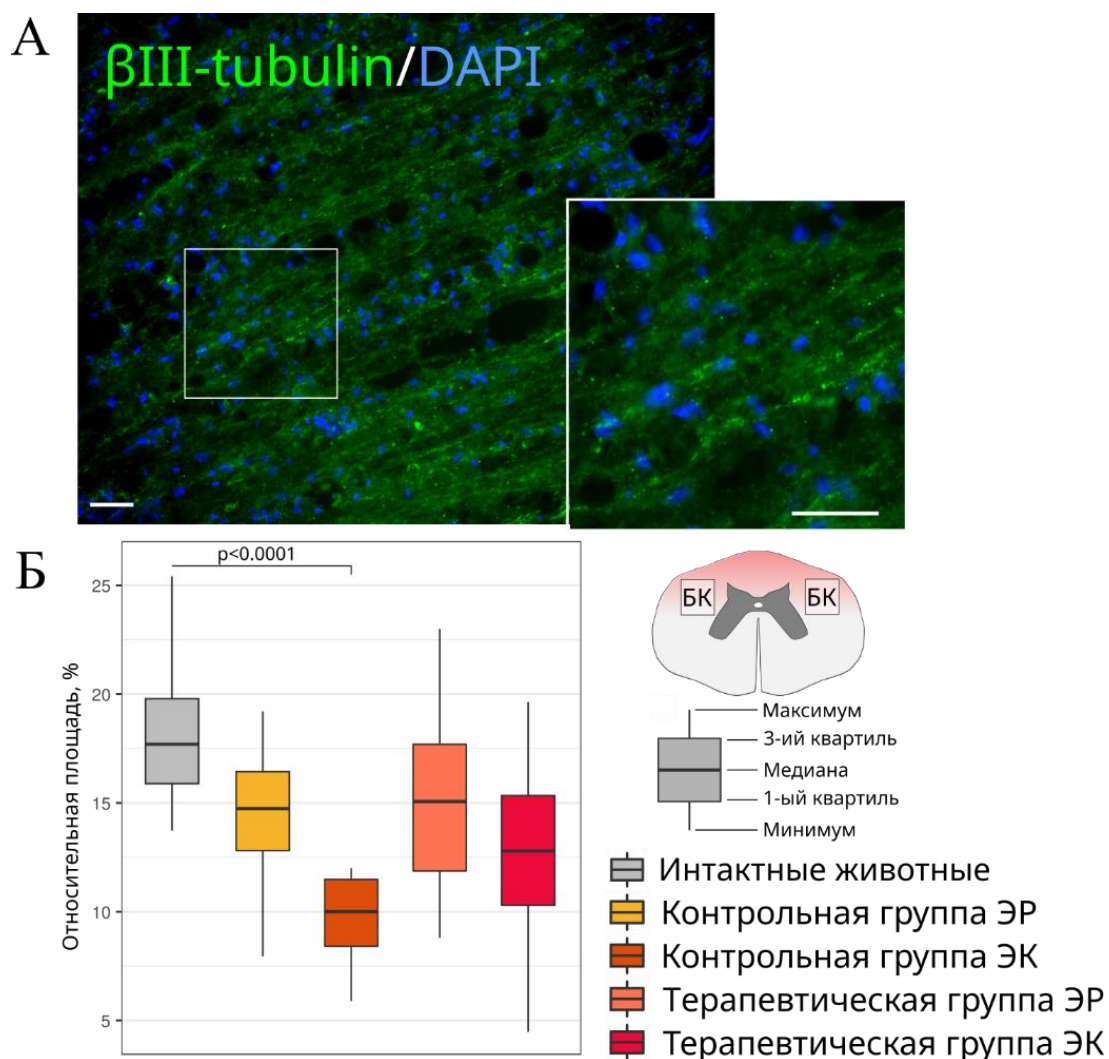


Рисунок 25 – Экспрессия β III-тубулина в боковых канатиках в области

латерального КСТ спинного мозга мини-свиней через 8 недель после моделирования нейротравмы. А – β III-тубулин-иммунопозитивная площадь (зеленое свечение) в боковых канатиках в области латерального КСТ спинного мозга животного из терапевтической группы; ядра (синее свечение) докрашены DAPI. Б — Относительная β III-тубулин-иммунопозитивная площадь (%) в области латерального КСТ в ростральном (ЭР) и каудальном (ЭК) фрагментах спинного мозга подопытных животных. На схеме спинного мозга квадратами обозначены анализируемые области; БК – боковые канатики. Данные представлены с помощью боксплотов. Масштаб: 50 мкм.

ГЛАВА 5 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Травма спинного мозга — это комплексное патологическое состояние, характеризующееся первичной деструкцией нервной ткани в зоне эпицентра и развитием вторичных патофизиологических процессов в прилегающих участках спинного мозга, таких как ишемия, окислительный стресс, нейровоспаление, приводящих к прогрессирующей гибели нейронов, кавитации и формированию глиального рубца. Сложность патофизиологических реакций и патоморфологических изменений при нейротравме обуславливает необходимость комплексного терапевтического подхода, направленного на преодоление нейродегенеративных явлений и ограничения вторичного посттравматического повреждения.

В данном исследовании для оценки вторичных повреждений в спинном мозге мини-свиньи с контузионной ТСМ в нижнегрудном отделе были использованы клинические (неврологический осмотр), гистологические (морфометрический анализ сохранности серого и белого вещества спинного мозга, иммунофлуоресцентное окрашивание спинного мозга с использованием антител к нейрональным и глиальным маркерам), молекулярно-клеточные (культивирование *in vitro*, проточная цитометрия, полимеразная цепная реакция в реальном времени) методы исследования.

После моделирования контузионной ТСМ мини-свиньи не могли стоять на четырех конечностях и утратили способность к активным движениям, произвольное мочеиспускание было нарушено. При неврологическом осмотре животные демонстрировали центральный тип паралича задних конечностей, а в мышцах-разгибателях наблюдался выраженный гипертонус. К концу 8 недели эксперимента подопытные животные делали попытки стоять, а для движения использовали исключительно передние конечности, подтягивая при этом задние конечности. Также наблюдалась положительная динамика в нормализации произвольного мочеиспускания.

Гистологическое исследование спинного мозга через 8 недель после контузионной травмы выявило последствия посттравматических патофизиологических реакций в задних рогах и боковых канатиках в нижнегрудном отделе.

Морфометрический анализ сохранности серого вещества обнаружил уменьшение относительной площади серого вещества в каудальном сегменте относительно эпицентра нейротравмы на 30% за счет кистозных полостей. С помощью иммунофлуоресцентного окрашивания в задних рогах было установлено увеличение экспрессии молекулы клеточного стресса (белка теплового шока Hsp27) и количества апоптотических (Caspase3-позитивных) клеток, снижение экспрессии синаптических белков (синаптофизина и PSD95), развитие реактивного астроглиоза (увеличение GFAP-позитивной и Iba1-позитивной площади), снижение количества миелинообразующих Olig2-позитивных олигодендроглиальных клеток.

Сохранная площадь белого вещества в области латерального КСТ выше и ниже эпицентра травмы у животных с TCM не отличалась от значений у интактных животных. Однако иммунофлуоресцентное окрашивание этой области выявило уменьшение β III-тубулин-иммунопозитивной площади, соответствующей аксонам центральных нейронов.

Совокупность полученных данных неврологического осмотра и гистологического исследования указывает на специфические нейродегенеративные процессы в спинном мозге мини-свиньи на 56-е сутки после моделирования контузионной травмы. Многофакторность патофизиологических реакций и патоморфологических нарушений после TCM обуславливает комбинированное терапевтическое воздействие на различные патогенетические аспекты нейротравмы, направленное как на ограничение распространения нейродегенерации, так и на стимулирование нейрорегенерации. Одним из таких подходов является генная терапия, которая обеспечивает доставку в область повреждения спинного мозга различных нейротрофических факторов по отдельности или комбинации, естественной функцией которых является повышение выживаемости и поддержание функциональной активности нервных

клеток, стимулирование роста аксонов и восстановление утраченных нейронных связей в условиях патологии [101].

В современных исследованиях для терапии последствий ТЧМ широко используются мозговой нейротрофический фактор (BDNF), нейротрофин-3 (NT-3), нейротрофин-4/5 (NT-4/5), фактор роста нервов (NGF), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), фактор роста фибробластов (FGF) и другие. Особое внимание уделяется молекулам сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), глиального нейротрофического фактора (GDNF) и нейрональной молекуле клеточной адгезии (NCAM), обладающим подтверждённым нейропротекторным и регенеративным потенциалом. Применение VEGF для посттравматического восстановления спинного мозга обосновано не только его ангиогенным действием [32; 36], но и выраженным нейротрофическим эффектом [76], а также способностью стимулировать рост аксонов [23]. Глиальный нейротрофический фактор демонстрирует широкий спектр нейропротекторных свойств: стимулирует нейрональную дифференцировку, сдерживает апоптоз, повышает выживаемость повреждённых мотонейронов [80; 219], способствует ремиелинизации аксонов [100] и модулирует реактивный астроглиоз, что создаёт благоприятную среду для ограничения распространения вторичного повреждения и роста аксонов [201; 204]. Нейрональная молекула клеточной адгезии участвует в процессах нейрорегенерации, способствуя как росту аксонов, так и регуляции синаптической пластичности, которые вместе обуславливают формирование новых нейронных сетей, необходимых для функционального восстановления спинного мозга после травмы [234].

Таргетная доставка вирусных векторов, несущих терапевтический ген, в зону повреждения спинного мозга может осуществляться прямым (*in vivo*) или клеточно-опосредованным (*ex vivo*) путём [101; 252]. Клеточно-опосредованная генная терапия предполагает использование аутологичных клеток пациента или аллогенных клеток донора, которые выступают как в качестве носителей трансгенов, так и в качестве продуцентов рекомбинантных нейротрофических факторов. Данный подход минимизирует иммуногенность за счёт исключения

прямого контакта вирусных антигенов с иммунной системой реципиента, обеспечивая экспрессию трансгена исключительно трансдуцированными *ex vivo* клетками. Дополнительным преимуществом метода является возможность введения в клетку-носитель более одного трансгена, а именно их комбинацию, для усиления терапевтического эффекта [44].

Наиболее изученными вирусными векторами для генной терапии являются рекомбинантные аденоассоциированные вирусы, лентивирусы и аденовирусы, характеризующиеся индивидуальными преимуществами и недостатками [141]. Аденовирусные векторы в сравнении с альтернативными вирусными платформами обладают рядом существенных преимуществ. К ним относятся широкий тропизм, обеспечивающий эффективную трансдукцию практически любых типов клеток, а также способность к достижению высокой экспрессии трансгенов. Дополнительными достоинствами являются значительная упаковочная ёмкость и возможность получения высокоочищенных вирусных препаратов с высоким титром [131]. В настоящее время векторы, созданные на основе аденовируса 5 серотипа (Ad5), являются наиболее часто используемым носителем в клинических испытаниях (примерно 26%), благодаря их способности к трансдукции как пролиферирующих, так и покоящихся клеток [199].

Для расширения терапевтического потенциала аденовирусных векторов активно разрабатываются стратегии их модификации, включающие замену фибера, встраивание лигандов и структурную модификацию фибринового белка. Одним из ключевых результатов данных исследований стала разработка химерного вектора на базе аденовируса человека 5 серотипа с фибром аденовируса 35 серотипа (Ad5/F35), характеризующегося расширенным тропизмом и способностью инфицировать CAR-негативные клетки через CD46 рецептор, что отличает его от векторов Ad5. Эффективность данного химерного вектора подтверждена в экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo*, что делает данную конструкцию наиболее перспективной и безопасной для проведения клинических исследований [18].

Клетки, используемые для клеточно-опосредованной генной терапии,

должны обладать стабильными и воспроизводимыми характеристиками, включая высокую жизнеспособность, выраженную миграционную активность и способность к секреции биологически активных молекул непосредственно в зоне повреждения нервной ткани [225]. Несмотря на значительный прогресс, большинство разработанных методов остается на уровне доклинических исследований. Их клиническое применение сдерживается этическими ограничениями, рисками туморогенеза и иммунного отторжения, опасностью ксеноконтаминации, а также непредсказуемым уровнем продукции рекомбинантных молекул. Поэтому одним из важных аспектов применения клеточно-опосредованной генной терапии является использование не только доступного, но и безопасного клеточного материала для доставки терапевтических генов.

Одними из перспективных клеток в качестве носителей генов для клеточно-опосредованной генной терапии являются моноклеарные клетки пуповинной крови. Ранее нами было продемонстрировано, что интратекальная доставка МККП, сверхэкспрессирующих VEGF, GDNF и NCAM способствует сдерживанию развития астроглиоза, поддерживает процессы ремиелинизации и способствует восстановлению функциональной активности нейронов в спинном мозге мини-свиней с контузионной TCM [2]. Кроме того, эффективность использования генетически модифицированных моноклеарных клеток пуповинной крови, сверхэкспрессирующих VEGF, GDNF, NCAM, была также продемонстрирована на животных моделях бокового амиотрофического склероза [237] и инсульта [258]. Несмотря на многообещающие результаты применения моноклеарных клеток пуповинной крови в стратегиях клеточно-опосредованной генной терапии TCM [2; 20], их использование сопряжено с рядом существенных ограничений. К таким ограничениям можно отнести ограниченное количество клеток при однократном введении, невозможность повторного забора МККП от исходного донора, аллотрансплантационные риски.

