

На правах рукописи



СОКОЛОВ МИХАИЛ ЕВГЕНЬЕВИЧ

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ОБЛАСТИ ИШЕМИИ
КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ В УСЛОВИЯХ ОДНОВРЕМЕННОЙ ДОСТАВКИ
ГЕНОВ СОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА, ГЛИАЛЬНОГО
НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА И НЕЙРОНАЛЬНОЙ МОЛЕКУЛЫ КЛЕТОЧНОЙ
АДГЕЗИИ**

03.03.04 - Клеточная биология, цитология, гистология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Казань - 2020

Работа выполнена на кафедре оперативной хирургии и топографической анатомии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель: **Исламов Рустем Робертович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой медицинской биологии и генетики ФГБОУ ВО "Казанский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Официальные оппоненты:

Ермолин Игорь Леонидович, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии с цитологией и эмбриологией ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

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

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научный центр неврологии" Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Защита диссертации состоится «23» сентября 2020 г. в 15:00 часов на заседании диссертационного совета КФУ.03.06 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420015, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 76, в зале заседания ученого совета (ауд.208).

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

Автореферат разослан « » _____ 2020 г.

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



Т.А. Аникина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Свойство нейропластичности как одно из проявлений нейрорегенерации было впервые описано Сантьяго Рамон-и-Кахалем в 1894 г (Santiago Ramon, 1894). Нейропластичность, или способность клеток нервной ткани адаптироваться как функционально, так и структурно в ответ на эндогенные и экзогенные воздействия, проявляется на молекулярном, клеточном и тканевом уровнях. По Thickbroom и Mastaglia нейропластичность обеспечивают нейрональные и ненейрональные механизмы, при этом нейрональная пластичность может проявляться как в синаптической, так и в несинаптической формах (Thickbroom, et al., 2009). Одним из важных компонентов, обеспечивающих нейропластичность, является нейропротекция, поддерживающая жизнеспособность нервных клеток, их морфологическую и функциональную целостность благодаря различным механизмам, в том числе через нейротрофические взаимодействия, с участием гуморальных нейротрофических факторов. Вот почему современная стратегия, направленная на сдерживание гибели нейронов при нейротравмах и инсультах головного мозга и при разнообразных нейродегенеративных заболеваниях таких, как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз, во многом основана на применении нейротрофических факторов. Вместе с тем, подходы к практическому применению нейротрофических факторов в качестве терапевтического средства для сдерживания гибели нейронов и механизмы их действия пока не исследованы в достаточной степени.

Необратимые изменения в головном мозге при остром нарушении мозгового кровообращения характеризуются прогрессирующей нейродегенерацией не только в первые часы, но и в последующие сутки и даже недели. Гибель нейронов в результате некроза и апоптоза является следствием развивающихся на фоне острой ишемии воспаления, эксайтотоксичности, окислительного стресса, дисфункции митохондрий (Mărgăritescu, et al., 2009). При этом вокруг зоны с необратимыми изменениями мозга формируется область «ишемической полутени» или «пенумбра», кровоснабжение которой существенно ниже нормального уровня (Peisker, et al., 2017). Жизнеспособность клеток в области пенумбры ограничена 3-6 часовым периодом, так называемым «терапевтическим окном», в течение которого может быть успешно проведена специфическая терапия острого инсульта, которая в первую очередь направлена на восстановление кровообращения в области ишемии, поддержание метаболизма и жизнеспособности клеток мозга. В течение этого периода еще можно сдержать массовое вступление в апоптоз нейронов и клеток глиии и, таким образом, предотвратить увеличение изначальной зоны инфаркта мозга.

В России ежегодно регистрируется более 450 тысяч случаев инсульта (Скворцова, 2013). Тем не менее, несмотря на повышение эффективности современной терапии ишемического инсульта головного мозга, у многих выживших пациентов сохраняются стойкие неврологические нарушения и они становятся инвалидами. Несмотря на то, что в ЦНС изначально существуют существенные

ограничения нейрорегенерации, проблема сохранения жизнеспособности клеток нервной ткани в «ишемической полутени» диктует необходимость поиска новых эффективных, в том числе генных и клеточных подходов, к решению этих задач, а, следовательно, и к лечению инсульта, а их пока нет.

