

На правах рукописи



МУХАМЕДШИНА Яна Олеговна

**КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ НЕЙРОРЕГЕНЕРАЦИИ
СПИННОГО МОЗГА ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИ
МОДИФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК МЕЗЕНХИМНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

доктора медицинских наук

Казань – 2021

Работа выполнена в НИЛ OpenLab Генные и клеточные технологии Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет

Научный консультант:

доктор биологических наук, профессор
Ризванов Альберт Анатольевич

Официальные оппоненты:

Ишунина Татьяна Александровна
доктор медицинских наук, профессор кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии ФГБОУ ВО "Курский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Коновалов Николай Александрович

доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий спинальным нейрохирургическим отделением ФГАУ "НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Баклаушев Владимир Павлович

доктор медицинских наук, заместитель генерального директора по научной работе ФГБУ "Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России" Федерального медико-биологического агентства России

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «22» декабря 2021 г. в 13:00 часов на заседании диссертационного совета КФУ.03.06 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420015, Республика Татарстан, г. Казань, ул. К. Маркса, д. 76, ауд. 208 (актовый зал).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке им. Н.И. Лобачевского при Казанском (Приволжском) федеральном университете.

Автореферат разослан «__» ____ 2021 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета КФУ.03.06,
д.б.н., профессор

Аникина Т.А.

Актуальность исследования

Травма спинного мозга (ТСМ) приводит к стойким нарушениям чувствительной и двигательной функции нервной системы и как следствие этого к глубокой инвалидизации пострадавших. Несмотря на определенные достижения в раскрытии патогенеза нейротравмы, до сих пор существует насущная потребность в новых подходах к лечению таких пациентов, основанных на понимании молекулярных и клеточных механизмов, протекающих при ТСМ. Возможность стимулирования нейрорегенерации спинного мозга связывают с применением биологически активных молекул, особенно нейротрофических факторов (НТФ), которые поддерживают жизнеспособность нейронов и глиальных клеток, а также стимулируют нейрогенез и рост аксонов (Lu & Tuszynski, 2008; Hollis & Tuszynski, 2011). При локальном введении действие НТФ не является стойким вследствие быстрого расщепления протеазами. Системная доставка в свою очередь приводит к неприемлемым побочным реакциям и обладает низкой эффективностью (Apfel et al., 2002). В этой связи наиболее актуальным является клеточно-опосредованный вариант доставки НТФ в область повреждения.

Клеточная терапия рассматривается в качестве одного из перспективных методов поддержания регенерации нервных волокон, уменьшения выраженности или преодоления последствий нейротравм (Assinck et al., 2017; Gazdic et al., 2018; Gao et al., 2020). Тем не менее, среди исследователей до сих пор нет единства по выбору типа клеток, при трансплантации которых будет происходить наиболее эффективное стимулирование нейрорегенерации спинного мозга. Эффекты экспериментальной трансплантации мононуклеарных клеток крови пуповины (МККП) человека, обладающих противовоспалительной активностью и нейропротективным воздействием, давно исследуют в рамках проблемы ТСМ (Hernandez et al., 2011; Park et al., 2011; Sun, Ma, 2012; Ryabov et al., 2020). Однако, трансплантация МККП не приводит к значительному улучшению структурных показателей и достаточному восстановлению функций после ТСМ, что отражается в прекращении части клинических исследований с использованием данных клеток (Hu et al., 2021). В этой связи особое внимание и большие надежды возлагают на генетически модифицированные МККП, сверхэкспрессирующие гены, кодирующие НТФ. Наиболее перспективными в этом отношении представляются гены сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и глиального нейротрофического фактора (GDNF). Помимо ангиогенных свойств VEGF обладает нейротрофическими эффектами, заключающимися в стимулировании нейрогенеза и роста аксонов (Facchiano et al., 2002; Mackenzie & MacRuhrberg, 2012). В свою очередь GDNF является мощным стимулятором выживания нейронов, роста нервных волокон и миелинизации (Cheng et al., 2002; Zhang L. et al., 2009). Совместное применение указанных нейротрофических и ангиогенных факторов

при ТСМ ранее не исследовано, однако представляет не только фундаментальный, но и практический интерес.

Одним из важных звеньев посттравматических реакций в центральной нервной системе (ЦНС) является активация клеток микроглии, которые первыми реагируют на ТСМ. Активированная микроглия способна синтезировать не только потенциально нейротоксичные молекулы, такие как оксид азота и провоспалительные цитокины, но и также нейропротективные факторы – нейротрофины, транспортеры глутамата и антиоксиданты (Hellwig et al., 2013; Chen & Trapp, 2016; Stratoulias et al., 2019). Предполагается, что усиление акцепторных и фагоцитарных свойств микроглии приводит к раннему разрешению начальных посттравматических реакций, что в последующем может улучшить сохранность нервной ткани и восстановление ее функции (Redondo-Castro et al., 2013). С целью подтверждения данной гипотезы и оценки перспективности применения микроглии для клеточной терапии при ТСМ особую актуальность представляет исследование эффективности трансплантации генетически модифицированной микроглии, проявляющей усиленную или ослабленную фагоцитарную активность.

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) рассматривают как наиболее перспективный материал для стимулирования нейрорегенерации, что связано с их высокой биобезопасностью, иммуномодулирующими свойствами, способностью синтезировать нейротрофические и проангиогенные факторы (Khan S. et al., 2018; Cofano et al., 2019). Терапевтический эффект данных клеток обусловлен паракринным механизмом их действия (Gnecchi et al., 2016; Maacha et al., 2020), поэтому отдельное внимание уделяется такому важному аспекту, как сохранение жизнеспособности МСК и оптимальной доставке секретируемых ими терапевтических молекул. Тем не менее, до сих пор существует необходимость раскрытия клеточных и молекулярных механизмов, посредством которых МСК улучшают исход ТСМ (Cofano et al., 2019; Liau et al., 2020).

Несмотря на пристальный интерес к регенеративной медицине и проведённые исследования по применению генно-клеточной и клеточной терапии при ТСМ, многие вопросы как поведения самих трансплантируемых клеток, так и характера их влияния на микроокружение требуют углубленного исследования. Представляется важным оценить эффективность терапии не только с применением общепринятых критериев, таких как степень восстановления двигательной функции и сохранность нервной ткани, но и определить изменения реактивности глиальных клеток, а также уровень экспрессии мРНК генов, кодирующих синтез специфических белков нейроглии, НТФ и других регуляторных молекул в области ТСМ.

Следует отметить, что доклинические исследования эффективности клеточной терапии чаще всего проводят на мелких лабораторных животных (крысы, мыши). Такие исследования достаточно часто показывают позитивные и вдохновляющие результаты по восстановлению структуры и функций травмированной ткани. Тем не менее, далеко не всегда возможно успешно экстраполировать накопленный опыт в клинику, что связано с (1) очевидными различиями организмов человека и мелких лабораторных животных как на уровне анатомо-физиологических характеристик, механизма развития (патогенеза) заболевания, так и фенотипических проявлений, (2) ошибок дизайна экспериментального исследования и (3) невозможности проведения аутологичных трансплантаций (Vandamme, 2014). В этой связи выполнение исследований на крупных животных (свиньи), имеющих много анатомических, физиологических и других функциональных сходств с человеком, позволит объективно подойти к клиническим исследованиям, минимизируя экономические потери в случае отсутствия эффективности клеточной терапии на доклиническом этапе.

Цель исследования – на основании структурных и функциональных изменений оценить эффективность мононуклеарных клеток крови пуповины, микроглии и мезенхимных стволовых клеток, трансдуцированных адено-вирусными или лентивирусными векторами Ad5-VEGF, Ad5-GDNF и LV-EGFP, для преодоления последствий контузионной травмы спинного мозга крысы и свиньи в условиях их однократной трансплантации в область повреждения.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить сроки выживания и миграционный потенциал трансплантированных мононуклеарных клеток крови пуповины, микроглии и мезенхимных стволовых клеток при моделировании травмы спинного мозга крысы и свиньи.
2. Оценить эффективность посттравматической регенерации спинного мозга крысы на фоне проведения интраспинальной инъекции мононуклеарных клеток крови пуповины человека, трансдуцированных адено-вирусными векторами Ad5-VEGF и Ad5-GDNF, на основании структурных и функциональных изменений.
3. Установить изменения фагоцитарной активности клеток микроглии крысы на фоне трансдукции адено-вирусным вектором Ad5-GDNF.
4. Определить влияние интраспинальной аллогенной трансплантации клеток микроглии, трансдуцированных адено-вирусным вектором Ad5-GDNF, на восстановление функции и посттравматические процессы спинного мозга крысы.

5. Установить влияние трансдукции лентивирусным вектором LV-EGFP на фенотип, жизнеспособность, дифференцировочный потенциал и экспрессию цитокинов мезенхимными стволовыми клетками жировой ткани свиньи.

6. Провести сравнительную оценку эффективности посттравматической регенерации спинного мозга крысы при аллогенной аппликации на область повреждения мезенхимных стволовых клеток, полученных из жировой ткани, костного мозга или пульпы зуба.

7. Определить влияние аутологичной аппликации на область повреждения мезенхимных стволовых клеток жировой ткани на структуру и функции травмированного спинного мозга свиньи.

8. Выявить изменения цитокинового профиля в области повреждения и сыворотке крови при травме спинного мозга крысы и аллогенной аппликации мезенхимных стволовых клеток жировой ткани.

Научная новизна

Впервые показано стимулирующее влияние на процессы нейрорегенерации спинного мозга трансплантации в область повреждения МКП человека, трансдущированных адено-вирусными векторами Ad5-VEGF и Ad5-GDNF, заключающееся в улучшении восстановления двигательной функции и сохранности нервной ткани, увеличения количества миелиновых волокон в кортикоспинальном тракте (CST), усилении роста аксонов и экспрессии маркерных белков Шванновских клеток (ШК).

Несомненной новизной обладают данные, свидетельствующие о возможности ауторегуляции функций микроглии путём их генетической модификации адено-вирусным вектором Ad5-GDNF. Получены новые данные, свидетельствующие о том, что клетки микроглии интраспинально трансплантированные в острый период ТСМ крысы сохраняют свою жизнеспособность до 30 суток. В ходе экспериментальных исследований впервые установлено, что увеличение количества активно фагоцитирующей микроглии в области ТСМ в острый период может способствовать улучшению сохранности нервной ткани без значимого влияния на восстановление двигательной функции.

Принципиально новыми являются данные о тропности МСК к серому веществу и возможности их миграции через задние корешки спинного мозга с сохранением жизнеспособности до 60 суток при аппликации на область ТСМ. Впервые проведена сравнительная оценка эффективности посттравматической регенерации спинного мозга крыс при аллогенной аппликации на область повреждения МСК, полученных из жировой ткани (МСК-ЖТ), костного мозга (МСК-КМ) или пульпы зуба (МСК-ПЗ). Новыми следует считать данные о влиянии генетической модификации МСК свиней при помощи лентивирусного вектора LV-

EGFP на фенотип, жизнеспособность, дифференцировочный потенциал и экспрессию цитокинов данными клетками. Приоритетными являются данные о возможности частичного экстраполирования полученных на крысах результатов при моделировании аналогичной ТСМ у свиней, проявляющейся в виде восстановления соматосенсорных путей спинного мозга, улучшения сохранности нервной ткани и модуляции активности астроцитов в области вхождения задних корешков (DREZ). Обладают новизной данные, показывающие значительные изменения в концентрации 13 цитокинов/хемокинов с различной воспалительной и иммунологической активностью в сыворотке крови и ткани спинного мозга в острый и ранний периоды ТСМ крысы.

Положения, выносимые на защиту:

1. Трансплантация в область контузионной травмы спинного мозга крысы мононуклеарных клеток крови пуповины человека, трансдуцированных аденоизирусными векторами Ad5-VEGF и Ad5-GDNF, более эффективно стимулирует нейрорегенерацию, чем аналогичная инъекция мононуклеарных клеток крови пуповины человека, трансдуцированных аденоизирусным вектором, кодирующим репортерный ген *egfp*.
2. Аллогенная аппликация мезенхимных стволовых клеток жировой ткани в подострый период контузионной травмы спинного мозга крысы более эффективно стимулирует нейрорегенерацию по сравнению с аналогичным применением мезенхимных стволовых клеток, полученных из костного мозга или пульпы зуба. Экстраполяция разработанного способа терапии аутологичными мезенхимными стволовыми клетками жировой ткани на модели контузионной травмы спинного мозга свиньи демонстрирует частичное повторение результатов, наблюдавшихся на крысах, в отношении стимулирования нейрорегенерации.

Теоретическая и практическая значимость работы

Предложено технологическое решение, подтвержденное теоретическими положениями и экспериментальными данными, модификации МККП и клеток микроглии генами нейротрофических факторов с целью усиления их терапевтического потенциала и/или ауторегуляции функций при ТСМ. Решена крупная научная проблема выбора источника МСК для терапии ТСМ. Изложено фундаментальное и экспериментальное обоснование выбора источника МСК и вариабельности донорского клеточного материала, обуславливающие дальнейшую эффективность клеточной терапии. Предложено научно обоснованное технологическое решение эффективного и безопасного способа аппликационного применения МСК при ТСМ. Впервые проведены сравнительные исследования на моделях как мелких, так и крупных лабораторных животных, позволивших экспериментально обосновать предложенный способ применения биомедицинских клеточных технологий.

Связь работы с базовыми научными программами

Работа поддерживалась грантами: РФФИ №16-34-60101-мол_а_дк «Исследование молекулярных и клеточных механизмов посттравматических процессов при повреждении спинного мозга крыс и свиней, в том числе на фоне генно-клеточной терапии» (2016–2018 гг.), Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых - кандидатов наук «Молекулярные и клеточные механизмы регенерации при травматических повреждениях спинного мозга на фоне генно-клеточной терапии» (2015–2016), РФФИ №14-04-31246-мол_а «Фенотипическая характеристика и поведение эндогенных шванновских клеток в области травмы спинного мозга в условиях прямой и клеточно-опосредованной генной терапии» (2014–2015 гг.).

Апробация работы

Основные положения и результаты работы доложены на: 18ом международном симпозиуме студентов-биологов Европы (Александруполис, 2015); V молодежной конференции по молекулярной и клеточной биологии (Санкт-Петербург, 2016); Международной конференции «Трансляционная медицина 2016» (Казань, 2016); III Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2017); VI международной научно-практической конференции «Новые концепции механизмов воспаления, аутоиммунного ответа и развития опухоли» (Казань, 2017); 26ом ежегодном конгрессе Европейского общества генных и клеточных технологий (Швейцария, 2018).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 24 печатные работы, из них 15 статей в изданиях, рецензируемых в международных базах данных Scopus/Web of Science, получен 1 патент Российской Федерации на изобретение.

Место выполнения работы. Экспериментальные данные получены автором за время работы в НИЛ OpenLab «Генные и клеточные технологии» Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета (2014-2021 годы) под руководством д.б.н., профессора Ризванова А.А.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 365 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы. Работа иллюстрирована 14 таблицами и 66 рисунками, которые включают микрофотографии световой, конфокальной и электронной микроскопии, схемы. Библиографический список содержит 704 источника, из них 689 иностранных.