В качестве доступного и безопасного клеточного носителя для персонализированной генной терапии *ex vivo* могут выступить аутологичные

лейкоциты периферической крови, сочетающие высокую секреторную активность, способность к миграции в повреждённые ткани и возможность многократных аутоинфузий как системно, так и местно [172]. Успешный клинический опыт применения генетически модифицированных аутологичных лейкоцитов при онкогематологических заболеваниях [270] подтверждает безопасность и эффективность клеточно-опосредованной доставки терапевтических генов, кодирующих секреторные биологически активные молекулы, с помощью аутологичных лейкоцитов пациента.

Разработка новых стратегий терапии ТСМ требует проведения доклинических исследований на крупных лабораторных животных, обладающих анатомическими, физиологическими и биохимическими характеристиками, максимально приближенными к человеческим. В настоящее время модели ТСМ на свиньях являются перспективными промежуточными моделями для переноса экспериментальных исследований в клинику. Это обусловлено схожестью спинного мозга свиней и человека по размеру и системе кровообращения [66; 168; 192].

В настоящей работе концепция персонализированной генной терапии *ex vivo*, заключающаяся в использовании генно-клеточного препарата на основе аутологичных генетически модифицированных лейкоцитов, была экспериментально продемонстрирована на модели контузионной спинномозговой травмы у мини-свиней. Преимуществом метода является простота изготовления генно-клеточного препарата, а именно получения взвеси аутологичных лейкоцитов из периферической крови и её последующей трансдукции химерными аденовирусными векторами, несущими терапевтические гены, в гематологическом контейнере, что исключает риски, связанные с длительным культивированием и использованием компонентов животного происхождения и антибиотиков.

На первом этапе исследования эффективность трансдукции лейкоцитов мини-свиньи и их миграционный потенциал в организме животного были установлены с помощью химерного аденовирусного вектора, несущего репортерный ген зеленого флуоресцентного белка (Ad5/35F-GFP). За 12 ч до моделирования ТСМ для каждого подопытного животного готовили

индивидуальный генно-клеточный препарат – аутологичный лейкоконцентрат, трансдуцированный Ad5/35F-GFP, который вводили внутривенно через четыре часа после операции. Послеоперационное восстановление мини-свиней соответствовало тяжести спинномозговой травмы. Аутоинфузия генетически модифицированных лейкоцитов не сопровождалась развитием специфических побочных реакций или осложнений.

Эффективность трансдукции генетически модифицированных лейкоцитов была подтверждена *in vitro*. Флуоресцентная микроскопия выявила GFP-положительные лейкоциты, которые по их размеру и морфологии были классифицированы как моноциты и лимфоциты, а методом проточной цитометрии было показано, что 0,6% лейкоцитов эффективно экспрессируют ген зеленого флуоресцентного белка.

Через 7 суток после аутоинфузии лейкоконцентрата, обогащенного геном зеленого флуоресцентного белка, с помощью флуоресцентной микроскопии в спинном мозге мини-свиней после контузионной TCM в ростральном, каудальном сегментах и в эпицентре спинного мозга были обнаружены GFP-позитивные клетки. Кроме того, GFP-позитивные клетки были найдены и при исследовании гистологических срезов селезенки, что свидетельствует о миграции генетически модифицированных лейкоцитов в лимфоидные органы. Таким образом, полученные данные дают основание полагать, что генетически модифицированные лейкоциты как в очаге повреждения спинного мозга, так и в органах иммунной защиты могут секретировать рекомбинантные молекулы, которые, в свою очередь, действуют на клетки-мишени по паракринному и эндокринному механизмам.

Результаты первого этапа исследования и сообщения об эффективности генетически модифицированных моноклеарных клеток крови пуповины, экспрессирующих трансгены *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, при лечении контузионной TCM мини-свиней [2], свидетельствуют о перспективности применения аутологичных генетически модифицированных лейкоцитов, несущих ту же комбинацию генов, для стимулирования посттравматической регенерации спинного мозга после TCM.

На основании вышеизложенного, в данной работе мини-свиньям через 4 часа после моделирования контузионной ТСМ в нижнегрудном отделе внутривенно однократно вводили аутологичный лейкоконцентрат, обогащенный генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, для изучения механизмов коррекции патогенетических аспектов нейротравмы в условиях клеточно-опосредованной генной терапии. Эффективность трансдукции лейкоцитов мини-свиньи комбинацией химерных аденовирусных векторов, несущих по отдельности гены *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1* в равном соотношении, была подтверждена методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Уровень относительной экспрессии мРНК в генетически модифицированных лейкоцитах был увеличен в $3,2 \pm 1,2$ для *vegfl65*, в $3,0 \pm 1,5$ для *gdnf* и в $5,5 \pm 1,7$ для *ncam1* раз по сравнению с уровнем мРНК генов-мишеней в нетрансдуцированных лейкоцитах.

В условиях введения подопытным животным аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, улучшение неврологического статуса происходило в течение всего эксперимента и к концу 8 недели животные демонстрировали успешные попытки движений задними конечностями с нормализацией произвольного мочеиспускания.

Улучшение неврологического статуса коррелировало с положительными изменениями в спинном мозге подопытных животных в области повреждения через 8 недель после моделирования ТСМ. Морфометрический анализ выявил лучшую сохранность серого вещества в задних рогах каудального сегмента (ниже эпицентра травмы) у мини-свиней в условиях генно-клеточной терапии по сравнению с животными, получившими интактную взвесь аутологичных лейкоцитов.

Иммунофлуоресцентный анализ задних рогов спинного мозга у животных из терапевтической группы показал лучшую выживаемость клеток в ростральном отделе (меньшее количество Caspase-3-позитивных клеток), а в каудальном отделе – снижение экспрессии белка теплового шока Hsp27 и восстановление экспрессии синаптофизина. Меньшая площадь, занимаемая GFAP-позитивными астроцитами и Iba1-положительных микроглиальными клетками, участвующими в формировании астроглиального рубца, выявлена в задних рогах как в ростральном,

так и в каудальном отделах спинного мозга опытных животных. Кроме того, у мини-свиней из терапевтической группы в боковых канатиках выше и ниже эпицентра нейротравмы количество Olig2-позитивных олигодендроглиальных клеток, ответственных за миелинизацию нервных отростков, было больше по сравнению с животными из контрольной группы.

Таким образом, целесообразность доставки комбинации рекомбинантных генов (*vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*) с помощью аутологичных лейкоцитов для стимулирования посттравматической регенерации спинного мозга после контузионной травмы была экспериментально подтверждена. Внутривенное введение генетически модифицированных аутологичных лейкоцитов оказывает положительное влияние на посттравматическое восстановление спинного мозга, что коррелирует с улучшением неврологического статуса мини-свиней с ТСМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Последствия позвоночно-спинномозговой травмы характеризуются двигательными, сенсорными и вегетативными расстройствами, существенно влияющими на физическое и психоэмоциональное состояние пациентов [7; 79]. Согласно эпидемиологическим данным ВОЗ на 2023 год, число пациентов с ТСМ по всему миру превышает 15 миллионов [220]. Применяемые ныне современные методы лечения ТСМ обладают ограниченной терапевтической эффективностью и носят преимущественно симптоматический характер, что приводит к стойкой пожизненной инвалидизации пациентов [8]. В этой связи, разработка принципиально новых терапевтических стратегий, нацеленных на минимизацию негативных последствий нейротравмы и стимулирование посттравматической регенерации спинного мозга, является актуальной задачей практической медицины [250].

Поскольку в норме нейроны и глия ЦНС обеспечивают взаимную поддержку за счёт паракринного действия гуморальных сигнальных молекул, а при травме этот механизм оказывается угнетённым, целесообразным представляется усиление посттравматической регенерации посредством локальной доставки нейротрофических факторов и цитокинов, способствующих регенерации нервной ткани. В предыдущих исследованиях нами было продемонстрировано, что интратекальное введение МККП, экспрессирующих VEGF, GDNF и NCAM способствует восстановлению функциональной активности нейронов, сдерживанию развития астроглиоза и стимулирует ремиелинизацию в спинном мозге мини-свиней с контузионной ТСМ [2]. Несмотря на доказанную эффективность применения моноклеарных клеток пуповинной крови в рамках клеточно-опосредованной генной терапии ТСМ [2; 20], их применение лимитировано рядом существенных факторов (малое количество МККП, которое можно получить от одного донора, высокие риски иммунного ответа на аллогенную инфузию клеток). Клиническая практика доказывает безопасность и

эффективность *ex vivo* генной терапии аутологичными лейкоцитами при онкогематологических заболеваниях [270], что не исключает применения аутологичных лейкоцитов периферической крови для персонализированной *ex vivo* генной терапии с целью продукции в организме реципиента рекомбинантных терапевтических молекул. Благодаря своей высокой секреторной активности, способности к миграции в повреждённые ткани и возможности многократных инфузий аутологичные лейкоциты можно рассматривать как перспективный и клинически безопасный клеточный носитель терапевтических генов [172]. Таким образом, данные о позитивном влиянии генетически модифицированных МККП на восстановление спинного мозга мини-свиней после контузионной травмы [2] указывают на принципиальную возможность использования аутологичных лейкоцитов, несущих ту же комбинацию генов *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1* для стимулирования нейрорегенерации.

Поэтому целью настоящего исследования явилось установить влияние аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), глиального нейротрофического фактора (GDNF) и нейрональной молекулы клеточной адгезии (NCAM), на клеточные и молекулярные механизмы посттравматической регенерации спинного мозга мини-свиней после контузионной травмы в нижнегрудном отделе.

Аутологичный лейкоконцентрат, обогащенный генами с нейротрофическим действием, готовили из периферической крови мини-свиньи и аденовирусных векторов, несущих по отдельности терапевтические гены *gdnf*, *vegfl65* и *ncam1*, по запатентованной нами технологии (Патент РФ №2784233 «Фармацевтическая композиция и способ ее использования для терапии повреждений головного и спинного мозга»). В настоящем исследовании 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. Готовый генно-клеточный препарат вводили подопытным животным внутривенно через 4 ч после моделирования контузионной

ТСМ. Сравнительный анализ морфологических, клеточных и молекулярных изменений в области повреждения спинного мозга у мини-свиней в условиях генно-клеточной терапии проводили относительно контрольной группы животных, которым после моделирования нейротравмы внутривенно вводили нативный аутологичный лейкоконцентрат. В рамках отдельной задачи с помощью генно-клеточного препарата, обогащенного репортерным геном *gfp*, был исследован миграционный потенциал лейкоцитов для выявления механизма действия рекомбинантных молекул VEGF, GDNF и NCAM на посттравматическую регенерацию спинного мозга мини-свиней.

Эффективность экспрессии генетически модифицированными лейкоцитами терапевтических генов *vegfl65*, *gdnf* и *ncaml* была подтверждена методом полимеразной цепной реакции в реальном времени, а экспрессия репортерного гена зеленого флуоресцентного белка GFP – методом проточной цитометрии.

Через 8 недель после ТСМ у мини-свиней в условиях внутривенной инфузии аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами *gdnf*, *vegfl65* и *ncaml*, 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 нервной ткани (сдерживание апоптоза в ростральном отделе, снижение клеточного стресса и восстановление активности нервных клеток в каудальном отделе, а также нормализация распределения астроцитов и клеток микроглии и увеличение количества олигодендроглиальных клеток в ростральном и каудальном отделах) при сравнении с данными контрольных животных.

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 26).