Среди активно разрабатываемых в моделях на животных стратегий сдерживания гибели нейронов при ишемических инсультах наиболее перспективной представляется терапия с использованием генных конструкций, которая предполагает доставку в область «пенумбры» рекомбинантных терапевтических генов, кодирующих нейротрофические факторы (Choong, et al., 2016). Список генов, кодирующих синтез потенциальных молекул стимуляторов нейрорегенерации, достаточно велик. Из них наиболее перспективными представляются гены, кодирующие нейротрофические факторы и факторы роста: глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротрофический фактор мозга (BDNF), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF). Нейропротективный эффект данных факторов доказан в экспериментах на животных (Garanina, et al., 2016), однако не существует однозначного, исчерпывающего ответа на вопрос, какие из этих факторов и в каких сочетаниях могут быть рекомендованы для практической медицины с целью преодоления последствий ишемического инсульта.

К другим, не менее важным, вопросам в рамках стратегии генной терапии инсульта головного мозга относится разработка технологии доставки необходимых трансгенов в пораженную область мозга. Трудности в доставке терапевтических генов в зону ишемии головного мозга являются одной из основных причин отсутствия на сегодняшний день эффективной генной терапии в лечении нейродегенеративных процессов в ЦНС, что свидетельствует о необходимости разработки принципиально новых способов решения этих задач.

На сегодняшний день после моделирования ишемического инсульта в качестве носителей трансгенов применяют разнообразные стволовые и дифференцированные клетки, которые трансплантируют в нервную ткань с терапевтической целью (Gowing, et al., 2017). Вместе с тем, ввиду недостаточной изученности способов доставки терапевтических генов на клеточных носителях, однозначно рекомендованного для этих целей клеточного типа и приемлемого способа на сегодняшний день не существует (Savitz, et al., 2011).

Наиболее перспективными в качестве клеток-носителей терапевтических генов являются мононуклеарные клетки крови пуповины (МККП) ввиду их пригодности как для алло-, так и для аутотрансплантации у человека, низкой иммуногенности, доступности, простоте получения и хранения. В настоящее время МККП уже используются в ряде клинических испытаний, в частности для терапии инсульта у детей и у взрослых. И, несмотря на определенный прогресс в этой области, исследования в направлении генной и клеточной терапии инсульта головного мозга, как за рубежом, так и в России в лучшем случае доведены до стадии клинических испытаний. До сих пор остаются нерешенными такие вопросы, как дозы генных или клеточных препаратов, способы их доставки в

организм пациента, кратность и сроки введения. Таким образом, на сегодняшний день готовых, апробированных и эффективных препаратов для сдерживания гибели нейронов при инсульте в клинике пока не существует. Вот почему разработка принципиально нового класса лекарственных средств, содержащих рекомбинантные гены, кодирующие нейротрофические факторы, и способов их доставки в мозг для преодоления последствий инсульта головного мозга является крайне актуальной, как для фундаментальной, так и для практической медицины.

Цель и задачи исследования

Цель работы: молекулярная, клеточная и морфологическая характеристика нервной ткани области ишемии коры головного мозга крысы при интратекальной доставке в мозг рекомбинантных человеческих генов сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), глиального нейротрофического фактора (GDNF) и нейрональной молекулы клеточной адгезии (NCAM) в составе аденовирусных векторов или генетически модифицированных моноклеарных клеток крови пуповины человека.

В соответствии с заданной целью были поставлены **задачи**:

1. Осуществить генетическую модификацию моноклеарных клеток крови пуповины человека при помощи генного препарата, содержащего смесь рекомбинантных репликативно-дефектных аденовирусов человека 5 серотипа, несущих по-отдельности гены *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*.