Содержание работы

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение и генетическая модификация клеток. Трансдуцированные МККП были предоставлены к.б.н. Гараниной Е.Е. (кафедра генетики, Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета). Первичные клетки микроглии получали из коры головного мозга новорожденных крысят (возраст 3-5 суток) породы Wistar по оптимизированному протоколу (Lee, Tansey, 2013). Клетки микроглии культивировали на среде игла в модификации Dulbecco (DMEM) со смесью питательных веществ F-12, обогащенной 10% эмбриональной телячьей сывороткой (FBS), 2 mM L-глутамином, пенициллином-стрептомицином и гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (G-CSF, 5 нг/мл). Микроглия была трансдуцирована рекомбинантными аденоизирирующими вирусами Ad5-EGFP или Ad5-GDNF сразу после выделения клеток с множественностью инфицирования (MOI) 40.

Получение МСК от крыс породы Wistar (самках весом 200–250 г) проводили в асептических условиях операционной комнаты. МСК-ЖТ и МСК-КМ культивировали на средах α-MEM и DMEM, соответственно, с добавлением 10% FBS, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2 mM L-глютамина. МСК-ПЗ культивировали в аналогичных условиях с МСК-ЖТ, но с добавлением 100 мкМ L-аскорбат-2-фосфата. Трансдукцию полученных МСК проводили путём добавления на 0 пассаже в культуру клеток рекомбинантных лентивирусов LV-EGFP с MOI 100.

Проточная цитофлуориметрия и иммуноцитохимический анализ культур клеток. Полученные клетки отмывали от трипсина и питательной среды в растворе фосфатно-солевого буфера (PBS) с последующим инкубированием с первичными и вторичными антителами по протоколам фирм-производителей. Результаты анализировали на проточном цитофлуориметре Guava easyCyte 8HT (Merk) и конфокальном сканирующем микроскопе LSM 780 (Carl Zeiss).

Оценка фагоцитарной активности микроглии *in vitro* проводилась по модифицированному протоколу Jensen & Bainton (1973). Предварительно окрашенные нейтральным красным дрожжевые клетки (5 млн) добавляли в каждую лунку с культурой микроглии (~30 тыс. клеток) и инкубировали в течение 1 часа. После этого лунки тщательно промывали в фосфатно-солевом буфере Dulbecco (DPBS), чтобы удалить лишние дрожжевые частицы. Краситель нейтральный красный элюировали с использованием буфера для лизиса (70% этанол, 0,1% ледяная уксусная кислота). Оптическую плотность элюентов оценивали с помощью Tecan Infinite Pro 2000 (Tecan) при длине волны 540 нм.

Методика проведения МТТ-теста полученных культур клеток. Метаболическую активность клеток оценивали с помощью МТТ-анализа через 24 часа после посева 5000 клеток на лунку в 96-луночном планшете в 4-х кратной повторности. Клетки инкубировали в темноте при 37°C и 5% CO₂ в течение 1 часа. Оптическую плотность раствора формазана измеряли при длине волны 490 нм с эталоном 640 нм и использованием спектрофотометра Tecan Infinite Pro 2000.

Оценка дифференцировочного потенциала мезенхимных стволовых клеток свиньи *in vitro*. Для индукции дифференцировки в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлении МСК культивировали в специальных средах. Результаты дифференцировки фиксировали с помощью инвертированного микроскопа AxioObserver Z1 (Carl Zeiss) на основании определения минерализации, кислых мукополисахаридов и жировых включений.

Животные и экспериментальные группы. Эксперименты проведены на 220 крысах породы Wistar (самках весом 200–250 г) и 17 половозрелых вьетнамских вислобрюхих свиньях (самках весом 9–12 кг) (табл. 1). Проведение диссертационного исследования одобрено локальным этическим комитетом Казанского (Приволжского) федерального университета (протокол №2 от 5.05.2015). Крыс и свиней содержали в отдельных клетках/загонах, со стандартным суточным режимом в соответствии с зоогигиеническими и ветеринарно-санитарными требованиями.

Таблица 1. Экспериментальные группы животных с дозированной контузионной травмой спинного мозга

Группа	Характер эксперимента	Количество животных
<u>ЭКСПЕРИМЕНТЫ НА КРЫСАХ</u>		
<i>МККП</i>		
Опытная	Интраспинальная трансплантация МККП, трансдуцированных аденоизиусными векторами Ad5-VEGF и Ad5-GDNF (МККП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF)	25
Контрольная 1	Интраспинальная трансплантация МККП, трансдуцированных аденоизиусным вектором Ad5-EGFP (МККП+Ad5-EGFP)	25
<i>Микроглия</i>		
Опытная	Интраспинальная трансплантация микроглии, трансдуцированной аденоизиусным вектором Ad5-GDNF (МГ+Ad5-GDNF)	15

Контрольная 1	Интраспинальная трансплантация микроглии, трансдуцированной аденоовирусным вектором Ad5-EGFP (МГ+Ad5-EGFP)	15
<i>MCK</i>		
Опытная 1	Аппликация на область повреждения Tissucol и мезенхимных стволовых клеток жировой ткани, трансдуцированных лентивирусным вектором LV-EGFP (ФМ+МСК-ЖТ+LV-EGFP)	25
Опытная 2	Аппликация на область повреждения Tissucol и мезенхимных стволовых клеток костного мозга, трансдуцированных лентивирусным вектором LV-EGFP (ФМ+МСК-КМ+LV-EGFP)	25
Опытная 3	Аппликация на область повреждения Tissucol и мезенхимных стволовых клеток пульпы зуба, трансдуцированных лентивирусным вектором LV-EGFP (ФМ+МСК-ПЗ+LV-EGFP)	25
Контрольная 1	Аппликация на область повреждения Tissucol (ФМ)	25
<i>Общие контроли для групп с экспериментами на крысах</i>		
Контрольная 2	Без трансплантации клеток или аппликации Tissucol (КТСМ)	20
Контрольная 3	Без травмы спинного мозга и аппликации Tissucol и/или клеток (Интактный контроль)	20
<u>ЭКСПЕРИМЕНТЫ НА СВИНЬЯХ</u>		
Опытная	Аппликация на область повреждения ФМ+МСК-ЖТ+LV-EGFP	7
Контрольная 1	Аппликация на область повреждения Tissucol (ФМ)	5
Контрольная 2	Без травмы спинного мозга и наложения Tissucol и клеток (Интактный контроль)	5

Методика проведения операции на спинном мозге крыс и свиней с последующей трансплантацией клеток. Крыс оперировали под общим наркозом с изофлюраном и предварительной премедикацией золетилом (20 мг/кг). Разрез кожи производили параллельно позвоночнику, выделяли позвоночный столб и проводили ламинэктомию на уровне Th8. Дозированную контузионную травму осуществляли с помощью вертикально падающего строго на центр визуализируемого участка спинного мозга металлического стержня (вес 10 г, диаметр 2 мм) с высоты 25 мм. Сразу после нанесения повреждения крысам интраспинально трансплантировали МККП или клетки микроглии при помощи гамильтоновского шприца. В подгруппе МККП было инъецировано по 1 млн клеток в 5 мкл DPBS в 2 точки на расстоянии 1 мм ростральнее и каудальнее эпицентра травмы. В подгруппе с трансплантацией микроглии клетки были инъецированы по 1 млн в 5 мкл DPBS в область эпицентра травмы. Во 2 контрольной группе после ТСМ трансплантацию клеток не проводили. В течение 7 суток после операции всем экспериментальным животным внутримышечно вводили гентамицин (5 мг/кг) один раз в сутки.

В подгруппе МСК трансплантацию клеток проводили через 14 суток после нанесения повреждения. Для этого крыс повторно наркотизировали, делали разрез на коже, аналогичный первой операции. Животным в области ламинэктомии удаляли спайки, оголяли спинной мозг, проводили две продольные надсечки в твёрдой мозговой оболочке и на область повреждения апплицировали по 1 млн МСК (3 источника, 3 опытные группы), заключенных в 18 мкл Tissucol (фибриновый матрикс, ФМ, Baxter) (рис. 1А). Животным 1 контрольной группы в аналогичных условиях эксперимента через 14 суток после травмы на область повреждения накладывали ФМ без клеток. В течение 7 суток после операции животным внутримышечно вводили гентамицин (5 мг/кг) один раз в сутки.

Хирургические манипуляции на свиньях проводили на фоне интубационного наркоза, соответствующей предоперационной подготовки и адекватного обезболивания. Премедикацию осуществляли ксилазином (в/м, 0,6 мг/кг) и кетамином (5 мг/кг). После индукции пропофолом (2-6 мг/кг) проводили эндотрахеальную интубацию с поддержкой изофлюраном (1,3 %) в течение всего хода операции. Свиньям под наркозом на уровне Th11 спинного мозга после ламинэктомии наносили дозированную контузионную травму вертикально падающим металлическим стержнем весом 50 г с высоты 20 см с последующей компрессией тем же грузом в течение 10 минут (рис. 1Б). В течение 5 суток после операции всем экспериментальным животным внутримышечно вводили цефазолин (25 мг/кг) один раз в сутки.

Через 6 недель после нанесения травмы свиньям на область повреждения (после удаления спаек и проведения нескольких продольных надсечек в твердой мозговой оболочке:

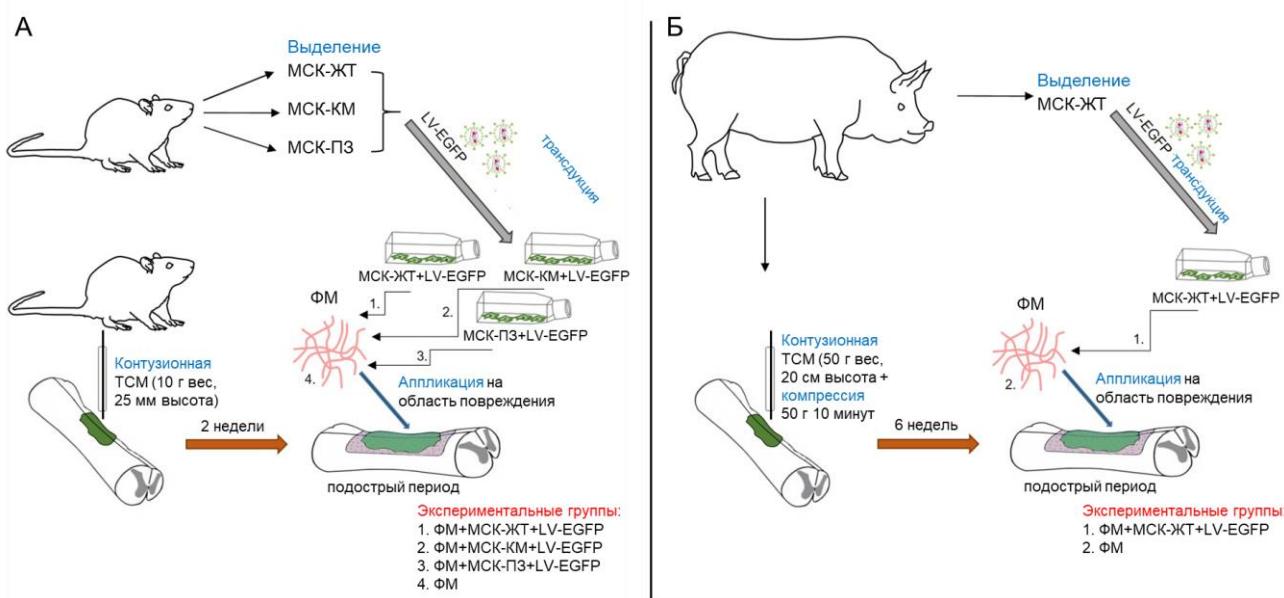


Рисунок 1. Схема эксперимента при аппликации МСК крысам и свиньям.

2-3 надсечки длиной 2-3 мм на расстоянии 2-3 мм друг от друга) апплицировали 8 млн МСК-ЖТ, заключенных в 150 мкл ФМ (рис. 1Б). Животным контрольной группы в аналогичных условиях эксперимента накладывали ФМ без клеток. Далее рану послойно зашивали, животным внутримышечно вводили цефазолин (25 мг/кг) один раз в сутки в течение 5 дней.

Оценка восстановления двигательной функции проводилась у крыс и свиней с использованием поведенческих тестов BBB и PTIBS, соответственно (Basso et al., 1995; Lee et al., 2013). Регистрацию в баллах параметров произвольных движений проводили два независимых исследователя с параллельным проведением видеозаписи.

Электрофизиологические методы проводили под общей анестезией у крыс и свиней с регистрацией до и после ТСМ М- и Н-ответов (у свиней только М-ответ), двигательных (ДВП) и соматосенсорных (ССВП) вызванных потенциалов.

Классические морфологические методы и имmunогистохимия. Перед забором материала животных наркотизировали и транскардиально перфузировали 10% раствором формалина (4°C). Фрагмент спинного мозга общей длиной 5 см, включая эпикентр повреждения, забирали вместе с позвонками (для крыс) или сразу выделяли из позвоночного столба (для свиней). Через 12 и 48 ч от начала фиксации полученный спинной мозг крыс и свиней, соответственно, выделяли и разделяли на 5 равных частей, перенося последовательно в 15%, а затем в 30% сахарозу.

Криостатные поперечные срезы спинного мозга, полученные на 30 или 74 сутки (крысы) и через 22 недели (свиньи) после ТСМ, на протяжении 5 мм от эпикентра травмы в ро-

стральном и каудальном направлении окрашивали при помощи азура и эозина (МиниМед). Часть продольных срезов подгруппы МККП окрашивали красителем Вейгерта-Ван Гизона (МиниМед) для визуализации эластических и коллагеновых волокон. Окрашенные срезы заключали в витрогель и изучали при помощи светового сканирующего микроскопа APERIOCS2 (Leica). В группах с транспланацией МККП суммарная площадь патологических полостей была рассчитана и вычтена из площади сохранной нервной ткани, визуализируемой на продольном срезе длиной 4,5 мм по методу, описанному ранее (Barbour et al., 2013) и с использованием программы ImageJ Version 1.46. Для других экспериментальных групп измеряли суммарную площадь патологических полостей и площадь сохранной ткани на поперечных срезах спинного мозга. Показатель площади патологических полостей был рассчитан путём суммирования посттравматических кист площадью не менее 1,500 мкм² с использованием программного обеспечения Aperio imagescope (Leica).

Поперечные срезы спинного мозга толщиной 1 мкм, полученные с помощью Ultracut Leica EM UC7 (Leica), окрашивали метиленовым синим для визуализации миелиновых волокон. Сохранные миелиновые волокна в области CST, а также латеральных и центральных канатиков (LF и VF, S=0,01 мм²) подсчитывали с обеих сторон на расстоянии 2,5 мм рострально и каудально от места повреждения при помощи программы ImageTool 3.0.

На полученных поперечных или продольных криостатных срезах спинного мозга толщиной 20 мкм проводили имmunогистохимические исследования. Для идентификации антигена срезы инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными антителами против белков VEGF и GDNF, маркёра ядер клеток человека (HNu), маркёров ШК – транскрипционного фактора Krox20, белков периферического миелина P0 и Peripherin, низкоаффинного рецептора фактора роста нервов p75, а также аксональных белков CGRP и GAP43, маркёров астроцитов и микроглии – GFAP и Iba1, соответственно. На следующий день срезы промывали в PBS и инкубировали со вторичными антителами в течение 2 часов при комнатной температуре (RT). Для визуализации ядер клеток срезы дополнительно окрашивали в растворе 4',6-диамино-2-фенилиндола (DAPI) и тщательно промывали в PBS. Окрашенные срезы заключали в среду ImmunoHistoMount (Sigma) и изучали при помощи конфокального сканирующего микроскопа LSM 780.