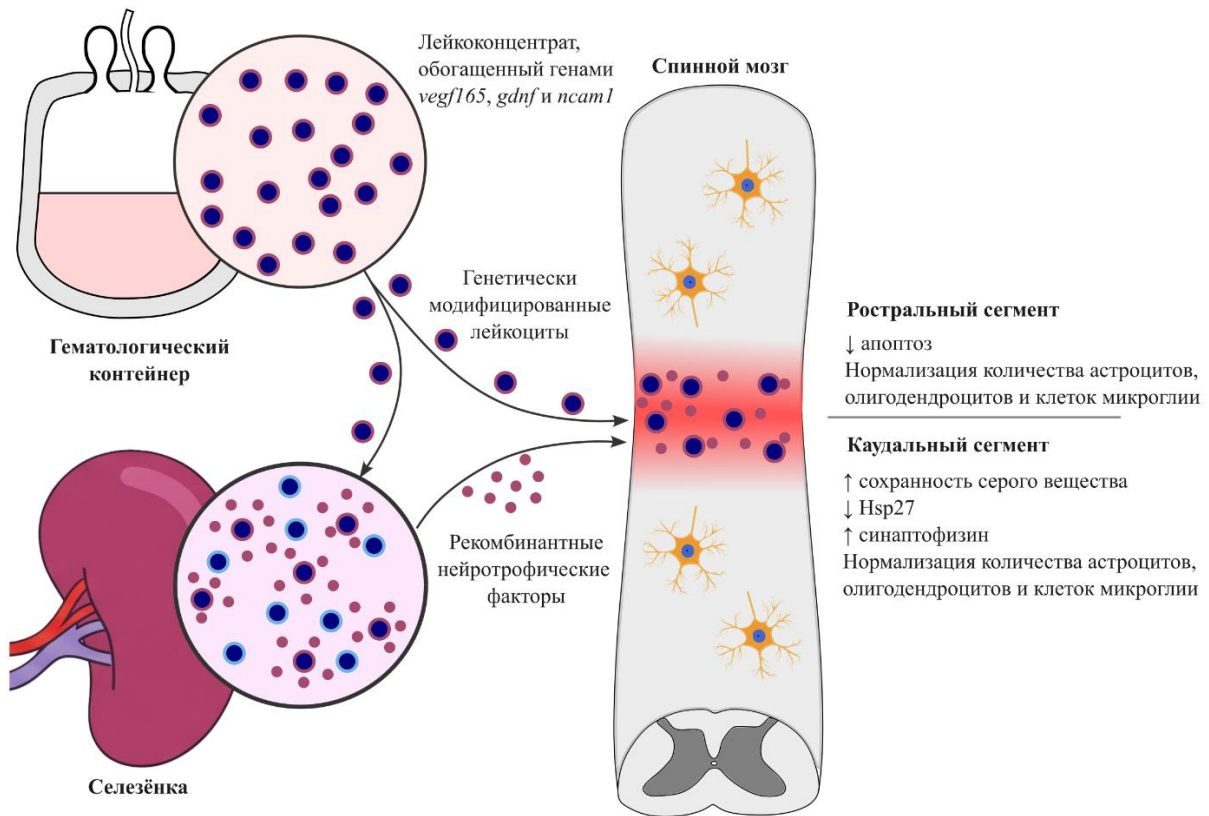


Рисунок 26 – Паракринный и эндокринный механизмы действия рекомбинантных нейротрофических факторов, продуцируемых генетически модифицированными аутологичными лейкоцитами. Паракринный механизм действия генно-клеточного препарата основан на временной продукции *in situ* рекомбинантных биологически активных 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.

Таким образом, в ходе проведенного исследования на мини-свиньях экспериментально подтверждена целесообразность доставки комбинации терапевтических генов с помощью аутологичных лейкоцитов для стимулирования регенерации в центральной нервной системе. Внутривенное введение

аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, в острой фазе контузионной ТСМ оказывает положительное влияние на частичное посттравматическое восстановление спинного мозга. Рекомбинантные нейротрофические факторы VEGF165, GDNF и NCAM1, позитивно модулируют молекулярные и клеточные механизмы нейрорегенерации в спинном мозге выше и ниже эпицентра повреждения.

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 *ncaml*, 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АДА-ТКИД – тяжелый комбинированный иммунодефицит, обусловленный дефицитом аденозиндезаминазы

АФК – активные формы кислорода

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ЕАЛС – Европейское агентство лекарственных средств

ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

КСТ – кортикоспинальный тракт

ЛВ – лентивирусные векторы

МКПК – моноклеарные клетки пуповинной крови

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

МСК-ЖТ – мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани

МСК-КМ – мезенхимальные стволовые клетки костного мозга

МСКП – мезенхимальные стволовые клетки пуповины

НКП – нейральные клетки-предшественники

НСК – нейральные стволовые клетки

НПВС – нестероидные противовоспалительные средства

ОНК – обонятельные нейроэпителиальные клетки

САД – среднее артериальное давление

ТСМ – травма спинного мозга

ЭСК – эмбриональные стволовые клетки

AANS/CNS – Американская ассоциация неврологических хирургов/Конгресс неврологических хирургов (American Association of Neurological Surgeons/Congress of Neurological Surgeons)

AAV – аденоассоциированные вирусы

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

AdV – аденовирусы

Ang1 – ангиопоэтин-1

AO/ASIF – ассоциация по изучению применения внутренних фиксаторов в хирургии (Arbeitsgemeinschaft for Osteosynthesefragen / Association for the Study of Internal Fixation)

AOSpine – международное сообщество, занимающееся исследованиями в области ухода за позвоночником

ASIA – Американская ассоциация по травмам позвоночника (American Spinal Injury Association)

BCMA – В-клеточный антиген созревания (B-cell maturation antigen)

BDNF – нейротрофический фактор мозга (Brain-derived neurotrophic factor).

bFGF – фактор роста базофильных фибробластов (basic fibroblast growth factor)

BMSC – стромальные клетки костного мозга (Bone Marrow Stromal Cells)

CAR-T – терапия Т-клетками с химерным антигенным рецептором (chimeric antigen receptor T-cell therapy)

CNTF – цилиарный нейротрофический фактор (Ciliary neurotrophic factor)

CSPG – протеогликан хондроитинсульфата (chondroitin sulfate proteoglycan)

FDA – Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (Food and Drug Administration)

FGF – фактор роста фибробластов (Fibroblast growth factors)

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

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

Hsp – белки теплового шока

Iba1 – ионизированная кальций-связывающая адаптерная молекула 1

IFN- γ – интерферон- γ

IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста 1 (Insulin-like Growth Factor 1)

IL-10 – интерлейкин-10

IL-4 – интерлейкин-4

ISNCSCI – Международные стандарты неврологической классификации травмы спинного мозга (International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury)

JAK/STAT3 – сигнальный путь киназы Януса / трансдуктора сигналов и активатора транскрипции 3 (Janus kinase/ Signal Transducer and Activator of Transcription)

NASCIS – Национальное исследование острой травмы спинного мозга ((National Acute Spinal Cord Injury Study).

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

NG2-OPC – олигодендроглиальные клетки-предшественники, секретирующие нейронально-глиальный антиген 2

Ngb – нейроглобин

NGF – фактор роста нервов (Nerve growth factor)

NMPA – Национальное управление медицинской продукции Китая (National Medical Products Administration)

NP-1 – нейропилин-1

NT-3 – нейротрофин-3

NT-4/5т – нейротрофин-4/5

PDGF –тромбоцитарный фактор роста (Platelet-derived Growth Factor)

PlGF – плацентарный фактор роста (Placental growth factor)

PSD95 – белок постсинаптической плотности молекулярной массой 95 кДа

Rho-A – член семейства гомологов белка Ras, тип A (Ras homologous family member A)

RISCIS – Рилузол в исследовании травм спинного мозга (Riluzole in Acute Spinal Cord Injury Study)

STASCIS – Исследование сроков хирургического вмешательства при острой травме спинного мозга (Surgical Timing in Acute Spinal Cord Injury Study)

TGF-β – трансформирующий ростовой фактор-β (Transforming Growth Factor- β)

TNF-α – фактор некроза опухоли α

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

ZFN – цинк-пальцевые нуклеазы (Zinc Finger Nucleases)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Влияние декомпрессивно-стабилизирующих операций на длительность гемодинамической поддержки у пациентов в острый период осложненной травмы шейного отдела позвоночника / И. А. Стаценко, М. Н. Лебедева, А. В. Пальмаш [и др.] // Вестник интенсивной терапии имени А. И. Салтанова. – 2019. – № 1. – С. 85–93.
2. 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.
3. Клинические рекомендации по лечению острой осложненной и неосложненной травмы позвоночника у взрослых : клинические рекомендации / В. В. Крылов, А. А. Гринь, А. А. Луцик [и др.]. – Нижний Новгород, 2013. – 43 с.
4. Крылов, В. В. Травма позвоночника и спинного мозга / В. В. Крылов, А. А. Гринь. – Москва : Принт-Студио, 2014. – 420 с.
5. Новейшие тенденции в совершенствовании CAR-T-клеточной терапии : от лейкозов к солидным злокачественным новообразованиям / А. В. Ершов, Г. В. Демьянов, Д. А. Насруллаева [и др.] // Российский журнал детской гематологии и онкологии. – 2021. – Т. 8, № 2. – С. 84–95.
6. Новосёлова, И. Н. Этиология и клиническая эпидемиология позвоночно-спинномозговой травмы : литературный обзор / И. Н. Новосёлова // Российский нейрохирургический журнал имени профессора А. Л. Поленова. – 2019. – Т. 11, № 4. – С. 84–92.
7. Повреждения грудного и поясничного отделов позвоночника : МКБ-10: S22, S23, S24; S32, S33, S34 : клинические рекомендации : возрастная группа : взрослые и дети / Министерство здравоохранения Российской Федерации, Ассоциация нейрохирургов России. – Москва, 2021. – 133 с.
8. Смирнов, В. А. Регенеративные методы лечения травмы спинного мозга. Обзор литературы. Часть 1 / В. А. Смирнов, А. А. Гринь, В. В. Крылов //

Нейрохирургия. – 2019. – Т. 21, № 2. – С. 66–75.

9. Смирнов, В. А. Регенеративные методы лечения травмы спинного мозга. Обзор литературы. Часть 2 / В. А. Смирнов, А. А. Гринь // Нейрохирургия. – 2019. – Т. 21, № 3. – С. 83–92.

10. Смирнов, В. А. Регенеративные методы лечения травмы спинного мозга. Обзор литературы. Часть 3 / В. А. Смирнов, А. А. Гринь // Нейрохирургия. – 2019. – Т. 21, № 4. – С. 97–103.

11. Эпидемиология травм позвоночника и спинного мозга / В. С. Толкачев, С. П. Бажанов, В. Ю. Ульянов [и др.] // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2018. – Т. 14, № 3. – С. 592–595.

12. A Biosafety Study of Human Umbilical Cord Blood Mononuclear Cells Transduced with Adenoviral Vector Carrying Human Vascular Endothelial Growth Factor cDNA In Vitro / I. I. Salafutdinov, D. Z. Gatina, M. I. Markelova [et al.] // Biomedicines. – 2023. – Vol. 11, № 7. – P. 2020.

13. A clinical practice guideline for the management of acute spinal cord injury : introduction, rationale, and scope / M. G. Fehlings, L. A. Tetreault, J. R. Wilson [et al.] // Global Spine Journal. – 2017. – Vol. 7, № 3, suppl. – P. 84S–94S.

14. A Clinical Practice Guideline for the Management of Patients With Acute Spinal Cord Injury : Recommendations on Hemodynamic Management / B. K. Kwon, L. A. Tetreault, A. R. Martin [et al.] // Global Spine Journal. – 2024. – Vol. 14, № 3, suppl. – P. 187S–211S.

15. A clinical practice guideline for the management of patients with acute spinal cord injury : Recommendations on the use of methylprednisolone sodium succinate / M. G. Fehlings, J. R. Wilson, L. A. Tetreault [et al.] // Global Spine Journal. – 2017. – Vol. 7, № 3 suppl. – P. 203S–211S.

16. A direct comparison between norepinephrine and phenylephrine for augmenting spinal cord perfusion in a porcine model of spinal cord injury / F. Streijger, K. So, N. Manouchehri [et al.] // Journal of Neurotrauma. – 2018. – Vol. 35. – P. 1345–1357.

17. A New Insight into the Study of Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM)

Polysialylation Inhibition Incorporated the Molecular Docking Models into the NMR Spectroscopy of a Crucial Peptide-Ligand Interaction / R. B. Huang, B. Lu, S. M. Liao [et al.] // *Biomolecules*. – 2025. – Vol. 16, № 1. – P. 19.

18. A novel fiber chimeric conditionally replicative adenovirus-Ad5/F35 for tumor therapy / M. Yang, C. S. Yang, W. Guo [et al.] // *Cancer Biol. Ther.* – 2017. – Vol. 18. – P. 833–840.

19. A Phase III clinical trial showing limited efficacy of autologous mesenchymal stem cell therapy for spinal cord injury / S. K. Oh, K. H. Choi, J. Y. Yoo [et al.] // *Neurosurgery*. – 2016. – Vol. 78, № 3. – P. 436–447.

20. A pilot study of cell-mediated gene therapy for spinal cord injury in mini pigs / R. R. Islamov, M. E. Sokolov, F. V. Bashirov [et al.] // *Neuroscience Letters*. – 2017. – Vol. 644. – P. 67–75.

21. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury : Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study / M. B. Bracken, M. J. Shepard, W. F. Collins [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 1990. – Vol. 322. – P. 1405–1411.

22. A Review of Strategies Associated with Surgical Decompression in Traumatic Spinal Cord Injury / Y. K. Zhu, F. T. Lu, G. D. Zhang, Z. P. Liu // *Journal of Neurological Surgery Part A : Central European Neurosurgery*. – 2023. – Vol. 84, № 6. – P. 570–577.

23. A review of vascular endothelial growth factor and its potential to improve functional outcomes following spinal cord injury / C. Zamanian, G. Kim, C. Onyedimma [et al.] // *Spinal Cord*. – 2023. – Vol. 61, № 4. – P. 231–237.

24. A sandwich structured drug delivery composite membrane for improved recovery after spinal cord injury under longtime controlled release / X. Song, Y. Xu, J. Wu [et al.] // *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*. – 2021. – Vol. 199. – P. 111529.

25. Acute spinal cord injury : Pathophysiology and pharmacological intervention (Review) / Y. Zhang, A. Al Mamun, Y. Yuan [et al.] // *Molecular Medicine Reports*. – 2021. – Vol. 23. – P. 1–18.

26. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy / M. F. Naso, B. Tomkowicz, W. L. Perry III, W. R. Strohl // *BioDrugs*. – 2017. – Vol. 31. – P. 317–334.