2. Исследовать количественные параметры экспрессии рекомбинантных генов *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1* в моноклеарных клетках крови пуповины человека *in vitro* и *in vivo* в головном мозге крысы с моделью ишемического инсульта после интратекальной инфузии генетически модифицированных моноклеарных клеток крови пуповины, а также в клетках головного мозга экспериментальных животных после прямой доставки аденовирусных векторов, несущих целевые гены.

3. В очаге ишемии головного мозга крысы после прямого интратекального введения смеси рекомбинантных репликативно-дефектных аденовирусов, несущих по-отдельности гены *vegfl65*, *gdnf*, и *ncam1* провести морфометрический анализ и иммуногистохимическое исследование с молекулярными маркерами апоптоза (Caspase 3), клеточного стресса (Hsp70), синаптических белков (PSD95 и Synaptophysin) и глиальных клеток (GFAP, Olig2, Iba1) для оценки эффективности сдерживания последствий ишемии.

4. Морфологическими и иммуногистохимическими методами исследования оценить эффективность интратекальной доставки терапевтических генов *vegfl65*, *gdnf*, и *ncam1* с помощью генетически модифицированных моноклеарных клеток крови пуповины человека для сдерживания последствий ишемии головного мозга крысы.

Научная новизна работы

Большинство работ с применением генных конструкций для стимулирования нейрорегенерации после ишемического инсульта выполнено с применением одного гена,

экспрессирующего конкретный нейротрофический фактор. Впервые проведено исследование, в котором для стимулирования нейрорегенерации головного мозга после ишемического инсульта применялась тактика доставки в зону ишемического повреждения мозга крысы трех разных рекомбинантных генов, а именно генов, кодирующих VEGF, GDNF и NCAM в составе аденовирусного вектора человека 5 серотипа (Ad5). Все три обозначенные молекулы обладают выраженными нейропротекторными свойствами с хорошо изученными индивидуальными механизмами сдерживания вступления клеток в апоптоз, и кроме того, VEGF играет важную роль в восстановлении микроциркуляторного русла в зоне ишемии. Также впервые для сдерживания последствий ишемии головного мозга применен генно-клеточный препарат, созданный на основе моноклеарных клеток крови пуповины человека (МККП) и комбинации из трех аденовирусов человека 5 серотипа (Ad5), несущих гены сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), глиального нейротрофического фактора (GDNF) и нейрональной молекулы клеточной адгезии (NCAM). Несомненной новизной является то, что для сверхэкспрессии рекомбинантных молекул VEGF, GDNF и NCAM в генетически модифицированных МККП для трансдукции клеток была использована комбинация из трех генетических векторов в равном соотношении каждого вектора: Ad5-VEGF (1/3), Ad5-GDNF (1/3), Ad5-NCAM (1/3). При данном подходе модифицированные моноклеарные клетки обеспечивают адресную доставку терапевтических генов (в составе аденовирусных векторов) в область повреждения и выступают в роли продуцентов рекомбинантных VEGF и GDNF, а экспрессия NCAM усиливает миграцию и хоуминг генетически модифицированных клеток в ЦНС.

Научной новизной обладает также и сам способ интратекальной доставки в ЦНС комбинации терапевтических генов в составе аденовирусных векторов или с помощью МККП человека. Определенно новыми являются данные, свидетельствующие, что генетически модифицированных МККП человека, введенные интратекально через 4 часа после моделирования инсульта, сохраняют жизнеспособность и продуцируют рекомбинантные молекулы VEGF, GDNF, NCAM в течение всех трех недель эксперимента в зоне инфаркта. Таким образом, нами доказана роль МККП человека в адресной доставке рекомбинантных генов в очаг нейрорегенерации для локальной сверхпродукции нейротрофических факторов. Также научной новизной характеризуются данные о том, что аденовирусные векторы, несущие терапевтические гены, после интратекального введения животным с ишемическим инсультом через 4 часа после окклюзии средней мозговой артерии достигают зону ишемии, трансдуцируют клетки мозга и тем самым обеспечивают продукцию молекул стимуляторов нейрорегенерации.