При помощи программы Zen 2012 Software (Carl Zeiss) на поперечных срезах спинного мозга анализировали общую интенсивность свечения GFAP и Iba1 на расстоянии 5 мм рострально и каудально от эпицентра травмы. Все снимки были сделаны с использованием идентичных настроек конфокального микроскопа. Для полукачественной имmunогистохимической оценки глиальных клеток были выбраны следующие области (S=2 мм²): перед-

ние рога (VH), область вокруг центрального канала (CC), CST, VF и DREZ. В подгруппе МККП был также проведен анализ средней интенсивности свечения GAP-43 на продольных срезах спинного мозга в области эпицентра повреждения $S=2$ мм^2 при помощи аналогичной программы.

Электронная и иммуноэлектронная микроскопия. Клетки микроглии и спинной мозг подгруппы МККП, последовательно фиксированные в 2,5 % глютаральдегиде и 1% тетроксида осмия, обезвоживали в ряде спиртов, ацетоне и оксипропилене с последующим заключением в Epon (Fluka). Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме Leica EM, монтировали их на медные сетки (Sigma, 200 mesh) и инкубировали с уранилацетатом и цитратом свинца для двойного контраста. Часть образцов спинного мозга заливали в LR-white (Sigma) для последующей иммуноэлектронной микроскопии. Ультратонкие срезы закрепляли на никелевых решетках из формваровой пленки (Sigma, 200 mesh), инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными антителами, а на следующий день со вторичными антителами, конъюгированными 10 нм частицами золота (Sigma) 1 час при RT. Для лучшей визуализации серебро (Silver Enhancer Kit, Sigma) наносили на коллоидное золото. Затем срезы дважды контрастировали уранилацетатом в течение 20 мин при 60°C и цитратом свинца 10 мин при RT.

Проведение полимеразной цепной реакции в реальном времени. Количественную оценку транскрипции мРНК генов *vegf*, *gdnf*, *egfp*, *pmp2*, *pmp22*, *mpz*, *iba1*, *irf5*, *gfap*, *fgrf2*, *HSPA1b*, *CNPase*, *pdgfr*, *S100*, *ngf*, *olig2*, *caspase 3*, *MBP*, *GAP-43*, *pdgfar* и *vimentin* ткани спинного мозга в области эпицентра травмы проводили на приборе CFX 96 Real-Time System (BioRad) с использованием программного обеспечения BioRad CFX Manager и пакета программ MS Excel. Количество мРНК было нормализовано по гену 18S рРНК. Уровень экспрессии генов в интактном спинном мозге принимали за единицу.

Вестерн blot анализ. Общий белок экстрагировали из спинного мозга путём гомогенизации образцов ткани в RIPA буфере (Sigma). Концентрации белка измеряли с помощью набора Protein Assay BCA Kit (Thermo Scientific). Белковые экстракты (40 мкг) разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле и наносили на поливинилиденфторидные мембранны. После инкубации с первичными и вторичными антителами выявление и анализ иммуннопреципитатов выполняли с помощью системы Gel Doc XRS+. Для количественной обработки результатов была использована программа ImageJ версии 1.46, денситометрические уровни белков были нормализованы по β-актину.

Оценка цитокинового профиля. Анализ супернатантов культуры МСК-ЖТ свиней на 3 пассаже, а также сыворотки крови и ткани спинного мозга в области повреждения у

крыс выполняли на основе технологии xMAP Luminex с использованием наборов MILLIPLEX MAP Porcine Cytokine/Chemokine (magnetic) kit № PCYTMG-23K-13PX (Millipore) и Bio-Plex Pro™ Rat Cytokine 24-plex Assay #171K1001M (Bio-Rad) в соответствии с инструкциями производителя. Все эксперименты проводили минимум в 3х повторностях.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программного обеспечения Origin 7.0 SR0. Статистическую достоверность различий определяли с помощью одностороннего или двустороннего дисперсионного анализа ANOVA при помощи post hoc теста Тьюки. Статистически значимым считалось значение $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Сроки выживания и миграционный потенциал трансплантированных клеток

Иммуногистохимическая реакция с антителами против HNu подтвердила наличие трансплантированных МККП в области повреждения на 30 сутки после их инъекции. В 1ой контрольной группе HNu⁺-клетки выживали в повреждённом спинном мозге и формировали клеточные мостики в области центральной посттравматической полости (рис. 2A, A''). В опытной группе с трансплантацией МККП, генетически модифицированных Ad5-VEGF и Ad5-GDNF, HNu⁺-клетки были обнаружены в меньшей степени в посттравматических поло-

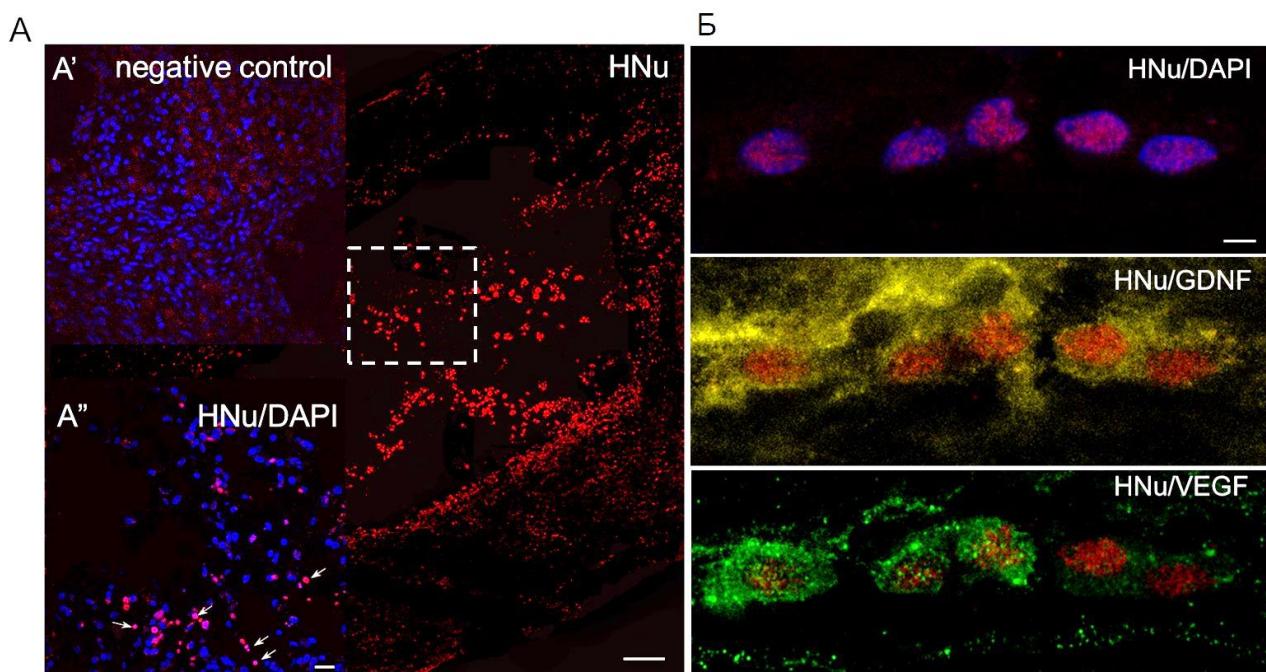


Рисунок 2. Визуализация HNu⁺-клеток (красным) в области ТСМ на 30 сутки после трансплантации МККП, трансдуцированных Ad5-EGFP (А) или Ad5-VEGF и Ad5-GDNF (Б). Ядра клеток окрашены DAPI (синим). Область, отмеченная пунктиром, показана увеличенной в А''. Стрелками показаны примеры колокализации HNu и DAPI. Аналогичная область, выделенная пунктиром, в последующих серийных срезах была окрашена как отрицательный контроль и показана в А'. Экспрессия VEGF (зеленым) и GDNF (желтым) в HNu⁺-клетках (Б). Масштаб: 200 (А), 10 (А', А''), 2,5 (Б) мкм.

стях и преимущественно располагались в сохранной ткани и вдоль нервных волокон. Исследование подтвердило экспрессию продуктов терапевтических генов *vegf* и *gdnf* в МККП, обнаруженных на 30 сутки в области ТСМ (рис. 2Б).

На 30 сутки после ТСМ и инъекции клеток микроглии, трансдуцированных Ad5-EGFP, были обнаружены EGFP⁺-клетки, расположенные преимущественно вокруг небольших полостей на расстоянии до 4 мм в обоих направлениях от эпицентра повреждения. Единичные EGFP⁺-клетки на данном сроке были найдены в VH на аналогичном расстоянии от области нейротравмы.

В спинном мозге крыс опытных групп с наложением на область повреждения спинного мозга МСК (3 источника, 3 группы), трансдуцированных лентивирусом LV-EGFP и заключенных в ФМ, специфическое свечение было выявлено на расстоянии до 5 мм в ростральном и каудальном направлении от эпицентра травмы. Это свечение четко прослеживалось как на ранних сроках после наложения клеток (7-14 сутки), так и на более поздних сроках (30-60 сутки). К 7 и 14 суткам после трансплантации флуоресцирующие клетки были расположены преимущественно в области DREZ, CC, латерального пирамидного тракта (ПТ) и в меньшей степени CST, а к 30 и 60 суткам – обнаружены также в области VH и VF. Полученные результаты показали тропность трансплантированных МСК к серому веществу и их преимущественную миграцию через задние корешки спинного мозга, что можно объяснить наличием направляющих путей для их продвижения и нарушением целостности барьера в этой области после ТСМ (рис. 3). При этом полученные данные по распределению МСК в области ТСМ крыс были аналогичны для всех трёх опытных групп.

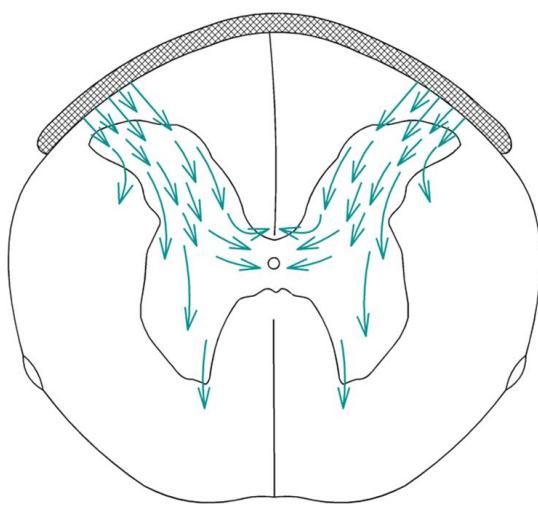


Рисунок 3. Схематическое изображение миграции МСК (стрелки), полученных из различных источников, после их наложения совместно с ФМ (заштрихованная зона) на область ТСМ.

Через 14 дней после аппликации МСК-ЖТ на область повреждения спинного мозга свиней были получены результаты, аналогичные таковым на модели ТСМ крыс. В указанный посттравматический период трансдуцированные лентивирусом LV-EGFP МСК-ЖТ преимущественно располагались в области DREZ, дорсальных рогов (DH), дорсальных канатиков

(DF) и СС (рис. 4А-Г). МСК-ЖТ были обнаружены также в зоне эпидурального фиброза, где большее количество трансплантированных клеток было визуализировано над эпицентром повреждения и в каудальном направлении, а меньшее количество – над ростральной частью спинного мозга (рис. 4Д, Д').

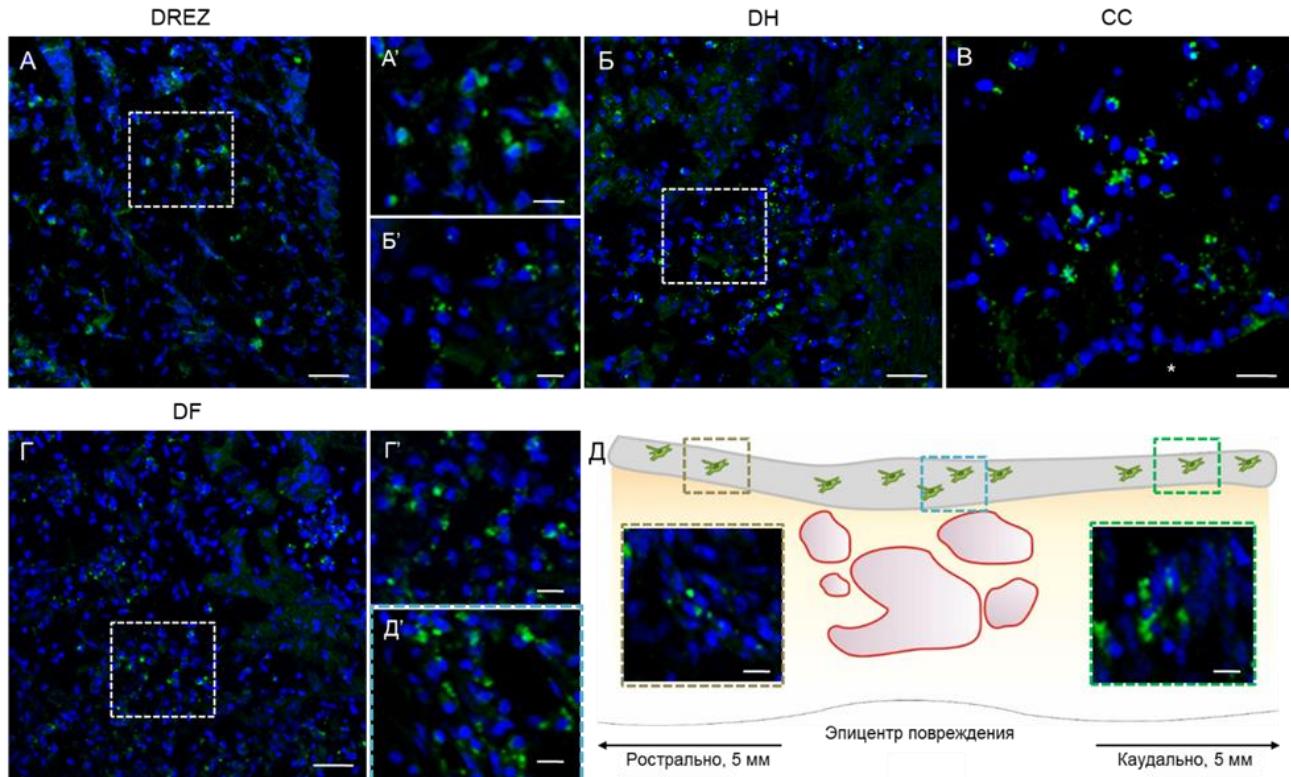


Рисунок 4. Распределение и выживаемость МСК-ЖТ, трансдуцированных LV-EGFP (зеленое свечение), после их аппликации на область ТСМ свиней. На 14 сутки после трансплантации меченные LV-EGFP МСК-ЖТ располагались преимущественно в DREZ (А), DH (Б), СС (В) и DF (Г). Звездочка указывает на СС. Часть МСК-ЖТ можно было увидеть в области эпидурального фиброза (серая зона) (Д). Цветными пунктирными прямоугольниками (коричневый - ростральная часть; синий - эпицентр повреждения; зеленый - каудальная часть) на схеме обозначена соответствующая область с количественным распределением МСК-ЖТ. Области А, Б и Г, выделенные пунктирной рамкой, соответствуют увеличенным изображениям А', Б' и Г'. Ядра клеток окрашены DAPI (синим). Конфокальная микроскопия. Масштаб: 50 (А, Б, Г), 20 (В) и 10 (А', Б', Г', Д') мкм.