27. Adenoviral Vector Carrying Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor for Direct Gene Therapy in Comparison with Human Umbilical Cord Blood Cell-Mediated Therapy of Spinal Cord Injury in Rat / Y. O. Mukhamedshina, G. F. Shaymardanova, F. F. Garanina [et al.] // *Spinal Cord*. – 2016. – Vol. 54, № 5. – P. 347–359.

28. Adenovirus type-35 vectors block human CD4⁺ T-cell activation via CD46 ligation / W. C. Adams, C. Gujer, G. McInerney [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2011. – Vol. 108, № 18. – P. 7499–7504.

29. Adenovirus-mediated Gene Delivery : Potential Applications for Gene and Cell-Based Therapies in the New Era of Personalized Medicine / C. S. Lee, E. S. Bishop, R. Zhang [et al.] // *Genes & Diseases*. – 2017. – Vol. 4, № 2. – P. 43–63.

30. Adult neural progenitor cells transplanted into spinal cord injury differentiate into oligodendrocytes, enhance myelination, and contribute to recovery / S. R. Sankavaram, R. Hakim, R. Covacu [et al.] // *Stem Cell Reports*. – 2019. – Vol. 12, № 5. – P. 950–966.

31. Agoston, D. V. How to translate time? The temporal aspect of human and rodent biology / D. V. Agoston // *Frontiers in Neurology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 250535.

32. Ahmad, A. Molecular mechanism of VEGF and its role in pathological angiogenesis / A. Ahmad, M. I. Nawaz // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 2022. – Vol. 123, № 12. – P. 1938–1965.

33. Aiuti, A. Gene therapy for ADA-SCID, the first marketing approval of an ex vivo gene therapy in Europe : paving the road for the next generation of advanced therapy medicinal products / A. Aiuti, M. G. Roncarolo, L. Naldini // *EMBO Molecular Medicine*. – 2017. – Vol. 9, № 6. – P. 737–740.

34. Allogeneic neural stem/progenitor cells derived from embryonic stem cells promote functional recovery after transplantation into injured spinal cord of nonhuman primates / H. Iwai, H. Shimada, S. Nishimura [et al.] // *Stem Cells Translational Medicine*. – 2015. – Vol. 4, № 7. – P. 708–719.

35. Almad, A. Oligodendrocyte Fate after Spinal Cord Injury / A. Almad, F. R. Sahinkaya, D. M. McTigue // *Neurotherapeutics*. – 2011. – Vol. 8. – P. 262–273.

36. Angiogenesis in Spinal Cord Injury : Progress and Treatment / K. Tsivelekas,

D. S. Evangelopoulos, D. Pallis [et al.] // *Cureus*. – 2022. – Vol. 14, № 5. – P. e25475.

37. Animal Models for Treating Spinal Cord Injury Using Biomaterials-Based Tissue Engineering Strategies / J. J. Li, H. Liu, Y. Zhu [et al.] // *Tissue Engineering Part B : Reviews*. – 2022. – Vol. 28. – P. 79–100.

38. Animal Models of Spinal Cord Injury / V. E. Sobolev, Y. I. Sysoev, T. V. Vyunova, P. E. Musienko // *Biomedicines*. – 2025. – Vol. 13, № 6. – P. 1427.

39. Animal models of spinal cord injury : A systematic review / M. Sharif-Alhoseini, M. Khormali, M. Rezaei [et al.] // *Spinal Cord*. – 2017. – Vol. 55. – P. 714–721.

40. Application and challenge of Schwann cell transplantation in spinal cord injury and clinical trial / M. F. Lu, J. P. Liu, Y. S. Xu [et al.] // *International Journal of Surgery*. – 2025. – Vol. 111, № 11. – P. 8284–8300.

41. Application and challenges of olfactory ensheathing cells in clinical trials of spinal cord injury / H. Y. Huang, M. J. Xiong, F. Q. Pu [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2024. – Vol. 963. – P. 176238.

42. Appraisal for the Potential of Viral and Nonviral Vectors in Gene Therapy : A Review / M. H. Butt, M. Zaman, A. Ahmad [et al.] // *Genes*. – 2022. – Vol. 13, № 8. – P. 1370.

43. Astrocytes in human central nervous system diseases : a frontier for new therapies / A. Verkhratsky, A. Butt, B. Li [et al.] // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2023. – Vol. 8, № 1. – P. 396.

44. Autologous Ex Vivo Lentiviral Gene Therapy for Adenosine Deaminase Deficiency / D. B. Kohn, C. Booth, K. L. Shaw [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2021. – Vol. 384, № 21. – P. 2002–2013.

45. Autologous Genetically Enriched Leucoconcentrate in the Preventive and Acute Phases of Stroke Treatment in a Mini-Pig Model / Z. Safiulloev, A. Izmailov, M. Sokolov [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14, № 10. – P. 2209.

46. Bastien, D. Cytokine pathways regulating glial and leukocyte function after spinal cord and peripheral nerve injury / D. Bastien, S. Lacroix // *Experimental Neurology*. – 2014. – Vol. 258. – P. 62–77.

47. Bhatt, M. The Role of Inflammatory Cascade and Reactive Astrogliosis in Glial Scar Formation Post-spinal Cord Injury / M. Bhatt, M. Sharma, B. Das // Cellular and Molecular Neurobiology. – 2024. – Vol. 44, № 1. – P. 78.
48. Blesch, A. Axonal responses to cellularly delivered NT-4/5 after spinal cord injury / A. Blesch // Molecular and Cellular Neuroscience. – 2004. – Vol. 27, № 2. – P. 190–201.
49. Blocking VEGF by bevacizumab compromises electrophysiological and morphological properties of hippocampal neurons / P. Latzer, O. Shchyglo, T. Hartl [et al.] // Front. Cell Neurosci. – 2019. – Vol. 13. – P. 113.
50. Bowers, C. A. Methylprednisolone for acute spinal cord injury : an increasingly philosophical debate / C. A. Bowers, B. Kundu, G. W. Hawryluk // Neural Regeneration Research. – 2016. – Vol. 11, № 6. – P. 882–885.
51. Brudno, J. N. CAR T Cells and T-Cell Therapies for Cancer : A Translational Science Review / J. N. Brudno, M. V. Maus, C. S. Hinrichs // JAMA. – 2024. – Vol. 332, № 22. – P. 1924–1935.
52. Cell Adhesion Molecules and Protein Synthesis Regulation in Neurons / I. Kozlova, S. Sah, R. Keable [et al.] // Frontiers in Molecular Neuroscience. – 2020. – Vol. 13. – P. 592126.
53. Chen, W. T. The progress and controversies regarding steroid use in acute spinal cord injury / W. T. Chen, Y. P. Zhou, G. S. Zhang // European Review for Medical and Pharmacological Sciences. – 2023. – Vol. 27, № 13. – P. 6101–6110.
54. Chinnock, P. Gangliosides for acute spinal cord injury / P. Chinnock, I. Roberts // Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2005. – № 2. – P. CD004444.
55. Choo, S. Z. L. Gam-COVID-Vac (Sputnik V) : a heterologous adenoviral vector-based COVID-19 vaccine / S. Z. L. Choo, S. P. Teo // Aging Pathobiology and Therapeutics. – 2021. – Vol. 3, № 2. – P. 43–45.
56. Clinical Application of Adenovirus (AdV) : A Comprehensive Review / M. Salauddin, S. Saha, M. G. Hossain [et al.] // Viruses. – 2024. – Vol. 16, № 7. – P. 1094.
57. Clinical observation of umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in treatment for sequelae of thoracolumbar spinal cord injury / H. Cheng, X. Liu, R. Hua

[et al.] // Journal of Translational Medicine. – 2014. – Vol. 12. – P. 253.

58. Cloning and Large-Scale Production of High-Capacity Adenoviral Vectors Based on the Human Adenovirus Type 5 / E. Ehrke-Schulz, W. Zhang, M. Schiwon [et al.] // Journal of Visualized Experiments. – 2016. – Vol. 107. – P. e52894.

59. CNS drug development – Lost in translation? / A. Talevi, C. L. Bellera, M. Di Ianni [et al.] // Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. – 2012. – Vol. 12. – P. 959–970.

60. Combinatorial treatment of acute spinal cord injury with ghrelin, ibuprofen, C16, and ketogenic diet does not result in improved histologic or functional outcome / F. Streijger, J. H. Lee, G. J. Duncan [et al.] // Journal of Neuroscience Research. – 2014. – Vol. 92, № 7. – P. 870–883.

61. Combined Supra- and Sub-Lesional Epidural Electrical Stimulation for Restoration of the Motor Functions after Spinal Cord Injury in Mini Pigs / F. Fadeev, A. Ereemeev, F. Bashirov [et al.] // Brain Sciences. – 2020. – Vol. 10. – P. 744.

62. Comparative neuroanatomy of the lumbosacral spinal cord of the rat, cat, pig, monkey, and human / A. Toossi, B. Bergin, M. Marefatallah [et al.] // Scientific Reports. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 1955.

63. Current Advancements in Spinal Cord Injury Research – Glial Scar Formation and Neural Regeneration / T. Clifford, Z. Finkel, B. Rodriguez [et al.] // Cells. – 2023. – Vol. 12, № 6. – P. 853.

64. Current Knowledge of Microglia in Traumatic Spinal Cord Injury / L. Xu, J. Wang, Y. Ding [et al.] // Frontiers in Neurology. – 2022. – Vol. 12. – P. 796704.

65. Current State of Human Gene Therapy : Approved Products and Vectors / A. Y. Shchaslyvyi, S. V. Antonenko, M. G. Tesliuk, G. D. Telegeev // Pharmaceuticals. – 2023. – Vol. 16, № 10. – P. 1416.

66. Development of a large-animal model to measure dynamic cerebrospinal fluid pressure during spinal cord injury : Laboratory investigation / C. F. Jones, J. H. Lee, B. K. Kwon, P. A. Crompton // Journal of Neurosurgery : Spine. – 2012. – Vol. 16, № 6. – P. 624–635.

67. Deyle, D. R. Adeno-associated virus integration / D. R. Deyle, D. W. Russell // Current Opinion in Molecular Therapeutics. – 2009. – Vol. 11. – P. 442–447.

68. Deznabi, N. Neurotrophic factors-based therapeutic strategies in the spinal cord injury : an overview of recent preclinical studies in rodent models / N. Deznabi, S. Hosseini, M. Rajabi // *The Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery*. – 2023. – Vol. 59. – P. 63.

69. Differences in neuroplasticity after spinal cord injury in varying animal models and humans / M. E. Filipp, B. J. Travis, S. S. Henry [et al.] // *Neural Regeneration Research*. – 2019. – Vol. 14. – P. 7–19.

70. Differentiation of human adipose-derived stem cells into neuron/motoneuron-like cells for cell replacement therapy of spinal cord injury / S. Gao, X. Guo, S. Zhao [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2019. – Vol. 10. – P. 597.

71. Ding, Y. The NF- κ B Pathway : a Focus on Inflammatory Responses in Spinal Cord Injury / Y. Ding, Q. Chen // *Molecular Neurobiology*. – 2023. – Vol. 60, № 9. – P. 5292–5308.

72. Does mean arterial pressure augmentation improve neurological recovery of blunt spinal cord injuries : an EAST multicenter trial / A. LaRiccia, S. Doris, B. Shah [et al.] // *Trauma Surgery & Acute Care Open*. – 2025. – Vol. 10, № 3. – P. e001768.

73. Donovan, J. Clinical trials in traumatic spinal cord injury / J. Donovan, S. Kirshblum // *Neurotherapeutics*. – 2018. – Vol. 15. – P. 654–668.

74. Early decompressive surgery in patients with traumatic spinal cord injury improves neurological outcome / M. Haldrup, O. S. Schwartz, H. Kasch, M. M. Rasmussen // *Acta Neurochirurgica*. – 2019. – Vol. 161, № 10. – P. 2223–2228.

75. Early versus delayed decompression for traumatic cervical spinal cord injury : results of the Surgical Timing in Acute Spinal Cord Injury Study (STASCIS) / M. G. Fehlings, A. Vaccaro, J. R. Wilson [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7. – P. e32037.

76. Effect of neuroglobin genetically modified bone marrow mesenchymal stem cells transplantation on spinal cord injury in rabbits / W. P. Lin, X. W. Chen, L. Q. Zhang [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, № 5. – P. e63444.

77. Effect of NT-3 on repair of spinal cord injury through the MAPK signaling pathway / J. Ye, R. Xue, Z.-Y. Ji [et al.] // *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. – 2020. – Vol. 24, № 5. – P. 2165–2172.

78. Effects of Retrograde Gene Transfer of Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Rostral Spinal Cord of a Compression Model in Rat / T. Zhao, Y. Li, X. Dai [et al.] // *Molecular Biology Reports*. – 2012. – Vol. 39, № 8. – P. 8045–8051.

79. Eli, I. Acute Traumatic Spinal Cord Injury / I. Eli, D. P. Lerner, Z. Ghogawala // *Neurologic clinics*. – 2021. – Vol. 39, № 2. – P. 471–488.