Принципиально новыми следует признать данные о механизмах содействия нейропластичности мозга в условиях ишемии на фоне интратекальной доставки в зону ишемического повреждения рекомбинантных генов, кодирующих VEGF, GDNF, NCAM. Лучшая сохранность ткани головного мозга, меньшее количество астроцитов и клеток микроглии, что

предполагает снижение интенсивности астроглиоза, увеличенная численность олигодендроглиальных клеток, способствующих миелинизации нервных отростков, повышение экспрессии синаптических белков (PSD95 и Synaptophysin) и снижение иммуноэкспрессии Caspase 3 и Hsp70 свидетельствуют о способности мозга к частичному восстановлению.

Принципиально новыми являются результаты, свидетельствующие о более эффективном влиянии на нейропластичность мозга в условиях ишемии генетически модифицированных моноклеарных клеток, продуцирующих рекомбинантные молекулы стимуляторы нейрорегенерации, при сравнении с доставкой клонированных генов человека, кодирующих нейротрофические факторы с помощью аденовирусных векторов.

Научно-практическая значимость работы

На сегодняшний день готовых, апробированных и эффективных клеточных препаратов, содержащих рекомбинантный генетический материал, для стимулирования нейрорегенерации непосредственно, или в комбинации, с каким-либо другим видом терапии, не существует. Данные настоящего исследования о создании такого генного препарата могут служить основой для разработки принципиально нового класса лекарственных средств, содержащих генетический материал, для лечения ряда социально-значимых заболеваний мозга человека. Полученные нами результаты по применению генно-клеточного препарата на основе МККП человека и аденовирусного вектора (Ad5), несущего рекомбинантные гены, кодирующие VEGF, GDNF и NCAM, дают основание начать доклинические испытания инновационного препарата для сдерживания гибели нейронов и стимулирования нейрорегенерации при нейродегенеративных заболеваниях, нейротравмах и ишемических инсультах. Значимыми для этих целей являются данные о сроках, дозах, кратности и способе введения генетически модифицированных МККП или аденовирусных векторов, несущих рекомбинантные гены человека. Таким образом, результаты исследования имеют важное значение, как для фундаментальной, так и для практической медицины.

Положение, выносимое на защиту:

Инtrateкальное введение в спинномозговую жидкость сочетания рекомбинантных генов *vegfl65*, *gdnf*, и *ncam1*, а также их доставка при помощи генетически модифицированных моноклеарных клеток крови пуповины сдерживает развитие негативных постишемических сдвигов в коре головного мозга.

Степень достоверности и апробация работы

Методы, выбранные для исследования, а также технические способы их решения современны, соответствуют мировому уровню и поставленным задачам. Используемые в работе молекулярно-генетические, иммунофлуоресцентные, морфометрические, гистологические и статистические методы исследования подтверждают достоверность полученных данных. Результаты диссертационного исследования были доложены на 89-ой Всероссийской научно-практической Конференции студентов и молодых ученых (Казань, 2015г.), 90-ой Всероссийской

научно-практической Конференции студентов и молодых ученых, (Казань, 2016 г.), 24-ой Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2017г.), III Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2017г.), 26th Annual Congress of The European Society of Gene and Cell Therapy (Лозанна, Швейцария, 2018г.).

Личный вклад автора

Диссертант принимал личное участие в планировании и проведении экспериментальной работы. Все имеющиеся результаты, выводы и положения, выносимые на защиту, выполнены при личном участии автора. Соискатель лично подготавливал к печати тезисы и статьи по теме диссертации, текст работы написан автором самостоятельно.

По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, из них 2 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК и 5 статей Scopus.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертационная работа содержит 149 страниц печатного текста, состоит из 9 глав, а именно введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение результатов, заключение, выводы, список литературы и список сокращений. Диссертация включает в себя 4 таблицы, 22 рисунка. Список литературы содержит 285 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Рекомбинантные репликативно-дефектные вирусные векторы, несущие ген нейрональной молекулы адгезии (*ncam1*), ген сосудистого эндотелиального фактора роста (*veg165*), ген глиального нейротрофического фактора (*gdnf*) и ген репортерного зеленого флуоресцирующего белка (*gfp*) получены на основе аденовируса человека 5 серотипа (Ad5) с использованием клеточной культуры почек эмбриона человека НЕК 293 (Human Embryonic Kidney 293), модифицированной для наращивания рекомбинантных репликативно-дефектных вирусных векторов в Национальном исследовательском центре эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва).