Для получения максимального терапевтического эффекта генетически модифицированные клетки должны обладать хорошим миграционным потенциалом и жизнеспособностью для реализации поддерживающего влияния и доставки генов стимуляторов нейрогенерации с целью посттравматического восстановления спинного мозга и его функций. В этом отношении метод доставки имеет большое значение, в том числе и для будущей трансляции в клинику. В данном исследовании было показано, что интраспинальный вариант доставки генетически модифицированных МККП и клеток микроглии способствует длительному присутствию данных клеток в области травмы (до 30 суток) с сохранением экспрессии продуктов рекомбинантных генов. В тоже время аппликация заключенных в ФМ МСК на

область аналогичной ТСМ крысы способствует сохранению жизнеспособности трансплантированных клеток до 60 суток и демонстрируют их тропность к серому веществу, что предопределяет данный вариант доставки как наиболее перспективный для экстраполяции в клиническую практику.

2. Влияние на посттравматическую регенерацию спинного мозга крыс интраспинальной инъекции мононуклеарных клеток крови пуповины человека, трансдуцированных аденоизирумыми векторами Ad5-VEGF и Ad5-GDNF

В опытной группе с трансплантацией МККП, генетически модифицированных Ad5-VEGF и Ad5-GDNF, с 21 дня тестирования по методу BBB среднее значение показателя двигательной активности задних конечностей было достоверно выше ($P < 0,05$), чем в 1ой контрольной группе [16.14 ± 2 vs. 10.07 ± 1.3]. Различия между опытной и 2ой контрольной (КТСМ без трансплантации клеток) группами были значительными и достоверными, начиная с 13 суток тестирования.

К 30 суткам после ТСМ было обнаружено достоверное уменьшение амплитуды М-ответа (A_{max}) на 40% во 2ой контрольной группе без трансплантации клеток при сравнении с группой интактных животных. Значение латентного периода (LP) М-ответа и соотношение H_{max}/M_{max} в опытной группе были ближе всего к аналогичному показателю интактного контроля и достоверно не различались [$LP: 1,05 \pm 0,4$ vs. $0,53 \pm 0,1$; $H_{max}/M_{max}: 13,77 \pm 3,5$ vs. $16,5 \pm 1,05$]. Во 2ой контрольной группе LP Н-ответа был на 65 и 35% выше ($P < 0,05$) аналогичного показателя у интактных животных и опытной группы, соответственно. Таким образом, трансплантация МККП в целом способствовала стабилизации уровня рефлекторной возбудимости спинальных мотонейронов и предотвращала развитие задержки проведения по рефлекторной дуге. Однако по критерию соотношения H_{max}/M_{max} трансплантация МККП, генетически модифицированных Ad5-VEGF и Ad5-GDNF, представляется более эффективной, чем инъекция трансдуцированных Ad5-EGFP МККП, особенно с учётом увеличения суммарного значения двигательной активности по шкале BBB.

На 30 день после ТСМ площадь сохранившейся нервной ткани, выраженная в процентах от интактного контроля, была максимальной в опытной группе [$53,1 \pm 4,5$], что достоверно выше аналогичного показателя в 1ой [$47 \pm 1,8$] и 2ой [$38,8 \pm 1,2$] контрольных группах. На этом же сроке после ТСМ было выявлено значительное снижение ($P < 0,05$) площади патологических полостей в опытной [$7,4 \pm 1,3$] и 1ой контрольной [$11,7 \pm 2,5$] группах при сравнении со 2ой контрольной группой без трансплантации клеток [$31,9 \pm 2,1$]. Количество сохранных миелиновых волокон в области VF и LF на расстоянии 2.5 мм в каудальном направлении от эпикентра повреждения было достоверно выше в группах с трансплантацией МККП при срав-

нении со 2ой контрольной группой без трансплантации клеток (рис. 5А-В). В области CST на исследуемом расстоянии от эпицентра повреждения к 30 суткам после ТСМ в опытной группе с трансплантацией МККП, генетически модифицированных Ad5-VEGF и Ad5-GDNF, среднее количество сохранных миелиновых волокон было выше в 11,7 раз ($P < 0,01$) в ростральном и в 22 раза ($P < 0,01$) в каудальном направлении при сравнении с 1ой контрольной группой (рис. 5Г). Таким образом, полученные результаты согласуются с другими работами (Guseva et al., 2014; Islamov et al., 2017) и показывают возможность усиления терапевтического эффекта МККП за счет сверхэкспрессии генов, кодирующих нейротрофические и ангиогенные факторы, что установлено при анализе структурного восстановления ткани в области ТСМ.

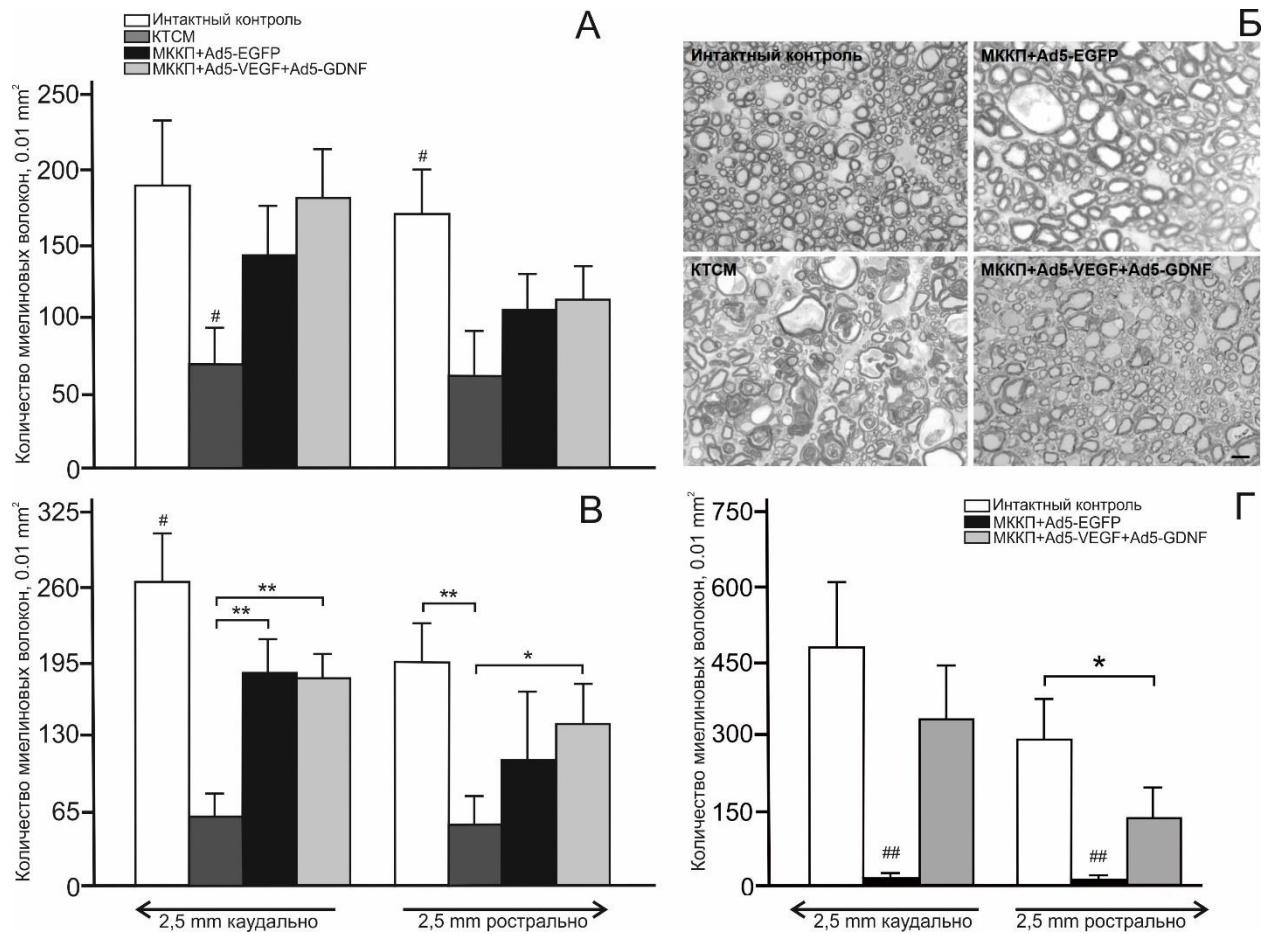


Рисунок 5. Среднее количество сохранных миелиновых волокон (ось Y) в области LV (А), VF (Б, Б') и CST (Г) спинного мозга на расстоянии 2.5 мм рострально и каудально от эпицентра повреждения/Th8 к 30 суткам после ТСМ. # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ при сравнении с остальными экспериментальными группами. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. Поперечный срез спинного мозга экспериментальных групп на расстоянии 2.5 мм каудально от эпицентра повреждения/Th8 к 30 суткам после ТСМ, окраска метиленовым синим, полутонкие срезы (Б). Масштаб: 10 мкм.

На 30 сутки после ТСМ в опытной группе была обнаружена центральная область с отсутствием или минимальной экспрессией GFAP, но с CGRP⁺- и GAP43⁺-аксонами. Вестерн blot подтвердил полученные результаты и показал снижение экспрессии GFAP в 3 раза

($P < 0,01$) на фоне трансплантации МККП, генетически модифицированных Ad5-VEGF и Ad5-GDNF, при сравнении со 2ой контрольной группой без трансплантации клеток и на 30% ($P < 0,05$) при сравнении с 1 ой контрольной группой, где инъецировали трансдуцированные Ad5-EGFP МККП. При одновременном выявлении HNu было выяснено, что МККП на месте повреждения тесно связаны с GAP43⁺-аксонами. Интенсивность свечения GAP-43 на 30 сутки в области повреждения в опытной группе была выше ($P < 0,05$), чем в 1ой и 2ой контрольных группах.

Раннее Awad и соавт. (2015) было показано, что инъекция GDNF в область ТСМ способствует поддержанию экспрессии CGRP и GAP-43, увеличивает количество регенерирующих аксонов, а также стимулирует их рост (Awad et al., 2015). В свою очередь VEGF способен поддерживать выживаемость двигательных и чувствительных нейронов, стимулировать нейрогенез и рост аксонов (Dumpich et al., 2015; Erskine et al., 2017). Таким образом, полученные данные позволили установить, что трансплантация МККП, трансдуцированных комбинацией аденоизированных Ad5-VEGF и Ad5-GDNF, способствует снижению активации астроцитов и усилию роста аксонов, что установлено на 30 сутки после ТСМ.

На 30 сутки после ТСМ в группах с трансплантацией МККП P0⁺-миelin присутствовал в DF и DREZ. При этом дезинтеграция периферического миелина наблюдалась значительно реже при сравнении со 2ой контрольной группой без трансплантации клеток, где P0⁺-миelin был обнаружен только в DF. Результаты вестерн блота показали, что экспрессия белков P0 и p75 на фоне трансплантации МККП достоверно повышается ($P < 0,05$) при сравнении со 2ой контрольной группой (рис. 6А, Б). Однако достоверная разница между группами с трансплантацией МККП была обнаружена только по экспрессии белка p75, где данный показатель в опытной группе был на 30,4% больше ($P < 0,05$) аналогичного в 1 ой контрольной группе.

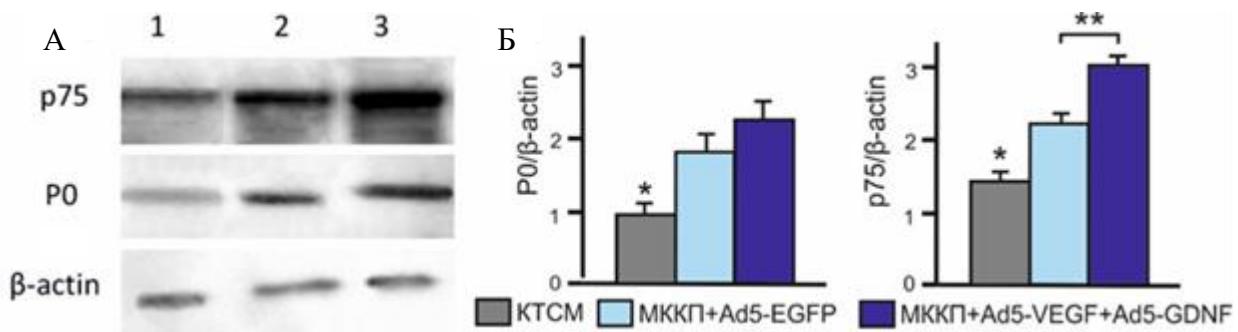


Рисунок 6. (А) Вестерн блот анализ экспрессии p75 и P0 в области повреждения на 30 сутки в группах: (1) КТСМ, (2) МККП+Ad5-EGFP, (3) МККП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF. β -актин был использован в качестве внутреннего контроля. (Б) Денситометрический анализ экспрессии P0 и p75 относительно β -актина. ** $P < 0,05$; * $P < 0,05$ при сравнении с остальными экспериментальными группами.

Полученные результаты демонстрируют положительное влияние трансплантации МККП на миграционный потенциал (обнаружение Р0⁺-миелина в области DREZ) ШК и сохранность периферического миелина. Согласно данным иммуногистохимического и вестерн blot анализа трансплантация МККП, генетически модифицированных Ad5-VEGF и Ad5-GDNF, в большей степени поддерживает популяцию предшественников ШК, для которых характерна экспрессия белка p75.

3. Фагоцитарная активность клеток микроглии крысы на фоне их трансдукции адено-вирусным вектором Ad5-GDNF

Трансдукция микроглии Ad5-GDNF или добавление в культуру гpGDNF уменьшало ($P <0,05$) фагоцитарную активность клеток. При этом аналогичный показатель нативной и Ad5-EGFP трансдуцированной микроглии не имел достоверных различий. Таким образом, снижение фагоцитарной активности микроглии не было связано с инфицированием клетки Ad5, а опосредовано влиянием GDNF. Полученные результаты согласуются с более ранними данными *in vitro*, проведенными Rocha и соавт. (2012), которые установили важную роль GDNF, секретируемого астроцитами, в контроле активации микроглии.

4. Влияние на посттравматическую регенерацию спинного мозга крыс интраспинальной инъекции микроглии, трансдуцированной аденоизиусным вектором Ad5-GDNF

Показатели двигательной функции в опытной группе с трансплантацией трансдуцированных Ad5-GDNF клеток микроглии были выше, чем в 1ой и 2ой контрольных группах в течение 30 дней после травмы. Тем не менее, значимые различия ($P <0,05$) наблюдались только между опытной группой и 2ой контрольной без трансплантации клеток на 14 и 21-29 сутки после ТСМ.

Морфометрический анализ показал, что площадь сохранной нервной ткани в 1ой контрольной группе с трансплантацией трансдуцированных Ad5-EGFP клеток микроглии была больше, чем в остальных экспериментальных группах. При этом достоверная разница наблюдалась: на расстоянии 2 ($>$ в 1.85 раза) и 5 мм ($>$ в 1.26 раза) в каудальном направлении при сравнении со 2ой контрольной группой без трансплантации клеток; на расстоянии 4 мм ($>$ в 1.35 раза) в ростральном и 1-5 мм ($>$ в 1.34-1.73 раза) в каудальном направлении при сравнении с опытной группой. В тоже время между 2ой контрольной и опытной группами не было обнаружено достоверных различий по показателю сохранности нервной ткани. Анализ суммарной площади патологических полостей выявил, что на расстоянии 3 мм в каудальном направлении данный показатель в 1ой контрольной группе был в ~7 раз меньше ($P <0,05$), чем в опытной группе.