80. Enhanced regeneration and reinnervation following timed GDNF gene therapy in a cervical ventral root avulsion / R. Eggers, F. de Winter, C. Arkenaar [et al.] // *Experimental Neurology*. – 2019. – Vol. 321. – P. 113037.

81. Enhancing Functional Recovery After Spinal Cord Injury Through Neuroplasticity : A Comprehensive Review / Y. Y. Wu, Y. M. Gao, T. Feng [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2025. – Vol. 26, № 14. – P. 6596.

82. Enhancing peripheral nerve regeneration with neurotrophic factors and bioengineered scaffolds : A basic science and clinical perspective / B. V. Lien, N. J. Brown, S. C. Ransom [et al.] // *Journal of the Peripheral Nervous System*. – 2020. – Vol. 25. – P. 320–334.

83. Ependymal cell contribution to scar formation after spinal cord injury is minimal, local and dependent on direct ependymal injury / Y. Ren, Y. Ao, T. M. O'Shea [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – P. 41122.

84. Epidemiology of worldwide spinal cord injury : a literature review / Y. Kang, H. Ding, H. X. Zhou [et al.] // *Journal of Neurorestoratology*. – 2017. – Vol. 6. – P. 1–9.

85. Evaluation of direct and cell-mediated triple-gene therapy in spinal cord injury in rats / R. R. Islamov, A. A. Izmailov, M. E. Sokolov [et al.] // *Brain Research Bulletin*. – 2017. – Vol. 132. – P. 44–52.

86. Ex vivo adenoviral vector-mediated neurotrophin gene transfer to olfactory ensheathing glia : effects on rubrospinal tract regeneration, lesion size, and functional recovery after implantation in the injured rat spinal cord / M. J. Ruitenberg, G. W. Plant, F. P. Hamers [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2003. – Vol. 23, № 18. – P. 7045–7058.

87. Experimental modeling of spinal cord injury : Characterization of a force-defined injury device / S. W. Scheff, A. G. Rabchevsky, I. Fugaccia [et al.] // *Journal of Neurotrauma*. – 2003. – Vol. 20. – P. 179–193.

88. Experimental Models of Spinal Cord Injury in Laboratory Rats / A. N. Minakov, A. S. Chernov, D. S. Asutin [et al.] // *Acta Naturae*. – 2018. – Vol. 10, № 3. – P. 4–10.
89. Exploring the Effectiveness and Potential Pharmacological Mechanism of Minocycline for Spinal Cord Injury through Meta-Analysis and Network Pharmacology / C. W. Hu, Z. Y. Li, K. Zhu [et al.] // *Current Neuropharmacology*. – 2025. – Vol. 23, № 9. – P. 1060–1080.
90. Fehlings, M. G. Methylprednisolone for the treatment of acute spinal cord injury : counterpoint / M. G. Fehlings, J. R. Wilson, N. Cho // *Neurosurgery*. – 2014. – Vol. 61, Suppl. 1. – P. 36–42.
91. Fgf2 improves functional recovery decreasing gliosis and increasing radial glia and neural progenitor cells after spinal cord injury / Y. Goldshmit, F. Frisca, A. R. Pinto [et al.] // *Brain and Behavior*. – 2014. – Vol. 4, № 2. – P. 187–200.
92. Fibroblast growth factors in the management of spinal cord injury / Y. Zhou, Z. Wang, J. Li [et al.] // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2018. – Vol. 22, № 1. – P. 25–37.
93. Fibronectin EDA forms the chronic fibrotic scar after contusive spinal cord injury / J. G. Cooper, S. J. Jeong, T. McGuire [et al.] // *Neurobiology of Disease*. – 2018. – Vol. 116. – P. 60–68.
94. Fletcher, J. L. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Central Nervous System Myelination : A New Mechanism to Promote Myelin Plasticity and Repair / J. L. Fletcher, S. S. Murray, J. Xiao // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – Vol. 19, № 12. – P. 4131.
95. For Better or for Worse : A Look Into Neutrophils in Traumatic Spinal Cord Injury / S. Zivkovic, M. Ayazi, G. Hammel, Y. Ren // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2021. – Vol. 15. – P. 648076.
96. Franz, C. K. Polysialylated neural cell adhesion molecule is necessary for selective targeting of regenerating motor neurons / C. K. Franz, U. Rutishauser, V. F. Rafuse // *Journal of Neuroscience*. – 2005. – Vol. 25, № 8. – P. 2081–2091.
97. Functional outcomes in individuals undergoing very early (< 5 h) and early (5–24 h) surgical decompression in traumatic cervical spinal cord injury : analysis of

neurological improvement from the Austrian Spinal Cord Injury Study / G. Mattiassich, M. Gollwitzer, F. Gaderer [et al.] // *Journal of Neurotrauma*. – 2017. – Vol. 34, № 24. – P. 3362–3371.

98. Functional recovery in acute traumatic spinal cord injury after transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells / S. L. Hu, H. S. Luo, J. T. Li [et al.] // *Critical Care Medicine*. – 2010. – Vol. 38, № 11. – P. 2181–2189.

99. GDNF Gene-Engineered Adipose-Derived Stem Cells Seeded EmuOil-Loaded Electrospun Nanofibers for Axonal Regeneration Following Spinal Cord Injury / K. Nejati, D. Mehdi, S. Ghareghomi [et al.] // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. – 2020. – Vol. 60. – P. 102095.

100. GDNF-enhanced axonal regeneration and myelination following spinal cord injury is mediated by primary effects on neurons / L. Zhang, Z. Ma, G. M. Smith [et al.] // *Glia*. – 2009. – Vol. 57. – P. 1178–1191.

101. Gene therapy strategies for the treatment of spinal cord injury / K. Uchida, H. Nakajima, A. R. Guerrero [et al.] // *Therapeutic Delivery*. – 2014. – Vol. 5, № 5. – P. 591–607.

102. Gruner, J. A. A Monitored Contusion Model of Spinal Cord Injury in the Rat / J. A. Gruner // *Journal of Neurotrauma*. – 1992. – Vol. 9. – P. 123–128.

103. Hadley, M. N. Introduction to the guidelines for the management of acute cervical spine and spinal cord injuries / M. N. Hadley, B. C. Walters // *Neurosurgery*. – 2013. – Vol. 72, Suppl. 2. – P. 5–16.

104. Hematopoietic Stem-Cell Gene Therapy for Cerebral Adrenoleukodystrophy / F. Eichler, C. Duncan, P. L. Musolino [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2017. – Vol. 377, № 17. – P. 1630–1638.

105. Histologic and Ultrastructural Changes of the Spinal Cord after High Velocity Missile Injury to the Back / D. Wang, Z. Wang, X. Yin [et al.] // *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. – 1996. – Vol. 40, Suppl. S3. – P. 90S–93S.

106. Hosseini, S. M. Neural stem cell therapies for spinal cord injury repair : an update on recent preclinical and clinical advances / S. M. Hosseini, B. Borys, S. Karimi-Abdolrezaee // *Brain*. – 2024. – Vol. 147, № 3. – P. 766–793.

107. Hu, B. Y. Directed differentiation of neural-stem cells and subtype-specific neurons from hESCs / B. Y. Hu, S. C. Zhang // *Methods in Molecular Biology*. – 2010. – Vol. 636. – P. 123–137.

108. Hugenholtz, H. Methylprednisolone for acute spinal cord injury : not a standard of care / H. Hugenholtz // *Canadian Medical Association Journal*. – 2003. – Vol. 168, № 9. – P. 1145–1146.

109. Hughes, J. T. The Edwin Smith Surgical Papyrus : an analysis of the first case reports of spinal cord injuries / J. T. Hughes // *Paraplegia*. – 1988. – Vol. 26, № 2. – P. 71–82.

110. Human brain-derived neurotrophic factor gene-modified bone marrow mesenchymal stem cells combined with erythropoietin can improve acute spinal cord injury / Y. Li, H. Wang, X. Ding [et al.] // *Dose Response*. – 2020. – Vol. 18, № 1. – P. 1559325820910930.

111. Human Mesenchymal Stem Cells for Spinal Cord Injury / M. Alishahi, A. Anbiyaiee, M. Farzaneh, S. E. Khoshnam // *Current Stem Cell Research & Therapy*. – 2020. – Vol. 15, № 4. – P. 340–348.

112. Ibuprofen enhances recovery from spinal cord injury by limiting tissue loss and stimulating axonal growth / X. Wang, S. Budel, K. Baughman [et al.] // *Journal of Neurotrauma*. – 2009. – Vol. 26, № 1. – P. 81–95.

113. Impact and Mechanisms of Action of BDNF on Neurological Disorders, Cancer, and Cardiovascular Diseases / M. Lei, Q. Liu, J. Nie [et al.] // *CNS Neurosci Ther*. – 2024. – Vol. 30, № 12. – P. e70138.

114. Increased mean arterial pressure goals after spinal cord injury and functional outcome / N. D. Martin, C. Kepler, M. Zubair [et al.] // *Journal of Emergencies, Trauma, and Shock*. – 2015. – Vol. 8, № 2. – P. 94–98.

115. Inflammation after spinal cord injury : a review of the critical timeline of signaling cues and cellular infiltration / D. J. Hellenbrand, C. M. Quinn, Z. J. Piper [et al.] // *Journal of Neuroinflammation*. – 2021. – Vol. 18. – P. 284.

116. Integration of multiple prognostic predictors in a porcine spinal cord injury model : A further step closer to reality / C.-K. Hu, M.-H. Chen, Y.-H. Wang [et al.] //

Frontiers in Neurology. – 2023. – Vol. 14. – P. 1136267.

117. Intrathecal decompression versus epidural decompression in the treatment of severe spinal cord injury in rat model : a randomized controlled preclinical study / J. Zhang, H. Wang, C. Zhang, W. Li // Journal of Orthopaedic Surgery and Research. – 2016. – Vol. 11. – P. 34.

118. Intrathecal injection of human umbilical cord blood stem cells attenuates spinal cord ischaemic compromise in rats / G. I. Judas, S. G. Ferreira, R. Simas [et al.] // Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery. – 2014. – Vol. 18, № 6. – P. 757–762.

119. Intravenous infusion of adipose-derived stem/stromal cells improves functional recovery of rats with spinal cord injury / Y. Ohta, A. Hamaguchi, M. Ootaki [et al.] // Cytotherapy. – 2017. – Vol. 19, № 7. – P. 839–848.

120. Islam, A. The use of viral vectors to promote repair after spinal cord injury / A. Islam, V. J. Tom // Experimental Neurology. – 2022. – Vol. 354. – P. 114102.

121. Jacob-Dolan, C. COVID-19 Vaccines : Adenoviral Vectors / C. Jacob-Dolan, D. H. Barouch // Annual Review of Medicine. – 2022. – Vol. 73. – P. 41–54.

122. Karsy, M. Modern Medical Management of Spinal Cord Injury / M. Karsy, G. Hawryluk // Current Neurology and Neuroscience Reports. – 2019. – Vol. 19, № 9. – P. 65.

123. Keam, S. J. Elivaldogene Autotemcel : First Approval / S. J. Keam // Molecular Diagnosis & Therapy. – 2021. – Vol. 25, № 6. – P. 803–809.

124. Keefe, K. M. Targeting Neurotrophins to Specific Populations of Neurons : NGF, BDNF, and NT-3 and Their Relevance for Treatment of Spinal Cord Injury / K. M. Keefe, I. S. Sheikh, G. M. Smith // International Journal of Molecular Sciences. – 2017. – Vol. 18. – P. 548.

125. Kishikawa, H. Targeting angiogenin in therapy of amyotrophic lateral sclerosis / H. Kishikawa, D. Wu, G. F. Hu // Expert Opinion on Therapeutic Targets. – 2008. – Vol. 12, № 10. – P. 1229–1242.

126. Kjell, J. Rat models of spinal cord injury : From pathology to potential therapies / J. Kjell, L. Olson // Disease Models & Mechanisms. – 2016. – Vol. 9. – P. 1125–1137.

127. Ko, H. Y. Revisit Spinal Shock : Pattern of Reflex Evolution during Spinal Shock / H. Y. Ko // Korean Journal of Neurotrauma. – 2018. – Vol. 14, № 2. – P. 47–54.
128. Kotliarova, A. Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Family Ligands, Players at the Interface of Neuroinflammation and Neuroprotection : Focus Onto the Glia / A. Kotliarova, Y. A. Sidorova // Frontiers in Cellular Neuroscience. – 2021. – Vol. 15. – P. 679034.
129. Lambrechts, M. J. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and their neuroprotective role after an acute spinal cord injury : A systematic review of animal models / M. J. Lambrechts, J. L. Cook // Global Spine Journal. – 2021. – Vol. 11. – P. 365–377.
130. Lee, B. J. Review : Steroid Use in Patients With Acute Spinal Cord Injury and Guideline Update / B. J. Lee, J. H. Jeong // Korean Journal of Neurotrauma. – 2022. – Vol. 18, № 1. – P. 22–30.
131. Leikas, A. J. Adenoviral Gene Therapy Vectors in Clinical Use – Basic Aspects with a Special Reference to Replication-Competent Adenovirus Formation and Its Impact on Clinical Safety / A. J. Leikas, S. Ylä-Herttuala, J. E. K. Hartikainen // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24. – P. 16519.
132. Lentiviral Gene Therapy for Cerebral Adrenoleukodystrophy / F. Eichler, C. N. Duncan, P. L. Musolino [et al.] // The New England Journal of Medicine. – 2024. – Vol. 391, № 14. – P. 1302–1312.
133. Lentiviral mediated expression of a NGF-soluble Nogo receptor 1 fusion protein promotes axonal regeneration / Y. Zhang, F. Gao, D. Wu [et al.] // Neurobiology of Disease. – 2013. – Vol. 58. – P. 270–280.
134. Liddelow, S. A. Reactive astrocytes : production, function, and therapeutic potential / S. A. Liddelow, B. A. Barres // Immunity. – 2017. – Vol. 46, № 6. – P. 957–967.
135. Livak, K. J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // Methods. – 2001. – Vol. 25, № 4. – P. 402–408.
136. Localization of the corticospinal tract within the porcine spinal cord :

Implications for experimental modeling of traumatic spinal cord injury / A. V. Leonard, J. Y. Menendez, B. M. Pat [et al.] // *Neuroscience Letters*. – 2017. – Vol. 648. – P. 1–7.