Для доставки в ЦНС трех рекомбинантных генов (*veg165*, *gdnf* и *ncam1*) готовили генный препарат, содержащий три аденовирусных вектора в равном соотношении: Ad5-VEGF (1/3), Ad5-GDNF (1/3) и Ad5-NCAM (1/3) (Islamov et al., 2016, 2017). Для интратекальной инфузии препарат содержал 2×10^7 вирусных частиц в 20 мкл 0,9% NaCl.

Генно-клеточные конструкции получены на основе мононуклеарных клеток крови пуповины человека (МККП) и аденовирусных векторов, содержащих гены человека *veg165*, *gdnf*, *ncam1* и репортерный ген зеленого флуоресцирующего белка (*gfp*), как описано нами ранее, (Islamov et al. 2016, 2017).

Пуповинную кровь процессировали на базе Банка стволовых клеток Казанского государственного медицинского университета. МСКП выделяли по стандартной методике из свежей крови пуповины в градиенте плотности фикола. После центрифугирования при $720\times g$ в течение 20 мин. Лейкоцитарную фракцию собирали в отдельную пробирку, ресуспендировали в растворе фосфатно-солевого буфера, модифицированного Дульбекко (DPBS, ПанЭко) в соотношении 1:2 и центрифугировали при $305\times g$ в течение 15 мин. Полученный клеточный осадок ресуспендировали в 10 мл раствора DPBS и повторно центрифугировали при $305\times g$ в течение 15 мин. Для удаления эритроцитов клетки ресуспендировали в гипотоническом лизирующем буфере (0,168 М NH_4Cl , 0,1 М KHCO_3 , 1,27 мМ EDTA, pH 7,3). На заключительном этапе МСКП культивировали в среде RPMI-1640 (Sigma). Определение жизнеспособности выделенных МСКП проводили с использованием гемоцитометра путем окрашивания клеток 0,4% раствором трипанового синего.

Полученные МСКП высевали на 6 см культуральный планшет из расчета 2 млн. клеток/лунка и одновременно трансдуцировали тремя аденовирусами, несущими терапевтические гены в равном соотношении: Ad5-VEGF (1/3), Ad5-GDNF (1/3) и Ad5-NCAM (1/3), или репортерный ген (Ad5-GFP). При трансдукции МСКП общий показатель MOI (multiplicity of infection — множественность инфицирования) был равен 10. В ходе трансдукции МСКП культивировали в инкубаторе при 37°C , во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2 . Для ксенотрансплантации трансдуцированные МСКП собирали через 16 часов культивирования путем центрифугирования при $500\times g$ в течение 5 мин. Клеточный осадок растворяли в стерильном растворе 0,9% хлорида натрия из расчета 2×10^6 клеток в 20 мкл инъекции. Уровень мРНК генов *vegfl65*, *gdnf*, *ncam1* в трансдуцированных МСКП определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Для каждого гена-мишени результаты были получены в ходе двух независимых экспериментов в трех повторностях. Для негативного контроля использовали образцы нетрансдуцированных МСКП. Эффективность трансдукции МСКП аденовирусом Ad5-GFP оценивали через 5 суток культивирования, генетически модифицированных МСКП *in vitro* с помощью инвертированного люминесцентного микроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия).

В экспериментах на животных были использованы половозрелые самцы крыс линии Wistar (250-300 г), полученные из питомника Пущино (Пущино, Россия). Все опыты с животными проводили в соответствии с приказом Минздравсоцразвития № 708н от 23.08.2010 «Об утверждении правил лабораторной практики» и с разрешения Локального этического комитета Казанского государственного медицинского университета (протокол №10, 2017 г).