В большинстве случаев повышение интенсивности флуоресценции белка Iba1 сопровождалось понижением аналогичного показателя GFAP и, наоборот, в группах с трансплантацией микроглии. Особенно это заметно на расстоянии 5 мм в ростральном направлении, где общая интенсивность свечения GFAP во всех исследуемых зонах была выше во 2ой контрольной группе при сравнении с опытной группой (рис. 7А-В). Из данных результатов можно сделать вывод о том, что чем больше в области повреждения микроглии, тем меньше количество реактивных GFAP⁺-астроцитов. Полученные данные согласуются с результатами Hamanoue и соавт. (2015), показавшими возможность активированной микроглии в хронический период после ТСМ приводить к значительной редукции глиального рубца.

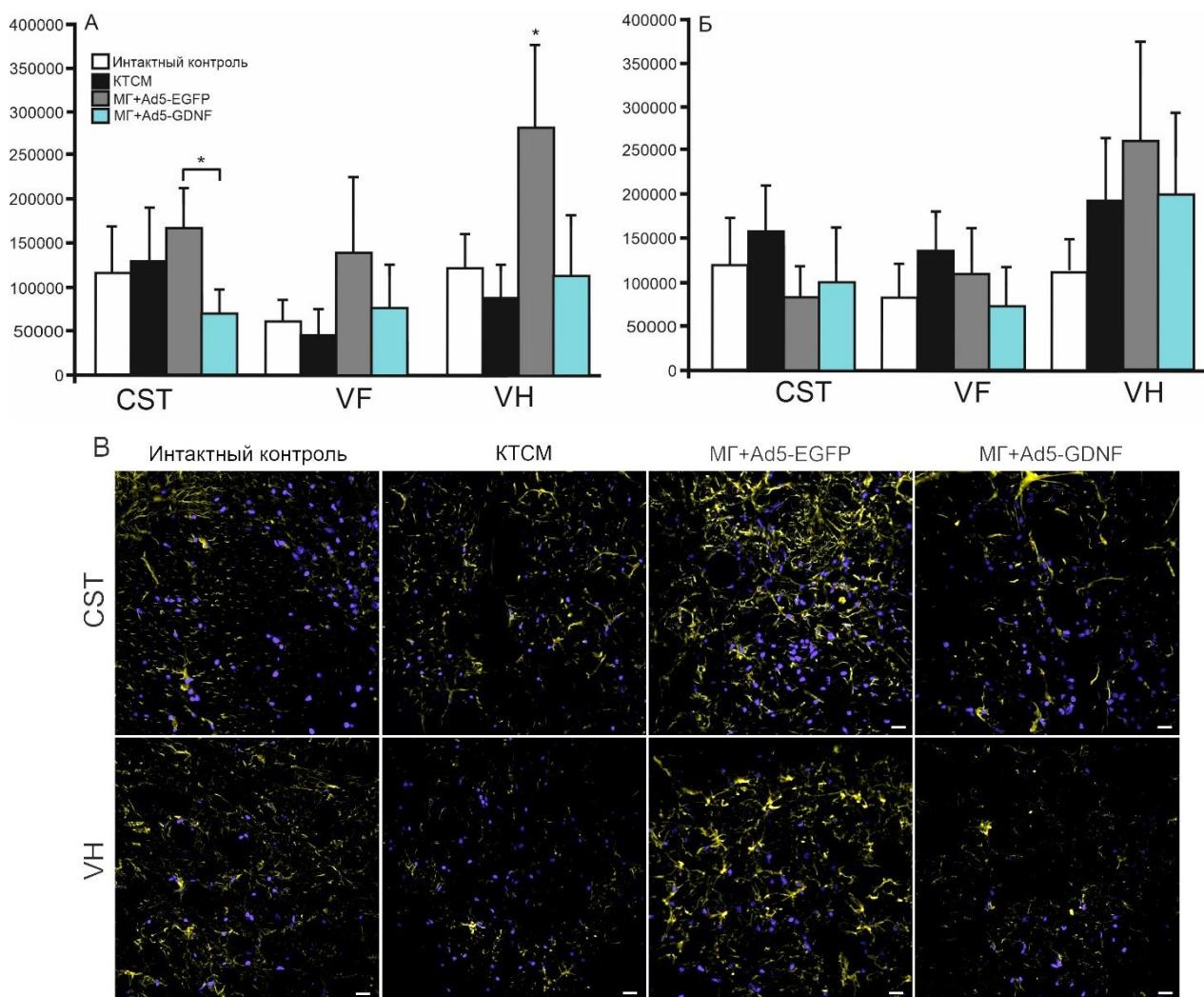


Рисунок 7. Общая интенсивность свечения GFAP (ось Y) на 30 сутки после ТСМ на расстоянии 5 мм рострально (А) и каудально (Б) от эпицентра повреждения в исследуемых областях экспериментальных групп (ось X). *P <0,05. (В) Визуализация GFAP⁺-клеток (желтым) на расстоянии 5 мм рострально от эпицентра повреждения в зонах CST и VH экспериментальных групп. Ядра клеток окрашены DAPI (синим). Конфокальная микроскопия. Масштаб: 20 мкм.

Одна из задач нашего исследования ставила цель определить насколько увеличение количества сверхэкспрессирующей GDNF микроглии в острый период ТСМ крысы может

предопределить исход посттравматических процессов. В ходе исследования было обнаружено, что в группе с трансплантацией микроглии, трансдуцированной Ad5-GDNF и имеющую сниженную фагоцитарную активность, площадь сохранной ткани была меньше, чем в группе с трансплантацией микроглии, трансдуцированной Ad5-EGFP, не оказывавшего влияния на активность клеток. В то же время, достоверной разницы в показателе функционального восстановления между данными группами обнаружено не было. Таким образом, увеличение количества активно фагоцитирующей микроглии в области ТСМ может способствовать улучшению сохранности нервной ткани, не оказывая значимого эффекта на восстановление двигательной функции в течении 30 суток после повреждения.

5. Фенотип, жизнеспособность, дифференцировочный потенциал и экспрессия цитокинов мезенхимными стволовыми клетками свиней на фоне их трансдукции LV-EGFP

Исследование показало, что культивируемые клетки сохраняют характерную для МСК морфологию фибробластоподобных клеток на протяжении как минимум 6 пассажей, в том числе при трансдукции LV-EGFP. При проведении проточной цитофлуориметрии и иммуноцитохимии были получены данные, свидетельствующие об экспрессии нативными и трансдуцированными LV-EGFP клетками следующих маркеров: CD90, CD73, CD44, Stro-1 и CD29 (табл. 2). Жизнеспособность нативных МСК-ЖТ свиньи составила $98\pm2\%$, трансдукция данных клеток LV-EGFP незначительно снижала исследуемый показатель, который составил $93\pm1\%$ на 3 день после генетической модификации.

Таблица 2. Данные проточной цитофлуориметрии по экспрессии поверхностных антигенов в клетках, полученных из жировой ткани свиньи до и после трансдукции LV-EGFP (%).

Источник МСК	CD90	CD73	CD44	Stro-1	CD29
Жировая ткань	$94,5\pm3,7/$ $93,6\pm5,2$	$92\pm2,5/$ $91\pm0,5$	$86,7\pm8,9/$ 78 ± 4	$95,5\pm6,4/$ $95\pm4,5$	$63\pm9,5/$ $52,6\pm13,5$

В ходе исследования было показано, что трансдукция LV-EGFP МСК-ЖТ свиньи не приводит к существенным сдвигам дифференцировки в трёх основных направлениях: остеогенном, адипогенном и хондрогенном. Результаты также продемонстрировали отсутствие значительных изменений в экспрессии исследуемых маркеров (IL-1a, IL-1b, IL-6, IL-8, IL-18 и TNF-a) в МСК-ЖТ после трансдукции LV-EGFP. Тем не менее, данное исследование подтверждает наличие вариабельности цитокинового профиля МСК-ЖТ среди отдельных доноров свиней.

Репортерный ген *egfp* широко используется в исследованиях регенеративной медицины для маркировки и отслеживания стволовых клеток, а также оценки их выживаемости (Yang et al., 2017). Существует несколько противоречивых данных о влиянии GFP на разные

типы клеток, а поскольку в нашей работе мы использовали генетически модифицированные LV-EGFP МСК, предварительно было исследовано потенциальное влияние лентивирусного вектора с репортерным геном *egfp* на морфологию, фенотип и поведение МСК-ЖТ. Полученные нами результаты согласуются с другими исследованиями, в которых ранее показано, что трансдукция LV-GFP МСК не оказывает отрицательного влияния на жизнеспособность, фенотип и дифференцировочный потенциал данных клеток (Yu et al., 2015; van Vollenstee et al., 2016).

6. Влияние на посттравматическую регенерацию спинного мозга крыс аппликации на область повреждения аллогенных мезенхимных стволовых клеток, полученных из живой ткани, костного мозга или пульпы зуба

Исследование двигательной функции по методу ВВВ показало, что к 11-й неделе после ТСМ и проведения терапии данный показатель был выше в группе с аппликацией МСК-ЖТ [$17,1 \pm 3,1$] при сравнении с другими группами: обнаружены значительные различия ($P < 0,05$) в течение 4-11 недель после повреждения с 1ой контрольной группой (ФМ) и 4-6 недель с группой МСК-КМ. К 74 суткам эксперимента положительная динамика к восстановлению соотношения H_{max}/M_{max} ответов была установлена в группах с аппликацией МСК-ЖТ и МСК-ПЗ. При этом лучшие показатели восстановления ДВП отмечены при аппликации МСК-ЖТ и МСК-КМ по сравнению с другими экспериментальными группами с ТСМ. При исследовании ССВП достоверное снижение средней амплитуды (Amiddle) пика N1 ($P < 0,05$) обнаружено в 1ой контрольной группе с аппликацией ФМ по сравнению с интактным контролем и группой МСК-ЖТ. Таким образом, суммирование выше обозначенных данных подтверждает терапевтические преимущества применения МСК-ЖТ по сравнению с аналогичной аппликацией МСК, полученных из других источников.

Аппликация МСК-ЖТ приводила к улучшению морфометрических показателей к 60 суткам после проведенной клеточной терапии при сравнении с 1ой контрольной группой: площадь сохранной ткани была больше ($P < 0,05$) на расстоянии 1 и 2 мм рострально и 3 мм каудально от эпицентра ТСМ, суммарная площадь патологических полостей была меньше ($P < 0,05$) на расстоянии 1 мм рострально и 1-3 мм каудально от эпицентра ТСМ (рис. 8А, Г, Ж). При сравнительном анализе морфометрических показателей в опытных группах было установлено достоверное увеличение сохранности нервной ткани в группе с аппликацией МСК-ЖТ при сравнении с МСК-КМ (на расстоянии 2 мм рострально и 3 мм каудально) и МСК-ПЗ (на расстоянии 2 мм рострально и 3, 5 мм каудально) (рис. 8А-В). В тоже время суммарная площадь патологических полостей в группе с аппликацией МСК-ЖТ была меньше ($P < 0,05$) при сравнении с группой МСК-КМ в области эпицентра ТСМ и на расстоянии

3 мм каудально (рис. 8Г-Е). Об увеличении сохранности нервной ткани сообщалось ранее в публикациях по трансплантации МСК при ТСМ (Neirinckx et al., 2015; Sun et al., 2018). Однако в нашем исследовании было впервые проведено сравнительное исследование влияния

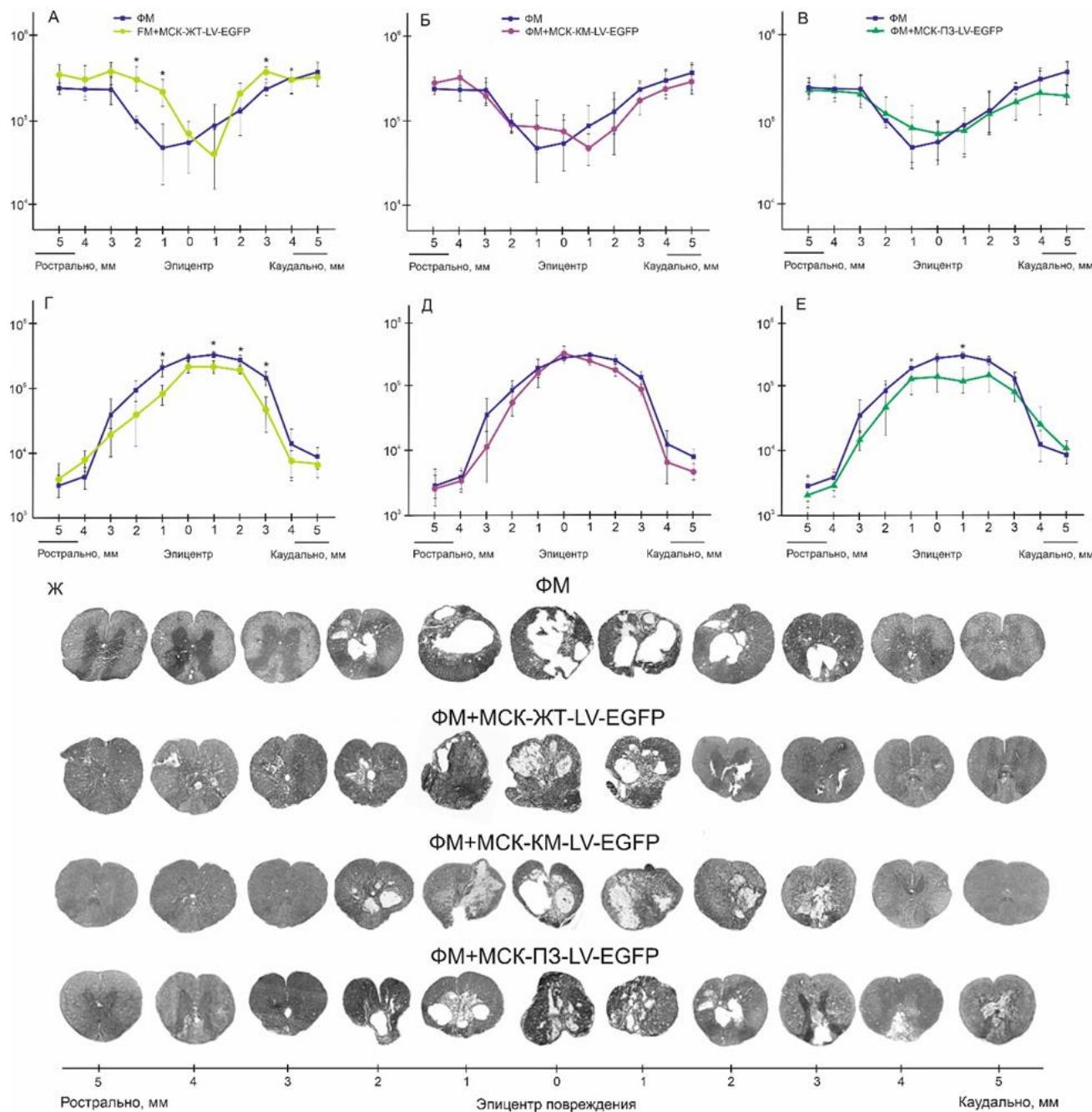


Рисунок 8. Морфометрический анализ спинного мозга на 60 сутки после аппликации МСК и/или ФМ в экспериментальных группах. Площадь сохранной нервной ткани (А-В) и суммарная площадь патологических полостей (Г-Е) (ось Y) на расстоянии 5 мм рострально и каудально от эпикентра повреждения (ось X). *P <0,05. Нижняя панель – поперечные срезы поврежденного спинного мозга экспериментальных групп (окрашивание азуром и эозином).