137. Long-distance axonal growth from human induced pluripotent stem cells after spinal cord injury / P. Lu, G. Woodruff, Y. Wang [et al.] // *Neuron*. – 2014. – Vol. 83, № 4. – P. 789–796.

138. Losey, P. Impact of vasculature damage on the outcome of spinal cord injury : a novel collagenase-induced model may give new insights into the mechanisms involved / P. Losey, D. C. Anthony // *Neural Regeneration Research*. – 2014. – Vol. 9, № 20. – P. 1783–1786.

139. Lu, P. Axon regeneration through scars and into sites of chronic spinal cord injury / P. Lu, L. L. Jones, M. H. Tuszynski // *Experimental Neurology*. – 2007. – Vol. 203, № 1. – P. 8–21.

140. Lumbar intraspinal injection of neural stem cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis : results of a phase I trial in 12 patients / J. D. Glass, N. M. Boulis, K. Johe [et al.] // *Stem Cells*. – 2012. – Vol. 30, № 6. – P. 1144–1151.

141. Lundstrom, K. Viral Vectors in Gene Therapy : Where Do We Stand in 2023? / K. Lundstrom // *Viruses*. – 2023. – Vol. 15, № 3. – P. 698.

142. Macrophage Polarization-Based Biomaterials for Repairing Spinal Cord Injury / J. Luo, W. Hu, X. Gao [et al.] // *ACS Materials Letters*. – 2024. – Vol. 6, № 12. – P. 5438–5453.

143. Malekan, M. Vascular endothelial growth factor receptors [VEGFR] as target in breast cancer treatment : current status in preclinical and clinical studies and future directions / M. Malekan, M. A. Ebrahimzadeh // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. – 2022. – Vol. 22. – P. 891–920.

144. Management of Acute Traumatic Spinal Cord Injury : A Review of the Literature / T. Y. Wang, C. Park, H. Zhang [et al.] // *Frontiers in Surgery*. – 2021. – Vol. 8. – P. 698736.

145. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery / C. P. Hofstetter, E. J. Schwarz, D. Hess [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2002. – Vol. 99, № 4. – P. 2199–2204.

146. Matrix stiffness changes affect astrocyte phenotype in an in vitro injury model / Y. Hu, G. Huang, J. Tian [et al.] // *NPG Asia Mater.* – 2021. – Vol. 13, № 1. – P. 35.
147. Mehrabian, M. NCAM1 Polysialylation : The Prion Protein's Elusive Reason for Being? / M. Mehrabian, H. Hildebrandt, G. Schmitt-Ulms // *ASN Neuro.* – 2016. – Vol. 8, № 6. – P. 1759091416679074.
148. Mekhail, M. Oligodendrocyte-protection and remyelination post-spinal cord injuries : A review / M. Mekhail, G. Almazan, M. Tabrizian // *Progress in Neurobiology.* – 2012. – Vol. 96, № 3. – P. 322–339.
149. Mesenchymal Stem Cell Therapy in Traumatic Spinal Cord Injury : A Systematic Review / R. Montoto-Meijide, R. Meijide-Faílde, S. M. Díaz-Prado, A. Montoto-Marqués // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2023. – Vol. 24, № 14. – P. 11719.
150. Methylprednisolone for the treatment of patients with acute spinal cord injuries : A propensity score-matched cohort study from a Canadian multi-center spinal cord injury registry / N. Evaniew, V. K. Noonan, N. Fallah [et al.] // *Journal of Neurotrauma.* – 2015. – Vol. 32, № 21. – P. 1674–1683.
151. Methylprednisolone or naloxone treatment after acute spinal cord injury : 1-year follow-up data. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study / M. B. Bracken, M. J. Shepard, W. F. Collins Jr [et al.] // *Journal of Neurosurgery.* – 1992. – Vol. 76, № 1. – P. 23–31.
152. Milone, M. C. Clinical use of lentiviral vectors / M. C. Milone, U. O'Doherty // *Leukemia.* – 2018. – Vol. 32, № 7. – P. 1529–1541.
153. Mingozi, F. Immune responses to AAV vectors : Overcoming barriers to successful gene therapy / F. Mingozi, K. A. High // *Blood.* – 2013. – Vol. 122. – P. 23–36.
154. Mingozi, F. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV : progress and challenges / F. Mingozi, K. A. High // *Nature Reviews Genetics.* – 2011. – Vol. 12, № 5. – P. 341–355.
155. Mitre, M. Neurotrophin signaling : novel insights into mechanisms and pathophysiology / M. Mitre, A. Mariga, M. V. Chao // *Clinical Science.* – 2017. – Vol.

131. – P. 13–23.

156. Molecular approaches for spinal cord injury treatment / F. M. de Almeida, S. A. Marques, A. C. R. Dos Santos [et al.] // *Neural Regeneration Research*. – 2023. – Vol. 18, № 1. – P. 23–30.

157. Molecular Mechanisms in the Vascular and Nervous Systems following Traumatic Spinal Cord Injury / S. Li, H. T. P. Dinh, Y. Matsuyama [et al.] // *Life (Basel)*. – 2022. – Vol. 13, № 1. – P. 9.

158. Monje, P. V. Human Schwann Cell Transplantation for Spinal Cord Injury : Prospects and Challenges in Translational Medicine / P. V. Monje, L. Deng, X. M. Xu // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2021. – Vol. 15. – P. 690894.

159. Mothe, A. J. Advances in stem cell therapy for spinal cord injury / A. J. Mothe, C. H. Tator // *Journal of Clinical Investigation*. – 2012. – Vol. 122, № 11. – P. 3824–3834.

160. Motor axonal regeneration after partial and complete spinal cord transection / P. Lu, A. Blesch, L. Graham [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2012. – Vol. 32, № 24. – P. 8208–8218.

161. Multifunctional, multichannel bridges that deliver neurotrophin encoding lentivirus for regeneration following spinal cord injury / H. M. Tuinstra, M. O. Aviles, S. Shin [et al.] // *Biomaterials*. – 2012. – Vol. 33, № 5. – P. 1618–1626.

162. Nagoshi, N. Riluzole as a neuroprotective drug for spinal cord injury : from bench to bedside / N. Nagoshi, H. Nakashima, M. G. Fehlings // *Molecules*. – 2015. – Vol. 20, № 5. – P. 7775–7789.

163. NCAM-mediated locomotor recovery from spinal cord contusion injury involves neuroprotection, axon regeneration, and synaptogenesis / S. Zhang, Y. Y. Xia, H. C. Lim [et al.] // *Neurochemistry International*. – 2010. – Vol. 56, № 8. – P. 919–929.

164. Nerve growth factor loaded macrophage-derived nanovesicles for inhibiting neuronal apoptosis after spinal cord injury / N. Xia, Z. Gao, H. Hu [et al.] // *Journal of Biomaterials Applications*. – 2021. – Vol. 36. – P. 276–288.

165. Neural Stem Cells Overexpressing Nerve Growth Factor Improve Functional Recovery in Rats Following Spinal Cord Injury via Modulating Microenvironment and Enhancing Endogenous Neurogenesis / L. Wang, S. Gu, J. Gan [et al.] // *Frontiers in*

Cellular Neuroscience. – 2021. – Vol. 15. – P. 773375.

166. Neuroinflammation and scarring after spinal cord injury : therapeutic roles of MSCs on inflammation and glial scar / Q. M. Pang, S. Y. Chen, Q.-J. Xu [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 751021.

167. Neurological recovery following traumatic spinal cord injury : A systematic review and meta-analysis / M. Khorasanizadeh, M. Yousefifard, M. Eskian [et al.] // *Journal of Neurosurgery*. – 2019. – Vol. 30, № 5. – P. 683–699.

168. Neuropathological and motor impairments after incomplete cervical spinal cord injury in pigs / P. Del Cerro, A. Barriga-Martín, H. Vara [et al.] // *Journal of Neurotrauma*. – 2021. – Vol. 38, № 21. – P. 2956–2977.

169. Neuropharmacology PR1P ameliorates neurodegeneration through activation of VEGF signaling pathway and remodeling of the extracellular environment / Z. L. Chi, A. Adini, A. E. Birsner [et al.] // *Neuropharmacology*. – 2019. – Vol. 148. – P. 96–106.

170. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia / S. A. Liddelow, K. A. Guttenplan, L. E. Clarke [et al.] // *Nature*. – 2017. – Vol. 541, № 7638. – P. 481–487.

171. Neurotrophic factors for spinal cord repair : which, where, how and when to apply, and for what period of time? / A. R. Harvey, S. J. Lovett, B. T. Majda [et al.] // *Brain Research*. – 2015. – Vol. 1619. – P. 36–71.

172. New Therapy for Spinal Cord Injury : Autologous Genetically-Enriched Leucoconcentrate Integrated with Epidural Electrical Stimulation / R. Islamov, F. Bashirov, A. Izmailov [et al.] // *Cells*. – 2022. – Vol. 11, № 1. – P. 144.

173. Ng, M. T. Vascular disruption and the role of angiogenic proteins after spinal cord injury / M. T. Ng, A. T. Stammers, B. K. Kwon // *Translational Stroke Research*. – 2011. – Vol. 2, № 4. – P. 474–491.

174. NT-3 Combined with TGF- β Signaling Pathway Enhance the Repair of Spinal Cord Injury by Inhibiting Glial Scar Formation and Promoting Axonal Regeneration / T. Chen, X. He, J. Wang [et al.] // *Molecular Biotechnology*. – 2024. – Vol. 66, № 6. – P. 1484–1495.

175. NT-3 expression from engineered olfactory ensheathing glia promotes spinal

sparing and regeneration / M. J. Ruitenberg, D. B. Levison, S. V. Lee [et al.] // *Brain*. – 2005. – Vol. 128, Pt. 4. – P. 839–853.

176. NT3-chitosan enables de novo regeneration and functional recovery in monkeys after spinal cord injury / J. S. Rao, C. Zhao, A. Zhang [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2018. – Vol. 115, № 24. – P. E5595–E5604.

177. Obeagu, E. I. Umbilical cord blood : a comprehensive review of protective and restorative properties in clinical applications – a narrative review / E. I. Obeagu // *Annals of Medicine and Surgery*. – 2025. – Vol. 87, № 10. – P. 6618–6625.

178. Olfactory Ensheathing Cells for Spinal Cord Injury : Sniffing Out the Issues / R. Yao, M. Murtaza, J. T. Velasquez [et al.] // *Cell Transplantation*. – 2018. – Vol. 27, № 6. – P. 879–889.

179. Oligodendrocyte, astrocyte, and microglia crosstalk in myelin development, damage, and repair / H. S. Domingues, C. C. Portugal, R. Socodato, J. B. Relvas // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2016. – Vol. 4. – P. 71.

180. Orihuela, R. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states / R. Orihuela, C. A. McPherson, G. J. Harry // *British Journal of Pharmacology*. – 2016. – Vol. 173, № 4. – P. 649–665.

181. Ortmann, S. D. Glial cell line-derived neurotrophic factor as a treatment after spinal cord injury / S. D. Ortmann, D. J. Hellenbrand // *Neural Regeneration Research*. – 2018. – Vol. 13, № 10. – P. 1733–1734.

182. Papaioannou, I. Clinical applications of gene therapy for rare diseases : A review / I. Papaioannou, J. S. Owen, R. J. Yáñez-Muñoz // *International Journal of Experimental Pathology*. – 2023. – Vol. 104, № 4. – P. 154–176.

183. Pediatric Spinal Cord Injury : A Review / N. S. C. Cunha, A. Malvea, S. Sadat [et al.] // *Children (Basel)*. – 2023. – Vol. 10, № 9. – P. 1456.

184. Peripherally delivered Adeno-associated viral vectors for spinal cord injury repair / J. D. Sydney-Smith, A. B. Spejo, P. M. Warren, L. D. F. Moon // *Experimental Neurology*. – 2022. – Vol. 348. – P. 113945.

185. Pharmacological therapy for acute spinal cord injury / R. J. Hurlbert, M. N. Hadley, B. C. Walters [et al.] // *Neurosurgery*. – 2015. – Vol. 76, Suppl. 1. – P. S71–S83.