Ишемический инсульт головного мозга вызывали методом дистальной окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА). Хирургические вмешательства на животных выполнены в операционной, соответствующей надлежащим санитарным правилам и нормам. Глубокую анестезию вызывали путём внутрибрюшинного введения Золетила 100 (VirbacSanteAnimale, Франция) 3мг/кг и Ксилы (Interchemiewerken «DeAdelaar» B.V., Нидерланды) 4,8 мг/кг. На первом

этапе оперативного вмешательства для снижения кровотока в виллизиевом круге лигировали общую сонную артерию. На втором этапе операции слева высверливали трепанационное отверстие в височной кости диаметром 10 мм. Под операционным микроскопом МС-2 («Микромед», Россия) проводили ОСМА с помощью термокоагулятора («Эндомедиум» ЭХВЧ -300-01 №5013-06, Россия).

В послеоперационном периоде в течение 5 дней животные получали антибактериальную (Цефтриаксон, Sandoz, Austria), внутримышечно 50 мг/кг, один раз в сутки и обезболивающую терапию (Кеторол, Д-р Редди с Лабораторис Лтд, Индия), внутримышечно 2,5 мг/кг, один раз в сутки. Летальность экспериментальных животных во время операции и в послеоперационном периоде составила 20%, что соответствует тяжести операции.

Для интратекального введения рекомбинантных генов животным, находящимся в наркозе после моделирования ишемического инсульта, производили ламинэктомию на уровне 4–5 поясничных позвонков. Через 4 часа после моделирования ишемического инсульта экспериментальные животные получали интратекальную инъекцию 20 мкл физиологического раствора, содержащего 2×10^7 вирусных частиц или 2×10^6 генетически модифицированных МККП.

В зависимости от типа вводимого препарата экспериментальные животные были разделены на 5 экспериментальных групп (Таблица 1).

Таблица 1. Экспериментальные группы животных.

Группа	Препарат для интратекальной инъекции	Количество животных
Контроль	Физиологический раствор	5
Ad5-GFP	Аденовирусный вектор, несущий репортерный ген зеленого флуоресцирующего белка	7
Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM	Комбинация из трех аденовирусных векторов, несущих гены <i>vegfl65</i> , <i>gdnf</i> , <i>ncam1</i>	4
МККП+Ad5-GFP	МККП, трансдуцированные аденовирусным вектором Ad5-GFP	6
МККП+Ad5-VEGF+GDNF+NCAM	МККП, одновременно трансдуцированные тремя аденовирусными векторами Ad5-VEGF, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM	6

Согласно стандартам лечения ишемического инсульта, срок пребывания пациента в стационаре, составляет 21 день (Wahl and Schwab, 2014). Поэтому, в данной работе для гистологического исследования мозга подопытных животных выводили из эксперимента на 21-е сутки после ОСМА. Крыс наркотизировали раствором хлоралгидрата (80 мг/мл; 0,4 мл внутривенно) и транскраниально перфузировали холодным (4°C) 4% раствором

параформальдегида (рН=7,4). Головной мозг постфиксировали в 10% растворе формалина и помещали в 30% раствор сахарозы.

Для определения объема инфаркта через зону инсульта готовили 10 фронтальных срезов головного мозга на криостате Microm HM 560 (Thermo Scientific) с интервалом в 200 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином. На оцифрованных фотографиях головного мозга в зоне инсульта в программе ImageJ оценивали объем инфаркта с помощью формулы: $V=1/3 \times h_{\max} \times \pi \times r_{\max}^2$, где $h_{\max}$ — максимальная глубина инфаркта и $r_{\max}$ — максимальный радиус инфаркта.