МСК-ЖТ, МСК-КМ и МСК-ПЗ на морфометрические показатели и показано стимулирование восстановления травмированной ткани в большей степени посредством МСК-ЖТ. Показано, что МСК могут опосредовать структурное улучшение в подострый период ТСМ за счет

снижения воспаления, уменьшения глиального рубца и формирования клеточных мостиков, задающих направление для последующей миграции клеток и роста аксонов (Qu, Zhang, 2017). В этой связи помимо оценки морфометрических показателей представляется необходимым анализ реактивности астроцитов и микроглии на фоне проводимой терапии.

Наиболее выраженные изменения экспрессии GFAP между экспериментальными группами были выявлены в каудальном направлении от эпицентра ТСМ. Показатель общей интенсивности свечения GFAP был наибольшим в 1ой контрольной группе с аппликацией ФМ без клеточной терапии и 2ой опытной группе МСК-КМ. Аналогичный показатель был минимальным в 1ой опытной группе с аппликацией МСК-ЖТ в зонах СС и DREZ, имея значение ниже ($P < 0,05$), чем в интактном контроле. Максимальный уровень общей интенсивности свечения *Iba1* был обнаружен в группах с аппликацией МСК-КМ и ФМ без клеточной терапии в сером веществе, зонах VH и DREZ. Снижение экспрессии *Iba1* ($P < 0,05$) было обнаружено в области СС в группах с аппликацией МСК-ЖТ и МСК-КМ при сравнении с 1ой контрольной группой. Полученные результаты подтверждают, что МСК способны влиять на процессы вторичного повреждения при ТСМ, внося вклад в модуляцию активации астроцитов и микроглии, что согласуется с результатами других исследований (Krupa et al., 2018; Yang et al., 2018). Тем не менее, МСК, полученные из различных источников, не опосредуют в равной степени супрессию реактивности данных глиальных клеток, что впервые показано в нашей работе.

В ходе молекулярного анализа области повреждения было обнаружено, что во всех опытных группах на 60 сутки после аппликации МСК значительно повышен ($P < 0,05$) уровень мРНК генов *HSPA1b* и *mpz* при сравнении с 1ой контрольной группой ФМ без клеточной терапии. Полученные результаты представляются достаточно позитивными с учётом того, что *HSPA1b* является жизненно важным антиапоптотическим регуляторным белком, а *mpz* кодирует синтез белка периферического миелина. Снижение экспрессии мРНК гена *Iba1* ($P < 0,05$) было установлено на фоне аппликации МСК-ЖТ и МСК-КМ при сравнении с другими экспериментальными группами. Указанные данные частично согласуются с описанными ранее результатами (см. главу 5) и свидетельствуют о супрессии микроглии и/или снижении её инфильтрации ткани в области повреждения. Экспрессия мРНК генов *gfp*, *S100* и *vimentin* была значительно снижена ($P < 0,05$), а уровень мРНК генов *GAP-43* и *pdgf β r* был повышен ($P < 0,05$) на фоне аппликации МСК-ЖТ и МСК-ПЗ при сравнении с другими экспериментальными группами. Полученные данные могут свидетельствовать о возможности регенерации аксонов, а также косвенно указывать на стимулирование неоваскуляризации в группах МСК-ЖТ и МСК-ПЗ. Таким образом, совокупный анализ полученных результатов в

ходе проведения электрофизиологического, морфометрического, иммуногистохимического и молекулярного анализа с учётом результатов поведенческого тестирования позволил выделить группу с аппликацией МСК-ЖТ поскольку эффекты, полученные в данном случае клеточной терапии, являются наиболее положительными в контексте стимулирования нейрогенерации спинного мозга.

7. Влияние на посттравматическую регенерацию спинного мозга свиней аппликации на область повреждения аутологичных мезенхимных стволовых клеток жировой ткани

На фоне аппликации МСК-ЖТ свиньям с ТСМ было обнаружено увеличение показателя двигательной активности. Тем не менее, полученные различия не были статистически значимыми, и через 22 недели после ТСМ баллы по шкале PTIBS в 1ой контрольной и опытной группах составили $4,2 \pm 0,8$ и $3 \pm 1,8$, соответственно. При проведении электрофизиологического исследования основные обнаруженные различия касались восходящего пути глубокой чувствительности спинного мозга. На 22 неделе в 1ой контрольной группе с аппликацией ФМ без клеточной терапии ССВП со скальпа не были обнаружены, и только у 1 свиньи был поясничный пик с одной стороны. В то время как в опытной группе МСК-ЖТ, корковые пики с одной стороны и поясничные пики с обеих сторон были зарегистрированы у 1 свиньи, поясничные пики с одной стороны – у 2 свиней. Таким образом, можно констатировать частичное восстановление соматосенсорных путей у 3 из 5 свиней, получавших клеточную терапию.

К сожалению, не все экспериментальные исследования по оценке эффективности клеточной терапии при ТСМ крупных животных включают электрофизиологические данные. Тем не менее, оценка проводимости нервов, состояния двигательных и чувствительных проводников может дать точную и важную информацию, подтверждающую или опровергающую целесообразность последующего клинического применения клеточной терапии. Работа Deng и соавт. (2006) показала восстановление утраченных ССВП и ДВП после интраспинальной трансплантации МСК-КМ через 2 недели после ТСМ у макак-резусов. В другом исследовании было продемонстрирована возможность восстановления ССВП у свиней, получивших терапию МСК-КМ в хронический период ТСМ (Zurita et al., 2008). Наше исследование с применением МСК-ЖТ в подострый период ТСМ в виде аппликации совместно с ФМ согласуется с работой Zurita и соавт. (2008) и указывает на частичное восстановление проводимости по восходящему пути глубокой чувствительности спинного мозга свиней.

Применение МСК-ЖТ у свиней привело к улучшению морфометрических показателей через 16 недель после аппликации данных клеток в составе ФМ. Установлено, что в опытной группе с применением МСК-ЖТ площадь сохранной нервной ткани была выше

($P < 0,05$) на расстоянии 2 мм рострально и 1-3 мм каудально, а общая площадь патологических полостей была меньше ($P < 0,05$) на расстоянии 2 и 4 мм рострально от эпицентра ТСМ при сравнении с 1ой контрольной группой без трансплантации клеток (рис. 9А-В). Морфометрический анализ спинного мозга свиньи через 3 месяца после трансплантации МСК-КМ в хронический период компрессионной ТСМ показал снижение объема центральной посттравматической полости (Zurita et al., 2008). Последующее сравнительное исследование на модели ТСМ собак показало снижение площади демиелинизации и поражённой ткани в большей степени при трансплантации МСК-ЖТ и МСК-ПК (Rye et al., 2012). Выявленное нами уменьшение суммарной площади патологических полостей и увеличение сохранности нервной ткани при аппликации на область ТСМ свиньи МСК-ЖТ согласуется с указанными выше результатами, свидетельствуя о пластичности спинного мозга и его способности к регенерации на фоне клеточной терапии.

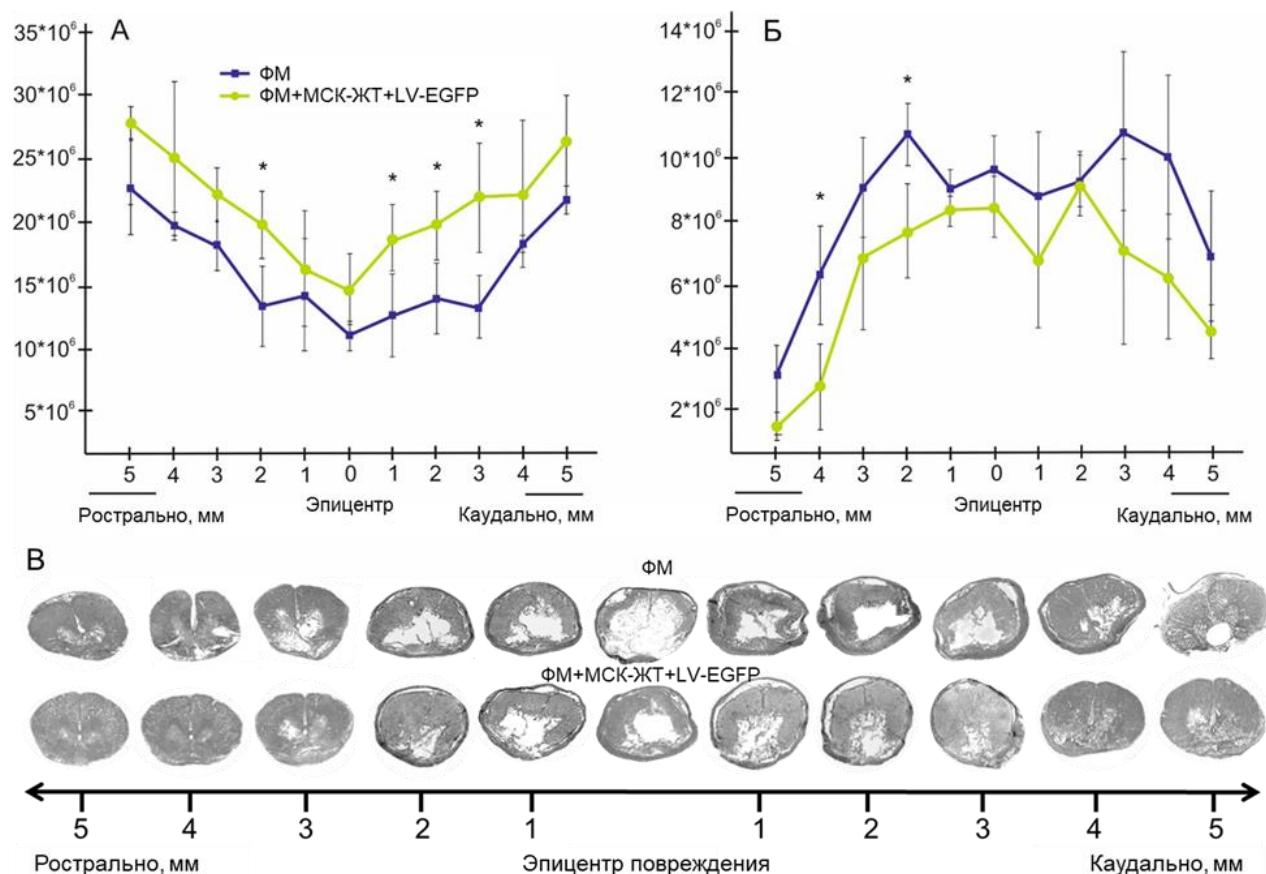


Рисунок 9. Морфометрический анализ спинного мозга через 22 недели после ТСМ в экспериментальных группах. Площадь сохранившейся ткани (А) и суммарная площадь патологических полостей (Б) (ось Y) на расстоянии 5 мм рострально и каудально от эпицентра повреждения (ось X). * $P < 0,05$. Нижняя панель – поперечные срезы повреждённого спинного мозга экспериментальных групп (окрашивание азуром и эозином).

Через 22 недели после ТСМ уровень экспрессии GFAP в DREZ каудально от эпицентра повреждения уменьшился более чем в 2 раза ($P < 0,05$) на фоне аппликации МСК-ЖТ при

сравнении с 1ой контрольной группой без клеточной терапии. В тоже время мы не обнаружили влияния аппликации МСК-ЖТ на активацию микроглии, в отличие от экспериментов на крысах. Таким образом, проведённые эксперименты на свиньях подтвердили возможность МСК-ЖТ снижать уровень экспрессии GFAP и, следовательно, активацию астроцитов преимущественно в каудальном направлении от эпицентра ТСМ аналогично тому, что было обнаружено нами в исследованиях на крысах, хоть и в меньшей степени. Снижение активации астроцитов можно связать с возможностью МСК влиять на уровень циклооксигеназы-2 и IL-6 в сторону их понижения (Liu et al., 2018; Sun et al., 2018), а также секрецию индуцируемого TNF белка гена 6 (Song et al., 2017; Chaubey et al., 2018), который уменьшает NF-кБ сигналинг, модулирующий A1 нейровоспалительные астроциты (Lian et al., 2015; Liddelow et al., 2017).

8. Цитокиновый профиль в области повреждения и сыворотке крови на фоне травмы спинного мозга крыс и аппликации аллогенных мезенхимных стволовых клеток жировой ткани

Оценка цитокинового профиля в области ТСМ на 3, 7 и 14 сутки после повреждения и до проведения клеточной терапии установила значительное изменение концентрации следующих анализов IL-1 α , IL-2, IL-5, IL-18, GM-CSF, IL-17 α , IFN- γ , IL-10, IL-13, MCP-1 и GRO KC по сравнению с интактным спинным мозгом (рис. 10). Наибольшие изменения касались IL-17 α , уровень которого был снижен в 6,6 раза ($P < 0,05$) на 3 сутки после ТСМ по сравнению с интактным контролем. На 7 и 14 сутки концентрация IL-17 α незначительно повышалась, не достигая исходного уровня. На фоне проведенной аппликации МСК-ЖТ уровень IL-17 α повысился в 4,5 раза ($P < 0,01$) на 3 сутки терапии при сравнении с контрольной группой ФМ, достигнув уровня интактного контроля.

Оценка цитокинового профиля в сыворотке крови на 3, 7 и 14 сутки после ТСМ установила значительное изменение концентрации следующих анализов IL-1 β , IL-2, MCP-1, RANTES, IL-5 и IL-1 α по сравнению с интактным спинным мозгом (рис. 10). При этом наибольшие изменения касались IL-1 β , концентрация которого на 3 сутки после ТСМ была снижена в ~7 раз ($P < 0,05$) по отношению к интактному контролю. Повышение уровня IL-1 β было обнаружено в последующем на 14 сутки в 1ой контрольной группе ФМ без клеточной терапии, где данный показатель был в ~3 раза больше ($P < 0,05$) при сравнении с аппликацией МСК-ЖТ.