186. Phase 1 safety trial of autologous human schwann cell transplantation in chronic spinal cord injury / K. Gant, J. Guest, A. Palermo [et al.] // *Journal of Neurotrauma*. – 2022. – Vol. 39, № 3–4. – P. 285–299.

187. Phase I-II Clinical Trial Assessing Safety and Efficacy of Umbilical Cord Blood Mononuclear Cell Transplant Therapy of Chronic Complete Spinal Cord Injury / H. Zhu, W. Poon, Y. Liu [et al.] // *Cell Transplantation*. – 2016. – Vol. 25, № 11. – P. 1925–1943.

188. Polarization of reactive astrocytes in response to spinal cord injury is enhanced by M2 macrophage-mediated activation of Wnt/ β -catenin pathway / I. Sonn, M. Nakamura, F. Renault-Mihara, H. Okano // *Molecular Neurobiology*. – 2020. – Vol. 57, № 4. – P. 1847–1862.

189. Polysialylated Neural Cell Adhesion Molecule Promotes Remodeling and Formation of Hippocampal Synapses / A. Dityatev, G. Dityateva, V. Sytnyk [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2004. – Vol. 24. – P. 9372–9382.

190. Porcine Model of Spinal Cord Injury : A Systematic Review / C. Weber-Levine, A. M. Hersh, K. Jiang [et al.] // *Neurotrauma Reports*. – 2022. – Vol. 3, № 1. – P. 352–368.

191. Porcine Models of Spinal Cord Injury / C. A. Wathen, Y. G. Ghenbot, A. K. Ozturk [et al.] // *Biomedicines*. – 2023. – Vol. 11, № 8. – P. 2202.

192. Porcine spinal cord injury model for translational research across multiple functional systems / R. U. Ahmed, C. A. Knibbe, F. Wilkins [et al.] // *Experimental Neurology*. – 2023. – Vol. 359. – P. 114267.

193. Progesterone neuroprotection : The background of clinical trial failure / M. Schumacher, C. Denier, J. P. Oudinet [et al.] // *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. – 2016. – Vol. 160. – P. 53–66.

194. Proteomic portraits reveal evolutionarily conserved and divergent responses to spinal cord injury / M. A. Skinnider, J. Rogalski, S. Tigchelaar [et al.] // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2021. – Vol. 20. – P. 100096.

195. Radiographic Morphometry of the Lumbar Spine in Munich Miniature Pigs / E. C. Engelke, C. Post, C. D. Pfarrer [et al.] // *Journal of the American Association for*

Laboratory Animal Science. – 2016. – Vol. 55. – P. 336–345.

196. Rationale, design and critical end points for the Riluzole in Acute Spinal Cord Injury Study (RISCIS) : a randomized, double-blinded, placebo-controlled parallel multicenter trial / M. G. Fehlings, H. Nakashima, N. Nagoshi [et al.] // *Spinal Cord*. – 2016. – Vol. 54. – P. 8–15.

197. Recent advances in nanotechnology approaches for non-viral gene therapy / Y. Jiang, M. Fan, Z. Yang [et al.] // *Biomaterials Science*. – 2022. – Vol. 10, № 24. – P. 6862–6892.

198. Recent update on basic mechanisms of spinal cord injury / S. A. Quadri, M. Farooqui, A. Ikram [et al.] // *Neurosurgical Review*. – 2020. – Vol. 43, № 2. – P. 425–441.

199. Recombinant Adenoviruses for Delivery of Therapeutics Following Spinal Cord Injury / A. O. Sosnovtseva, O. V. Stepanova, A. A. Stepanenko [et al.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2022. – Vol. 12. – P. 777628.

200. Redondo-Castro, E. Chronic ibuprofen administration reduces neuropathic pain but does not exert neuroprotection after spinal cord injury in adult rats / E. Redondo-Castro, X. Navarro // *Experimental Neurology*. – 2014. – Vol. 252. – P. 95–103.

201. Regeneration of Propriospinal Axons in Rat Transected Spinal Cord Injury through a Growth-Promoting Pathway Constructed by Schwann Cells Overexpressing GDNF / X. Du, S. Zhang, A. Khabbaz [et al.] // *Cells*. – 2024. – Vol. 13, № 13. – P. 1160.

202. Repair effect of neurotrophic factor III (NT-3) on rats with spinal injury model and its mechanism / D. Zou, H. Wang, S. Hao, F. Chen // *Cellular and Molecular Biology*. – 2024. – Vol. 70, № 1. – P. 56–61.

203. Repair of the Injured Spinal Cord by Schwann Cell Transplantation / H. Fu, D. Hu, J. Chen [et al.] // *Frontiers in Neuroscience*. – 2022. – Vol. 16. – P. 800513.

204. Required growth facilitators propel axon regeneration across complete spinal cord injury / M. A. Anderson, T. M. O'Shea, J. E. Burda [et al.] // *Nature*. – 2018. – Vol. 561. – P. 396–400.

205. Restoration of spinal cord injury : From endogenous repairing process to cellular therapy / Y. Wu, Z. Tang, J. Zhang [et al.] // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2022. – Vol. 16. – P. 1077441.

206. Results of a phase II placebo-controlled randomized trial of minocycline in acute spinal cord injury / S. Casha, D. Zygun, M. D. McGowan [et al.] // *Brain*. – 2012. – Vol. 135. – P. 1224–1236.

207. Review of the UBC Porcine Model of Traumatic Spinal Cord Injury / K.-T. Kim, F. Streijger, N. Manouchehri [et al.] // *Journal of Korean Neurosurgical Society*. – 2018. – Vol. 61. – P. 539–547.

208. Ridlen, R. Animal models of compression spinal cord injury / R. Ridlen, K. McGrath, C. A. Gorrie // *Journal of Neuroscience Research*. – 2022. – Vol. 100, № 12. – P. 2201–2212.

209. Role of vascular endothelial growth factor as a critical neurotrophic factor for the survival and physiology of motoneurons / P. M. Calvo, R. G. Hernández, R. R. de la Cruz, A. M. Pastor // *Neural Regeneration Research*. – 2023. – Vol. 18, № 8. – P. 1691–1696.

210. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine : an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia / D. Y. Logunov, I. V. Dolzhikova, D. V. Shcheblyakov [et al.] // *Lancet*. – 2021. – Vol. 397, № 10275. – P. 671–681.

211. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations : two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia / D. Y. Logunov, I. V. Dolzhikova, O. V. Zubkova [et al.] // *Lancet*. – 2020. – Vol. 396, № 10255. – P. 887–897.

212. Safety and immunogenicity of rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine against SARS-CoV-2 in healthy adolescents : an open-label, non-randomized, multicenter, phase 1/2, dose-escalation study / A. I. Tukhvatulin, I. V. Dolzhikova, A. S. Dzharullaeva [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1228461.

213. Safety of autologous human schwann cell transplantation in subacute thoracic spinal cord injury / K. D. Anderson, J. D. Guest, W. D. Dietrich [et al.] // *Journal of Neurotrauma*. – 2017. – Vol. 34. – P. 2950–2963.

214. SCISSOR-Spinal Cord Injury Study on Small molecule-derived Rho

inhibition : a clinical study protocol / M. A. Kopp, T. Liebscher, R. Watzlawick [et al.] // *BMJ Open*. – 2016. – Vol. 6, № 7. – P. e010651.

215. Scott, C. T. Wrongful termination : lessons from the Geron clinical trial / C. T. Scott, D. Magnus // *Stem Cells Translational Medicine*. – 2014. – Vol. 3, № 12. – P. 1398–1401.

216. Shroff, G. Human embryonic stem cell therapy in chronic spinal cord injury : a retrospective study / G. Shroff // *Clinical and Translational Science*. – 2016. – Vol. 9, № 3. – P. 168–175.

217. Shultz, R. B. Minocycline targets multiple secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury / R. B. Shultz, Y. Zhong // *Neural Regeneration Research*. – 2017. – Vol. 12, № 5. – P. 702–713.

218. Silva-Hucha, S. Neuroprotective effect of vascular endothelial growth factor on motoneurons of the oculomotor system / S. Silva-Hucha, A. M. Pastor, S. Morcuende // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – P. 814.

219. Spatiotemporally limited BDNF and GDNF overexpression rescues motoneurons destined to die and induces elongative axon growth / G. Pajenda, D. Hercher, G. Márton [et al.] // *Experimental Neurology*. – 2014. – Vol. 261. – P. 367–376.

220. Spinal cord injury // World Health Organization : website. – URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/spinal-cord-injury> (accessed: 21.05.2026).

221. Spinal Cord Injury : Pathophysiology, Multimolecular Interactions, and Underlying Recovery Mechanisms / A. Anjum, M. D. Yazid, M. F. Daud [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21, № 20. – P. 7533.

222. Spinal cord injury : time to move? / S. Rossignol, M. Schwab, M. Schwartz, M. G. Fehlings // *Journal of Neuroscience*. – 2007. – Vol. 27, № 44. – P. 11782–11792.

223. Spinal Cord Molecular and Cellular Changes Induced by Adenoviral Vector- and Cell-Mediated Triple Gene Therapy after Severe Contusion / A. A. Izmailov, T. V. Povysheva, F. V. Bashirov [et al.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 813.

224. STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury / J. E. Herrmann, T. Imura, B. Song [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2008.

– Vol. 28, № 28. – P. 7231–7243.

225. Stem Cell Therapy for Spinal Cord Injury / L. Huang, C. Fu, F. Xiong [et al.] // Cell Transplantation. – 2021. – Vol. 30. – P. 963689721989266.

226. Stepankova, K. Planet of the AAVs : The Spinal Cord Injury Episode / K. Stepankova, P. Jendelova, L. Machova Urdzikova // Biomedicines. – 2021. – Vol. 9, № 6. – P. 613.

227. Sterner, R. C. Early decompression and short transport time after traumatic spinal cord injury are associated with higher American Spinal Injury Association Impairment Scale conversion / R. C. Sterner, N. P. Brooks // Spine. – 2022. – Vol. 47. – P. 59–66.

228. Sterner, R. C. Immune response following traumatic spinal cord injury : Pathophysiology and therapies / R. C. Sterner, R. M. Sterner // Frontiers in Immunology. – 2023. – Vol. 13. – P. 1084101.

229. Stevens, M. Modulation of Receptor Tyrosine Kinase Activity through Alternative Splicing of Ligands and Receptors in the VEGF-A/VEGFR Axis / M. Stevens, S. Oltean // Cells. – 2019. – Vol. 8. – P. 288.

230. Structural insights into human angiogenin variants implicated in Parkinson's disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis / W. J. Bradshaw, S. Rehman, T. T. Pham [et al.] // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – P. 41996.

231. Survival and Functional Outcomes in Boys with Cerebral Adrenoleukodystrophy with and without Hematopoietic Stem Cell Transplantation / G. V. Raymond, P. Aubourg, A. Paker [et al.] // Biology of Blood and Marrow Transplantation. – 2019. – Vol. 25, № 3. – P. 538–548.

232. Sustained delivery of neurotrophic factors to treat spinal cord injury / A. Muheremu, L. Shu, J. Liang [et al.] // Transl. Neurosci. – 2021. – Vol. 12, № 1. – P. 494–511. дб

233. Systemic Administration of Allogeneic Cord Blood Mononuclear Cells in Adults with Severe Acute Contusion Spinal Cord Injury : Phase 1/2a Pilot Clinical Study – Safety and Primary Efficacy Evaluation / V. A. Smirnov, S. M. Radaev, Y. V. Morozova [et al.] // World Neurosurgery. – 2022. – Vol. 161. – P. e319–e338.

234. Sytnyk, V. Neural Cell Adhesion Molecules of the Immunoglobulin Superfamily Regulate Synapse Formation, Maintenance, and Function / V. Sytnyk, I. Leshchyns'Ka, M. Schachner // *Trends in Neurosciences*. – 2017. – Vol. 40. – P. 295–308.

235. Szymanska, H. The selected functional activities of angiogenin / H. Szymanska // *Polish Annals of Medicine*. – 2025. – Vol. 32, № 2. – P. 233–239.

236. Takahashi, K. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors / K. Takahashi, S. Yamanaka // *Cell*. – 2006. – Vol. 126, № 4. – P. 663–676.

237. Tandem Delivery of Multiple Therapeutic Genes Using Umbilical Cord Blood Cells Improves Symptomatic Outcomes in ALS / R. R. Islamov, A. A. Rizvanov, V. Y. Fedotova [et al.] // *Molecular Neurobiology*. – 2017. – Vol. 54, № 6. – P. 4756–4763.

238. Telias, M. Neural differentiation protocols : how to choose the correct approach / M. Telias // *Neural Regeneration Research*. – 2023. – Vol. 18, № 6. – P. 1273–1274.

239. The adeno-associated virus rh10 vector is an effective gene transfer system for chronic spinal cord injury / Y. Hoshino, K. Nishide, N. Nagoshi [et al.] // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 9844.

240. The collagen scaffold with collagen binding BDNF enhances functional recovery by facilitating peripheral nerve infiltrating and ingrowth in canine complete spinal cord transection / S. Han, B. Wang, W. Jin [et al.] // *Spinal Cord*. – 2014. – Vol. 52, № 12. – P. 867–873.