Таким образом, в данном исследовании мы оценили цитокиновый профиль в сыворотке крови и спинном мозге крыс на модели дозированной контузионной ТСМ в остром и раннем периодах после повреждения, а также в отсроченный промежуток времени на фоне

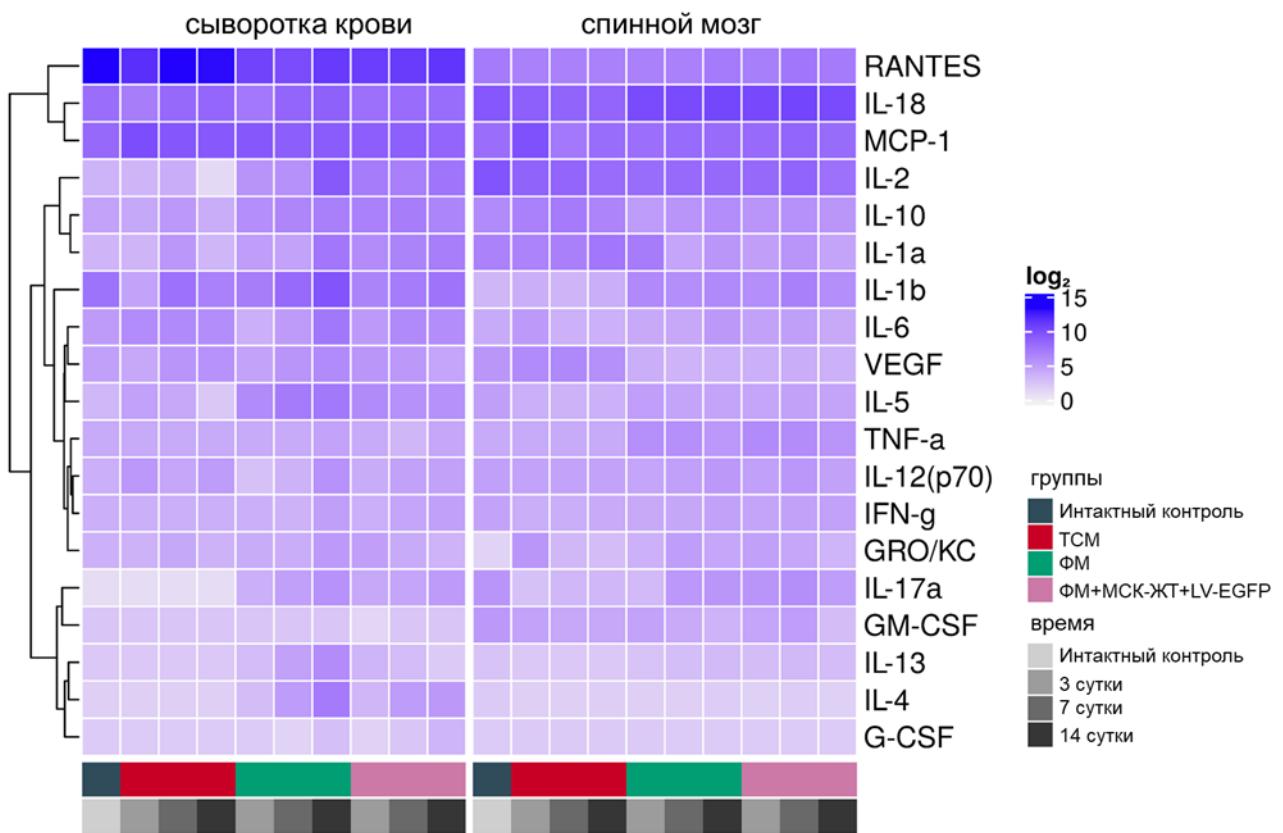


Рисунок 10. Тепловая карта, показывающая \log_2 данные цитокинового профиля в сыворотке крови и спинном мозге интактных и травмированных крыс. Цитокиновый профиль оценивали на 3, 7 и 14 сутки после повреждения или проведения терапии. Слева показана дендрограмма, полученная в результате иерархической кластеризации цитокинов.

аппликации МСК-ЖТ. Наше исследование показало, что воспалительная реакция и иммuno-логический ответ после ТСМ не ограничивались ЦНС, а были широко распространены, что подтверждено изменениями цитокинового профиля, обнаруженными в образцах сыворотки крови.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для осуществления эффективного стимулирования нейрорегенерации – главной цели клеточной и генно-клеточной терапии ТСМ, важно обеспечить максимально длительное присутствие в повреждённой ткани трансплантируемых клеток и доставляемых ими трофических и протективных факторов. Полученные в ходе исследования результаты подтверждают тот факт, что генетически модифицированные Ad5-VEGF и Ad5-GDNF МККП человека, интраспинально трансплантированные в острый период ТСМ крысы, обладают выраженным миграционным потенциалом, сохраняют жизнеспособность и возможность экспрессии продуктов рекомбинантных генов до 30 суток, а также преимущественно присутствуют в сохранной ткани и вдоль нервных волокон. Схожие характеристики по выживаемости были впервые показаны и для микроглии, интраспинально трансплантированной в острый период

ТСМ. Основные цитогенетические процессы, такие как жизнеспособность трансплантируемых клеток, их миграционный потенциал и самоподдержание контролируются многочисленными молекулярными сигналами из их микроокружения. В этой связи обнаруженная жизнеспособность МККП и микроглии на протяжении 30 суток в области повреждения, когда стремительно развиваются патологические реакции вторичного повреждения, представляет-
ся значительно высокой.

Помимо стандартного варианта введения клеток (интраспинальная инъекция), был апробирован новый способ трансплантации МСК, заключающийся в их аппликации на область повреждения в составе ФМ. При этом для трансплантации клеток был выбран подострый период ТСМ, что обусловлено технической возможностью проведения аппликации аутологичных МСК в клинической практике при наличии хирургических показаний к повторной операции. Нами впервые получены результаты, свидетельствующие о том, что МСК-ЖТ, МСК-КМ и МСК-ПЗ при их аппликации в подострый период на область ТСМ крыс сохраняют жизнеспособность до 60 суток, демонстрируют тропность к серому веществу и преимущественную миграцию через задние корешки спинного мозга, располагаясь в сером и белом веществе на расстоянии до 5 мм в обоих направлениях от эпицентра повреждения. При этом аналогичный вариант трансплантации МСК-ЖТ при ТСМ свиней подтверждает полученные результаты на крысах по тропности к серому веществу и распределению клеток в ткани и свидетельствует об их преобладающей миграции в ростральном направлении от эпицентра повреждения. Увеличение сроков выживания трансплантируемых МСК открывает возможность для проведения клеточной терапии не только в острой фазе, но также имеет значение для преодоления последствий ТСМ на более отдалённых сроках у хронических больных. Не исключено, что жизнеспособность МСК могла быть увеличена за счёт поддерживающего влияния ФМ, создающего для трансплантированных клеток специфическое микроокружение, соответствующее естественному (Yousefifard et al., 2019).

В ходе исследования показано, что трансплантация в область ТСМ крысы генетически модифицированных Ad5-VEGF и Ad5-GDNF МККП человека стимулирует восстановление двигательной функции, что коррелирует с улучшением сохранности ткани, снижением реактивности астроцитов и усилением роста аксонов. Полученные результаты можно объяснить действием на клетки-мишени в области повреждения нейротрофических и ангиогенных факторов VEGF и GDNF, сверхэкспрессия которых достигалась за счет генетической модификации МККП. Увеличение эффективности генно-клеточной терапии в данном случае, связанное со сверхэкспрессией GDNF и VEGF при ТСМ, может быть опосредовано (1) поддерживающим влиянием этих факторов на выживание двигательных и чувствительных нейронов

путём сдерживания апоптоза (Sondell et al., 1999; Cheng et al., 2002), (2) стимулированием нейрогенеза и роста аксонов (Zhang et al., 2009; Mackenzie & Ruhrberg, 2012), (3) усилением неоваскуляризации и пролиферации нейральных стволовых клеток (Facchiano et al., 2002; Jin et al., 2009).

Особый интерес представляют полученные данные по влиянию трансплантированных МККП на популяцию ШК в области повреждения с предварительным определением наиболее специфичных молекулярных детерминант для данных клеток и периферического миелина. Полученные в ходе исследования результаты демонстрируют положительное влияние трансплантации МККП на миграционный потенциал ШК и сохранность Р0⁺-миелина. Однако указывают на то, что субпопуляция миelinобразующих ШК в области ТСМ является, по всей видимости, мишенью поддерживающего влияния фактора трансплантации МККП, а не доставки терапевтических генов. Показанное раннее увеличение числа ШК в области ТСМ при доставке гена *vegf* или *gdnf* (Iwase et al., 2005; Muratori et al., 2018), не приводит к аналогичному эффекту в случае комбинированной доставки указанных генов при помощи МККП. В свою очередь это наводит на мысль не только об отсутствии синергетического эффекта *vegf* и *gdnf* на ШК, но и о возможном антагонизме со стороны этих молекул применительно к данным клеткам.

Вторая часть данного исследования была основана на использовании GDNF в качестве мощного ингибитора фагоцитарной активности микроглии и оценки ее эффективности с целью стимулирования регенерации при ТСМ. Предполагается, что усиление акцепторных и фагоцитарных свойств микроглии приводит к раннему разрешению начальных травматических событий, что может улучшить долгосрочный структурный и функциональный результат (Redondo-Castro et al., 2013). Чтобы проверить эту гипотезу, мы трансплантировали генетически модифицированную Ad5-EGFP или Ad5-GDNF микроглию в область ТСМ крыс с предварительным подтверждением изменения морфологии и снижения фагоцитарной активности данных клеток при опосредованном влиянии GDNF *in vitro*. Проведенные нами эксперименты показали, что трансплантация в область ТСМ крысы микроглии, трансдуцированной Ad5-GDNF, способствует улучшению двигательной функции, но не приводит к увеличению сохранности ткани при сравнении с инъекцией тех же клеток, трансдуцированных аналогичным вектором с репортерным геном *egfp*. Полученные данные могут быть объяснены более поздним разрешением начальных посттравматических реакций ведущих к ухудшению долгосрочных структурных показателей в случае ослабления фагоцитарных свойств микроглии (Redondo-Castro et al., 2013; Fu et al., 2014).

В ходе проведения молекулярного и иммуногистохимического анализа нами подтверждена важная роль GDNF в поддержании выживаемости микроглии. Эти данные согласуются с полученными ранее, где показано, что GDNF после связывания с GFR α 1 может увеличивать выживаемость микроглии за счёт активации RET сигнализации (Marco et al., 2002). Помимо этого, проведённое нами исследование показало, что микроглия имеет значительное влияние на популяцию реактивных астроцитов. Полученные результаты согласуются с результатами Hamanoue и соавт. (2015), показавшими возможность активированной эндогенной микроглии при ТСМ приводить к значительной редукции глиального рубца. Таким образом, GDNF-опосредованная модуляция микроглии приводит к снижению фагоцитарной активности самих клеток за счёт аутокринного действия и реактивности астроцитов посредством паракринного влияния. Обозначенные выше эффекты в острый период ТСМ с учётом более позднего разрешения начальных посттравматических реакций и компенсаторной функции глиального рубца в этот период представляются лимитирующими для нейрорегенерации. В этой связи применение генетически модифицированной Ad5-GDNF микроглии при ТСМ не несёт в себе значимый терапевтический потенциал, однако поиск методов модуляции данных клеток в сторону нейропротективного фенотипа остаётся перспективным направлением исследований.

Третья часть нашего исследования была посвящена применению МСК, как наиболее перспективного материала для стимулирования нейрорегенерации при ТСМ, что связано с их высокой биобезопасностью, иммуномодулирующими свойствами, способностью синтезировать нейротрофические и проангидогенные факторы, способствуя выживанию и регенерации нейронов, росту аксонов и новых кровеносных сосудов (Laroni et al., 2015; Qu & Zhang et al., 2017; Khan S. et al., 2018). Различные дозировки МСК и варианты их трансплантаций, даже в условиях многократного введения, не вызывают токсичности и не индуцируют образование опухоли у животных и человека (Ra et al., 2011; Barkholt et al., 2013; Rengasamy et al., 2016). Тем не менее, до сих пор существует необходимость раскрытия клеточных и молекулярных механизмов, посредством которых МСК улучшают исход заболевания. Помимо этого, методы и источники получения МСК, а также условия их культивирования могут иметь значимое влияние на метаболический и секреторный профиль конечного клеточного продукта. А поскольку терапевтический эффект МСК обусловлен паракринным механизмом их действия, отдельное внимание уделяется такому важному аспекту как сохранение жизнеспособности МСК и оптимальной доставки ими секрецируемых терапевтических факторов в область ТСМ.

С целью решения вышеобозначенных проблем и поиска ответов на нераскрытые вопросы нами была проведена аллогенная аппликация на область повреждения спинного мозга крысы заключенных в ФМ МСК, полученных из трёх различных источников – жировой ткани, костного мозга и пульпы зуба. Сравнительная оценка терапевтической эффективности данных клеток при ТСМ показала, что применение МСК-ЖТ в сочетании с ФМ в подостром периоде повреждения стимулирует посттравматическую регенерацию в большей степени по сравнению с аппликацией МСК-КМ и МСК-ПЗ. Данный вывод подтверждается наличием лучших показателей в группе МСК-ЖТ по следующим критериям: (1) восстановления двигательной активности и проводимости по нервным волокнам, подтвержденное функциональными и электрофизиологическими данными, (2) улучшения сохранности ткани и уменьшения посттравматической кавитации, (3) модуляции активации микроглии и астроцитов.

Механизмы, которые опосредуют наиболее значимый терапевтический эффект МСК-ЖТ при ТСМ по сравнению с МСК-КМ и МСК-ПЗ, еще предстоит полностью выяснить. Однако биологические преимущества в отношении таких критических факторов, как пролиферативная активность, жизнеспособность клеток, качественный и количественный состав секреции белков и их иммуномодулирующие эффекты были показаны нами, а также ранее проведенными исследованиями (Li et al., 2015; Takahashi et al., 2018). Наши данные впервые показывают, что нанесение МСК в сочетании с ФМ на поверхность спинного мозга в подострый период ТСМ может быть эффективным и безопасным способом доставки клеток в повреждённую область.

В ходе исследования мы также оценили терапевтическую эффективность аутологичных МСК-ЖТ в подостром периоде ТСМ свиньи, моделируя условия для экстраполяции в клиническую практику. Предварительно мы максимально приблизили степень травмы и экспериментальные условия к тем, которые использовали на грызунах, чтобы провести сравнительную оценку. Полученные результаты на свиньях продемонстрировали частичное воспроизведение результатов, наблюдавшихся на крысах, и включали: (1) восстановление соматосенсорных путей спинного мозга; (2) увеличение сохранности ткани и уменьшение посттравматической кавитации, (3) снижение активации астроцитов в области DREZ.

Нейрорегенераторный потенциал в сформированном спинном мозге, по-видимому, различается у мелких и крупных животных, а также людей, что зачастую не позволяет достичь оптимального клинического результата при попытках экстраполяции доклинических исследований клеточной терапии при ТСМ. Наша работа показала, что аппликация на область ТСМ в подострый период МСК-ЖТ может стимулировать универсальные для крыс и

свиней механизмы регенерации нервной ткани. Таким образом, полученные результаты на крупных животных (свиньях) подтверждают предшествующие исследования на крысах и перспективность экстраполяции данного варианта клеточной терапии пациентам, страдающим параличием вследствие ТСМ.

Важной составляющей нашего исследования является оценка цитокинового профиля на фоне ТСМ крыс и аппликации МСК. Цитокиновый дисбаланс, развивающийся после ТСМ, приводит к его прогрессированию за счёт образования множества новых «цитокиновых каскадов», определяющих усиление и пролонгацию патологических сдвигов, и запуск так называемых «порочных кругов», ведущих к системным осложнениям (Konyuchenko et al., 2014; Kothur et al., 2016). В этой связи, проведение расширенного мультиплексного анализа цитокинового профиля актуально для определения путей модуляции посттравматических реакций в ЦНС. Наше исследование показало, что воспалительная реакция и иммунологический ответ после ТСМ не ограничивается ЦНС и широко распространены. Этот факт подтверждён изменениями цитокинового профиля на уровне экспрессии IL-1 β , IL-2, MCP-1, RANTES, IL-5 и IL-1 α в образцах сыворотки крови в разные посттравматические периоды. В тоже время, были обнаружены локальные изменения (в области повреждения), сопровождающиеся иммунорегуляторным дисбалансом на уровне не менее 11 цитокинов. Нами также установлено, что к локальным и системным изменениям цитокинового профиля способна приводить аппликации МСК-ЖТ в подострый период ТСМ, хотя в меньшей степени нежели сам факт приложения травмирующей силы. Таким образом, представляется важным дальнейшее исследование сложного дисбаланса цитокиновой сети после ТСМ с определением возможной корреляции со степенью повреждения и клиническим исходом. Дальнейшие исследования в данном направлении позволят лучше понять роль цитокинов в патофизиологии заболевания, установить новые терапевтические мишени и биомаркеры, потенциально имеющие прогностическое значение и способные помочь врачу в выборе оптимальной стратегии терапии.

ВЫВОДЫ

- Генетически модифицированные адено-вирусными векторами Ad5-VEGF и Ad5-GDNF мононуклеарные клетки крови пуповины человека, интраспинально трансплантированные в острый период травмы спинного мозга крысы, сохраняют жизнеспособность и возможность экспрессии продуктов рекомбинантных генов до 30 суток, располагаются преимущественно в сохранной ткани и вдоль нервных волокон на расстоянии до 10 мм в обоих направлениях от эпицентра повреждения.

2. Трансдуцированные аденоовирусным вектором Ad5-EGFP клетки микроглии, интраспинально трансплантированные в острый период травмы спинного мозга крысы, сохраняют жизнеспособность до 30 суток, располагаясь преимущественно вокруг небольших полостей на расстоянии до 4 мм в обоих направлениях от эпицентра повреждения.

3. Генетически модифицированные лентивирусным вектором LV-EGFP мезенхимные стволовые клетки, полученные из жировой ткани, костного мозга или пульпы зуба, при их аллогенной аппликации в подострый период на область травмы спинного мозга крыс сохраняют жизнеспособность до 60 суток, демонстрируют тропность к серому веществу и преимущественную миграцию через задние корешки спинного мозга, располагаясь в сером и белом веществе на расстоянии до 5 мм в обоих направлениях от эпицентра повреждения. Аналогичный вариант аутологичной трансплантации мезенхимных стволовых клеток жировой ткани при травме спинного мозга свиней подтверждает полученные результаты на крысах по тропности к серому веществу и распределению клеток в нервной ткани, а также свидетельствует об их преобладающей миграции в ростральном направлении от эпицентра повреждения.

4. Интраспинальная инъекция в острый период травмы спинного мозга крысы мононуклеарных клеток крови пуповины человека, трансдуцированных аденоовирусными векторами Ad5-VEGF и Ad5-GDNF, стимулирует нейрорегенерацию, что подтверждается улучшением двигательной функции и сохранности нервной ткани, стабилизацией уровня рефлекторной возбудимости спинальных мотонейронов, снижением реактивности астроцитов, усиливанием роста аксонов и экспрессии маркерных белков Шванновских клеток.

5. Трансдукция аденоовирусным вектором Ad5-GDNF первичной культуры клеток микроглии способствует уменьшению их фагоцитарной активности.

6. Интраспинальная трансплантация в острый период травмы спинного мозга крысы клеток микроглии, трансдуцированных аденоовирусным вектором Ad5-GDNF, способствует восстановлению двигательной функции, но не приводит к улучшению сохранности нервной ткани.

7. Трансдукция лентивирусным вектором LV-EGFP мезенхимных стволовых клеток жировой ткани свиньи не оказывает значимого влияния на их фенотип и экспрессию цитокинов, не приводит к существенным сдвигам дифференцировки в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях и незначительно снижает жизнеспособность клеток до 93±1% на 3 день после генетической модификации.

8. При проведении аппликации на область контузионного повреждения спинного мозга крысы мезенхимных стволовых клеток, полученных из жировой ткани (МСК-ЖТ), кост-

ного мозга (МСК-КМ) и пульпы зуба (МСК-ПЗ) эффективность нейрорегенерации возрастает в следующем ряду, учитывая критерии восстановления двигательной функции и проводимости по нервным волокнам, уменьшения посттравматической кавитации и увеличения сохранности нервной ткани, снижения активации астроцитов и микроглии, увеличения экспрессии мРНК гена, ассоциированного с ростом аксонов: МСК-КМ → МСК-ПЗ → МСК-ЖТ.

9. Аппликация аутологичных мезенхимных стволовых клеток жировой ткани в подострый период контузионной травмы спинного мозга свиньи стимулирует восстановление соматосенсорных путей спинного мозга, улучшает сохранность нервной ткани и снижает активацию астроцитов в области вхождения задних корешков.

10. Травма спинного мозга крысы приводит к развитию воспалительных реакций и иммунологического ответа, не ограничивающихся центральной нервной системой. Значительные локальные изменения (в области повреждения) обнаружены в экспрессии IL-1 α , IL-2, IL-5, IL-18, GM-CSF, IL-17 α , IFN- γ , IL-10, IL-13, MCP-1 и GRO KC на 3, 7 и 14 сутки после травмы спинного мозга. В этот же период установлено значительное изменение концентраций IL-1 β , IL-2, MCP-1, RANTES, IL-5 и IL-1 α на системном уровне (в сыворотке крови). Аллогенная аппликация мезенхимных стволовых клеток жировой ткани в подострый период контузионной травмы спинного мозга крысы способствует локальным изменениям в виде снижения экспрессии IL-1 α и IL-6, повышения уровня IL-17 α и IL-1 β , а также системным изменениям – снижению экспрессии IL-13, GRO KC и IL-1 β .

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Mukhamedshina Y. Improving Culture Conditions, Proliferation, and Migration of Porcine Mesenchymal Stem Cells on Spinal Cord Contusion Injury Model in vitro / Y. Mukhamedshina, M. Zhuravleva, M. Sergeev, E. Zakirova, O. Gracheva, D. Mukhutdinova, A. Rizvanov // Cells Tissues Organs. – 2021. Jan 28. P.1-12.

2. Ebrahim N. Genetic Modification of Mesenchymal Stem Cells for Neurological Disease Therapy: What Effects Does it Have on Phenotype/Cell Behavior, Determining Their Effectiveness? / N. Ebrahim, V James, A Rizvanov, Y Mukhamedshina // Mol Diagn Ther. – 2020. – 24(6). P.683-702.

3. Mukhamedshina Y. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Spinal Cord Contusion: A Comparative Study on Small and Large Animal Models / Y. Mukhamedshina, I. Shulman, S. Ogurcov, A. Kostennikov, E. Zakirova, E. Akhmetzyanova, A. Rogozhin, G. Masgutova, V. James, R. Masgutov, I. Lavrov, A. Rizvanov // Biomolecules. – 2019. – 9(12): 811.

4. Mukhamedshina Y. Mesenchymal stem cells and the neuronal microenvironment in the area of spinal cord injury / Y. Mukhamedshina, O. Gracheva, D. Mukhutdinova, Y. Chelyshev, A. Rizvanov // Neural Regen Res. – 2019. – 14(2): 227.

5. Akhmetzyanova E. Transplantation of Microglia in the Area of Spinal Cord Injury in an Acute Period Increases Tissue Sparing, but Not Functional Recovery / E. Akhmetzyanova, Y. Mukhamedshina, M. Zhuravleva, L. Galieva, A. Kostennikov, E. Garanina, A. Rizvanov // Front Cell Neurosci. – 2018. – 12: 507.

6. Mukhamedshina Y. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Application Combined With Fibrin Matrix Promotes Structural and Functional Recovery Following Spinal Cord Injury in Rats / Y. Mukhamedshina, E. Akhmetzyanova, A. Kostennikov, E. Zakirova, L. Galieva, E. Garanina, A. Rogozin, A. Kiassov, A. Rizvanov // Front Pharmacol. – 2018. – 9:343.
7. Galieva, L. Influence of Genetically Modified Human Umbilical Cord Blood Mononuclear Cells on the Expression of Schwann Cell Molecular Determinants in Spinal Cord Injury / L. Galieva, Y. Mukhamedshina, E. Akhmetzyanova, Z. Gilazieva, S. Arkhipova, E. Garanina, A. Rizvanov // Stem Cells Int. – 2018. P.1-11.
8. Mukhamedshina Y. Distribution and Survival of Transplanted Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in the Spinal Cord Injury / Y. Mukhamedshina, E. Zakirova, L. Galieva, A. Kostennikov, E. Akhmetzyanova, A. Rizvanov // BionanoScience. – 2017. – 7(4). P.608-612.
9. Galieva L. Human Umbilical Cord Blood Cell Transplantation in Neuroregenerative Strategies / L. Galieva, Y. Mukhamedshina, S. Arkhipova, A. Rizvanov // Front Pharmacol. – 2017. – 8: 628.
10. Mukhamedshina Y. Systemic and Local Cytokine Profile following Spinal Cord Injury in Rats: A Multiplex Analysis / Y. Mukhamedshina, E. Akhmetzyanova, E. Martynova, S. Khaiboullina, L. Galieva, A. Rizvanov // Front Neurol. – 2017. – 8:581.
11. Mukhamedshina Y. Electrophysiological, Morphological, and Ultrastructural Features of the Injured Spinal Cord Tissue after Transplantation of Human Umbilical Cord Blood Mononuclear Cells Genetically Modified with the VEGF and GDNF Genes / Y. Mukhamedshina, Z. Gilazieva, S. Arkhipova, L. Galieva, E. Garanina, A. Shulman, G. Yafarova, Y. Chelyshev, N. Shamsutdinova, A. Rizvanov // Neural Plast. – 2017. – 2017. P.1-12.
12. Мухамедшина Я. Применение с целью стимулирования регенерации спинного мозга мезенхимальных стволовых клеток, заключенных в фибриновый матрикс / Я. Мухамедшина, С. Огурцов, И. Шульман, Е. Закирова // Российский нейрохирургический журнал имени профессора А.Л. Поленова. – 2017. С.176.
13. Mukhamedshina Y. Structural and functional effects of adipose derived mesenchymal stem cells in a fibrin matrix application in pigs with subacute spinal cord injury / Y. Mukhamedshina, E. Zakirova, A. Kostennikov, S. Ogurtsov, I. Shulman, R. Masgutov, A. Rizvanov // ESGCT XXV Anniversary Congress in Collaboration with the German Society for Gene Therapy. – 2017. P.A95.
14. Мухамедшина Я. Влияние на функциональные и структурные параметры травмированного спинного мозга свиньи апликации на область повреждения мезенхимных стволовых клеток, заключенных в фибриновый матрикс / Я. Мухамедшина, А. Костенников, И. Шульман, С. Огурцов, Е. Закирова // X Всероссийский конгресс молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия-2017». – 2017. С. 48-49.
15. Мухамедшина Я. Клеточные подходы к терапии травматической болезни спинного мозга: доклинические исследования на крупных животных (свиньи) / Я. Мухамедшина, И. Шульман, С. Огурцов, А. Костенников, Е. Закирова, Р. Масгутов, Г. Масгутова, А. Ризванов // Гены & клетки. – 2017. – 12(3). С.172-173.
16. Ахметзянова Э. Изменения цитокинового профиля на фоне генно-клеточной терапии травматической болезни спинного мозга / Э. Ахметзянова, Я. Мухамедшина, Е. Мартынова, Л. Галиева, М. Журавлева // VI Международная научно-практическая конференция «Новые концепции механизмов воспаления, аутоиммунного ответа и развития опухоли. – 2017. С. 70.
17. Санатова Э. Влияние трансплантации клеток микроглии в область нейротравмы на структурные и функциональные показатели / Э. Санатова, М. Журавлева, Л. Галиева,

Я. Мухамедшина // Тезисы докладов международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016». – 2016. С. 205.

18. Ахметзянова Э. Влияние глиального нейротрофического фактора на морфологию, пролиферативную и фагоцитарную активность клеток микроглии / Э. Ахметзянова, М. Журавлева, Я. Мухамедшина, А. Ризванов // Сборник тезисов международной конференции трансляционная медицина. – 2016. С.12.

19. Экспрессия мРНК генов периферического миелина в травмированном спинном мозге крыс // Л. Галиева, Е. Гаранина, Э. Санатова, Я. Мухамедшина. // Сборник тезисов V Молодежной конференции по молекулярной и клеточной биологии. – 2016. С. 84-85.

20. Mukhamedshina Y. Assessment of Glial Scar, Tissue Sparing, Behavioral Recovery and Axonal Regeneration following Acute Transplantation of Genetically Modified Human Umbilical Cord Blood Cells in a Rat Model of Spinal Cord Contusion / Y. Mukhamedshina, E. Garanina, G. Masgutova, L. Galieva, E. Sanatova, Y. Chelyshev, A. Rizvanov // PLoS One. – 2016. – 11(3): e0151745.

21. Mukhamedshina Y. Genetically modified human umbilical cord blood cells as a promising strategy for treatment of spinal cord injury / Y. Mukhamedshina, A. Rizvanov // Neural Regen Res. – 2016. – 11(9). P.1420-1421.

22. Zhuravleva M. Effect of GDNF on Morphology, Proliferation, and Phagocytic Activity of Rat Neonatal Cortex Isolated Microglia / M. Zhuravleva, A. Rizvanov, Y. Mukhamedshina // BionanoScience. – 2016. – 6(4). P.379-383.

23. Журавлева, М. Морфофункциональная характеристика микроглии на разных сроках культивирования и при трансплантации в область травмы спинного мозга крыс / М. Журавлева, Я. Мухамедшина, С. Архипова, Э. Санатова, А. Ризванов // Гены & Клетки. – 2015. – 10(4). С. 34-39.

24. Mukhamedshina, Y.O. Genetically modified human umbilical cord blood cells for stimulate posttraumatic regeneration of the spinal cord / Y. Mukhamedshina, E. Garanina, S. Arkhipova, A. Rizvanov // Abstract book of 18th Symposium for biology students in Europe. – Alexandroupoli, 2015. P. 35.

Патент

1. Патент Российской Федерации на изобретение №2650638 «Способ стимулирования регенерации спинного мозга с помощью мезенхимальных стволовых клеток, заключенных в фибриновый матрикс». Зарегистрирован 16.04.2018. Авторы: **Мухамедшина Я.О.**, Масгутов Р.Ф., Масгутова Г.А., Шульман И.А., Огурцов С.В., Закирова Е.Ю., Журавлева М.Н., Ризванов А.А.

Список сокращений

ДВП – двигательные вызванные потенциалы

КТСМ – контузионная травма спинного мозга

МККП – мононуклеарные клетки крови пуповины

МСК – мезенхимные стволовые клетки

МСК-ЖТ – мезенхимные стволовые клетки жировой ткани

МСК-КМ – мезенхимные стволовые клетки костного мозга

МСК-ПЗ – мезенхимные стволовые клетки пульпы зуба

НТФ – нейротрофические факторы

ССВП – соматосенсорные вызванные потенциалы

ТСМ – травма спинного мозга

ФМ – фибриновый матрикс

ЦНС – центральная нервная система

ШК – Шванновские клетки

Amax – амплитуда М-ответа

Amiddle – средняя амплитуда
Ad5 – аденоовирус 5 серотипа
СС – центральный канал
CGRP – пептид, связанный с геном кальцитонина
CST – кортикоспинальный тракт
DAPI – 4',6-диамино-2-фенилиндол
DF – дорсальные канатики
DH – дорсальные рога
DMEM – среде игла в модификации Dulbecco
DPBS – фосфатно-солевой буфер Dulbecco
DREZ – область вхождения задних корешков
EGFP – усиленный зелёный флуоресцентный белок
FBS – эмбриональная телячья сыворотка
GAP43 – связанный с ростом белок 43
G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
GDNF – глиальный нейротрофический фактор
GFAP – глиальный фибрillлярный кислый белок
HNu – ядерный антиген человека
Hmax – амплитуда Н-ответа
HSPA1b – белок теплового шока 1b
Iba1 – ионизированная кальций связывающая адаптерная молекула 1
IL – интерлейкин
LF – латеральные канатики
LP – латентный период
LV – лентивирус
MOI – множественность инфицирования
PBS – фосфатно-солевой буфер
PDGF β R – бета рецептор тромбоцитарного фактора роста
Peripherin – белок периферического миелина
P0 – белок периферического миелина
p75 – низкоаффинный рецептор фактора роста нервов
RT – комнатная температура
VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста
VF – вентральные канатики
VH – передние рога