241. The Effects of adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation during the acute and subacute phases following spinal cord injury / Y. Aras, P. A. Sabanci, S. Kabatas [et al.] // *Turkish Neurosurgery*. – 2016. – Vol. 26, № 1. – P. 127–139.

242. The Hidden Side of NCAM Family : NCAM2, a Key Cytoskeleton Organization Molecule Regulating Multiple Neural Functions / A. Parcerisas, A. Ortega-Gascó, L. Pujadas, E. Soriano // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, № 18. – P. 10021.

243. The impact of blood pressure management after spinal cord injury : a systematic review of the literature / Y. S. Saadeh, B. W. Smith, J. R. Joseph [et al.] //

Neurosurgical Focus. – 2017. – Vol. 43, № 5. – P. E20.

244. The impact of urgent (<8 hours) decompression on neurologic recovery in traumatic spinal cord injury : a meta-analysis / Y. Ma, Y. Zhu, B. Zhang [et al.] // World Neurosurgery. – 2020. – Vol. 140. – P. e185–e194.

245. The neuroprotective role of riluzole in spinal cord injury : a systematic review and meta-analysis / H. Zarei, S. Khatami, M. Faghihi [et al.] // European Journal of Trauma and Emergency Surgery. – 2025. – Vol. 51, № 1. – P. 246.

246. The Role of Microglia in Neuroinflammation of the Spinal Cord after Peripheral Nerve Injury / T. S. Pottorf, T. M. Rotterman, W. M. McCallum [et al.] // Cells. – 2022. – Vol. 11, № 13. – P. 2083.

247. The roles and applications of neural stem cells in spinal cord injury repair / W. Guo, X. Zhang, J. Zhai, J. Xue // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2022. – Vol. 10. – P. 966866.

248. The safety and efficacy of steroid treatment for acute spinal cord injury : A Systematic Review and meta-analysis / I. Sultan, N. Lamba, A. Liew [et al.] // Heliyon. – 2020. – Vol. 6, № 2. – P. e03414.

249. The secondary injury cascade after spinal cord injury : an analysis of local cytokine/chemokine regulation / D. J. Hellenbrand, C. M. Quinn, Z. J. Piper [et al.] // Neural Regeneration Research. – 2024. – Vol. 19, № 6. – P. 1308–1317.

250. Tian, T. Recent progress and challenges in the treatment of spinal cord injury / T. Tian, S. Zhang, M. Yang // Protein & Cell. – 2023. – Vol. 14, № 9. – P. 635–652.

251. Timing of decompression in patients with acute spinal cord injury : a systematic review / J. R. Wilson, L. A. Tetreault, B. K. Kwon [et al.] // Global Spine Journal. – 2017. – Vol. 7, № 3, Suppl. – P. 95S–115S.

252. Tosolini, A. P. Viral-mediated Gene Therapy for Spinal Cord Injury (SCI) from a Translational Neuroanatomical Perspective / A. P. Tosolini, R. Morris // Neural Regeneration Research. – 2016. – Vol. 11, № 5. – P. 743–744.

253. Tran, A. P. New insights into glial scar formation after spinal cord injury / A. P. Tran, P. M. Warren, J. Silver // Cell and Tissue Research. – 2022. – Vol. 387, № 3. – P. 319–336.

254. Transplantation of neural stem cells clonally derived from embryonic stem cells promotes recovery after murine spinal cord injury / R. P. Salewski, R. A. Mitchell, C. Shen, M. G. Fehlings // *Stem Cells and Development*. – 2015. – Vol. 24, № 1. – P. 36–50.

255. Transplants of human mesenchymal stem cells improve functional recovery after spinal cord injury in the rat / D. Cizkova, J. Rosocha, I. Vanicky [et al.] // *Cellular and Molecular Neurobiology*. – 2006. – Vol. 26, № 7–8. – P. 1167–1180.

256. Traumatic spine injuries in the geriatric population / P. Jabbour, M. Fehlings, A. R. Vaccaro, J. S. Harrop // *Neurosurgical Focus*. – 2008. – Vol. 25. – P. E16.

257. Treatment of spinal cord injury with mesenchymal stem cells / L. L. Liao, Q. H. Looi, W. C. Chia [et al.] // *Cell Biosci*. – 2020. – Vol. 10. – P. 112.

258. 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.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 111.

259. Ultraearly (<12 hours) surgery correlates with higher rate of American Spinal Injury Association Impairment Scale conversion after cervical spinal cord injury / J. F. Burke, J. K. Yue, L. B. Ngwenya [et al.] // *Neurosurgery*. – 2019. – Vol. 85. – P. 199–203.

260. Umbilical cord blood derived cell expansion : a potential neuroprotective therapy / T. R. Penny, G. Jenkin, S. L. Miller, C. A. McDonald // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2024. – Vol. 15, № 1. – P. 234.

261. Variables affecting outcomes after allogeneic hematopoietic stem cell transplant for cerebral adrenoleukodystrophy / R. Chiesa, J. J. Boelens, C. N. Duncan [et al.] // *Blood Advances*. – 2022. – Vol. 6, № 5. – P. 1512–1524.

262. Vascular endothelial growth factor increases the function of calcium-impermeable AMPA receptor GluA2 subunit in astrocytes via activation of protein kinase C signaling pathway / Z. W. Kou, J. L. Mo, K. W. Wu [et al.] // *Glia*. – 2019. – Vol. 67. – P. 1344–1358.

263. Viral and non-viral vectors in gene therapy : current state and clinical perspectives / G. Geng, Y. Xu, Z. Hu [et al.] // *EBioMedicine*. – 2025. – Vol. 118. – P. 105834.

264. Viral Vector Systems for Gene Therapy : A Comprehensive Literature Review of Progress and Biosafety Challenges / S. Ghosh, A. M. Brown, C. Jenkins, K. Campbell // *Applied Biosafety*. – 2020. – Vol. 25. – P. 7–18.

265. Wang, D. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery / D. Wang, P. W. L. Tai, G. Gao // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2019. – Vol. 18, № 5. – P. 358–378.

266. Wang, X. Long-term Survival, Axonal Growth-Promotion, and Myelination of Schwann Cells Grafted into Contused Spinal Cord in Adult Rats / X. Wang, X. M. Xu // *Experimental Neurology*. – 2014. – Vol. 261. – P. 308–319.

267. Witiw, C. D. Acute Spinal Cord Injury / C. D. Witiw, M. G. Fehlings // *Journal of Spinal Disorders and Techniques*. – 2015. – Vol. 28, № 6. – P. 202–210.

268. Zeng, C. W. Stem Cell-Based Approaches for Spinal Cord Injury : The Promise of iPSCs / C. W. Zeng // *Biology*. – 2025. – Vol. 14, № 3. – P. 314.

269. Zhang, P. Challenges and new technologies in adoptive cell therapy / P. Zhang, G. Zhang, X. Wan // *Journal of Hematology & Oncology*. – 2023. – Vol. 16, № 1. – P. 97.

270. Zheng, P. P. Approved CAR T cell therapies : ice bucket challenges on glaring safety risks and long-term impacts / P. P. Zheng, J. M. Kros, J. Li // *Drug Discovery Today*. – 2018. – Vol. 23, № 6. – P. 1175–1182.

271. Zuo, X. From gene to therapy: a review of deciphering the role of ABCD1 in combating X-Linked adrenoleukodystrophy / X. Zuo, Z. Chen // *Lipids in Health and Disease*. – 2024. – Vol. 23, № 1. – P. 369.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Рисунок 1 – Дизайн эксперимента.....	59
Рисунок 2 – Приготовление образцов спинного мозга для гистологического исследования через 8 недель после моделирования нейротравмы.....	63
Таблица 1 – Первичные и вторичные антитела, использованные для иммунофлуоресцентного исследования.....	67
Таблица 2 – Нуклеотидные последовательности праймеров и продуктов ПЦР в реальном времени.....	74
Таблица 3 – Экспериментальные группы животных.....	76
Рисунок 3 – Сохранность серого вещества спинного мозга мини-свиней из интактной и контрольной групп через 8 недель после моделирования нейротравмы.....	79
Рисунок 4 – Сохранность белого вещества спинного мозга в области латерального КСТ мини-свиней из интактной и контрольной групп через 8 недель после моделирования нейротравмы.....	80
Рисунок 5 – Экспрессия проапоптозного белка (Caspase3) в задних рогах спинного мозга мини-свиней из контрольной группы через 8 недель после моделирования нейротравмы.....	82
Рисунок 6 – Экспрессия белка теплового шока 27 кДа (Hsp27) в задних рогах спинного мозга мини-свиней из интактной и контрольной групп через 8 недель после моделирования нейротравмы.....	83
Рисунок 7 – Экспрессия белка синаптических везикул (синаптофизина) в задних рогах спинного мозга мини-свиней из интактной и контрольной групп через 8 недель после моделирования нейротравмы.....	85
Рисунок 8 – Экспрессия белка постсинаптической плотности 95 кДа (PSD95) в задних рогах спинного мозга мини-свиней из интактной и контрольной групп через 8 недель после моделирования нейротравмы.....	86
Рисунок 9 – Экспрессия глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) в задних	

рогах спинного мозга мини-свиней из интактной и контрольной групп через 8 недель после моделирования нейротравмы.....	88
Рисунок 10 – Экспрессия ионизированной кальций-связывающей адаптерной молекулы 1 (Iba1) в задних рогах спинного мозга мини-свиней из интактной и контрольной групп через 8 недель после моделирования нейротравмы.....	89
Рисунок 11 – Экспрессия Olig2 в области латерального КСТ боковых канатиков спинного мозга мини-свиней из интактной и контрольной групп через 8 недель после моделирования нейротравмы.....	90
Рисунок 12 – Экспрессия β III-тубулина в боковых канатиках в области латерального КСТ спинного мозга мини-свиней из интактной и контрольной групп через 8 недель после моделирования нейротравмы.....	92
Таблица 4 – Исследование нативной периферической крови и генно-клеточного препарата на основе лейкоцитов, трансдуцированных аденовирусами, несущими репортерный ген зеленого флуоресцентного белка (Ad5/F35-GFP) до внутривенной аутоинфузии мини-свинье.....	93
Рисунок 13 – Исследование экспрессии репортерного гена зеленого флуоресцентного белка в лейкоцитах мини-свиньи <i>in vitro</i> через 72 часа после трансдукции аденовирусным вектором Ad5/F35-GFP (MOI = 10).....	95
Таблица 5 – Исследование нативной периферической крови и генно-клеточного препарата на основе аутологичных лейкоцитов, трансдуцированных аденовирусами Ad5/35-VEGF165, Ad5/35-GDNF и Ad5/35-NCAM1 в равном соотношении до внутривенной инфузии мини-свинье.....	96
Рисунок 14 – Относительная экспрессия мРНК генов <i>vegfl65</i> , <i>gdnf</i> и <i>ncam1</i> в лейкоцитах мини-свиньи через 72 часа после трансдукции комбинацией аденовирусных векторов Ad5/35-VEGF165, Ad5/35-GDNF и Ad5/35-NCAM1 в равном соотношении.....	97
Рисунок 15 – Флуоресцентная микроскопия спинного мозга (А) и селезенки (Б) мини-свиньи через 7 дней после моделирования нейротравмы и последующей аутоинфузии лейкоцитов, обогащенных геном зеленого флуоресцентного белка.....	98

Рисунок 16 – Сохранность серого вещества спинного мозга мини-свиней через 8 недель после моделирования нейротравмы.....	101
Рисунок 17 – Сохранность белого вещества спинного мозга в области латерального КСТ мини-свиней через 8 недель после моделирования нейротравмы.....	102
Рисунок 18 – Экспрессия проапоптозного белка (Caspase3) в задних рогах спинного мозга мини-свиней через 8 недель после моделирования нейротравмы.....	103
Рисунок 19 – Экспрессия белка теплового шока 27 кДа (Hsp27) в задних рогах спинного мозга мини-свиней через 8 недель после моделирования нейротравмы.....	104
Рисунок 20 – Экспрессия белка синаптических везикул (синаптофизина) в задних рогах спинного мозга мини-свиней через 8 недель после моделирования нейротравмы.....	105
Рисунок 21 – Экспрессия белка постсинаптической плотности 95 кДа (PSD95) в задних рогах спинного мозга мини-свиней через 8 недель после моделирования нейротравмы.....	106
Рисунок 22 – Экспрессия глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) в задних рогах спинного мозга мини-свиней через 8 недель после моделирования нейротравмы.....	108
Рисунок 23 – Экспрессия ионизированной кальций-связывающей адаптерной молекулы 1 (Iba1) в задних рогах спинного мозга мини-свиней через 8 недель после моделирования нейротравмы.....	109
Рисунок 24 – Экспрессия фактора транскрипции олигодендроцитов (Olig2) в боковых канатиках в области латерального КСТ спинного мозга мини-свиней через 8 недель после моделирования нейротравмы.....	110
Рисунок 25 – Экспрессия β III-тубулина в боковых канатиках в области латерального КСТ спинного мозга мини-свиней через 8 недель после моделирования нейротравмы.....	111
Рисунок 26 – Паракринный и эндокринный механизмы действия рекомбинантных	

нейротрофических факторов, продуцируемых генетически модифицированными аутологичными лейкоцитами.....	125
---	-----