Иммунофлуоресцентное окрашивание проводили на фронтальных криостатных срезах головного мозга толщиной 20 мкм. Иммуноэкспрессию белков-мишеней в нервных клетках и клетках нейроглии выявляли с помощью специфических антител. Астроциты маркировали антителами (АТ) против глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), олигодендроциты — АТ против фактора транскрипции олигодендроцитов 2 (Olig2). Клетки микроглии выявляли при помощи АТ к белку Iba1. Белки теплового шока и проапоптозные белки определяли с помощью АТ против Hsp70 и Caspase3, соответственно. Иммуноэкспрессию белков синаптических контактов выявляли АТ против синаптофизина (Synaptophysin) и белка постсинаптической плотности 95 (PSD95). Трансплантированные МККП в мозге крысы выявляли АТ против ядерного антигена человека (HNA). Иммунную реакцию с первичными АТ проводили при температуре 4°C в течении 12 ч. После промывки в ФСБ срезы инкубировали со вторичными АТ — ослиные Ig, конъюгированные с флуорохромом Alexa 488, Alexa 555 и Alexa 647 (Таблица 2). Для визуализации ядер клеток срезы дополнительно окрашивали раствором пропидиума йодида (PI) (Niu et al., 2015) или DAPI (10мкг/мл в ФСБ; Sigma). Анализ окрашенных микропрепаратов проводили с помощью конфокального сканирующего микроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Germany).

Количество GFAP-, Olig2-, Iba1- и Caspase3-иммунопозитивных клеток с ядрами, визуализированными при помощи DAPI, подсчитывали на площади 0,05 мм². Уровень иммуноэкспрессии синаптофизина, PSD95 и Hsp70 оценивали по плотности флуоресценции соответствующих маркеров в иммунопозитивных клетках на площади 0,05 мм². Среднее арифметическое значение интенсивности флуоресценции было получено с использованием программного обеспечения Zen 2012 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) и выражено в единицах средней интенсивности флуоресценции. При двойном иммунофлуоресцентном окрашивании ко-локализация HNA и одной из рекомбинантных молекул (VEGF, GDNF и NCAM) была подтверждена путем анализа объединенных трехканальных изображений. Для негативного контроля срезы инкубировали без АТ, или только со вторичными АТ. Морфометрический анализ иммунофлуоресцентного окрашивания проводили в условиях двойного слепого исследования.

Таблица 2. Список первичных и вторичных антител, использованных для иммунофлуоресцентного окрашивания.

Антитела	Происхождение	Разведение	Производитель
HNA*	Мышь	1:150	Millipore
GFAP*	Мышь	1:200	Santa Cruz
HSP70*	Кролик	1:200	Abcam
Olig2*	Кролик	1:100	Santa Cruz
Iba1*	Кролик	1:200	Biocare Medical
PSD95*	Кролик	1:200	Abcam
Synaptophysin*	Кролик	1:100	Abcam
Caspase 3*	Кролик	1:200	Abcam
Anti-rabbit IgG conjugated with Alexa 488**	Осел	1:200	Invitrogen
Anti-rabbit IgG conjugated with Alexa 555**	Осел	1:200	Invitrogen
Anti-mouse IgG conjugated with Alexa 647**	Осел	1:200	Invitrogen

*— первичные антитела; **— вторичные антитела

Для выявления статистически значимых различий между группами данных, полученных в результате морфометрии и иммунофлуоресцентного окрашивания, был использован тест Краскела-Уоллиса в качестве непараметрического метода дисперсионного анализа. При отклонении нулевой гипотезы применялся тест Данна в качестве апостериорного критерия для сравнения терапевтических групп с контрольной. Все этапы анализа данных проводили в среде для статистических вычислений R, версия 3.3.1. Для визуализации данных использовали диаграммы размахов, описательные статистики представлены в виде медиан [минимум; максимум]. Различия считали статистически значимыми при наблюдаемом р-значении <0.05 .

Результаты исследования и их обсуждение

Ограниченная регенерация в ЦНС и отсутствие доступных и эффективных методов стимулирования нейрорегенерации побуждают искать новые стратегии, направленные на преодоление гибели нервных клеток при таких состояниях, как нейродегенеративные заболевания, нейротравмы и инсульт. Повышение жизнеспособности нервных клеток при неврологических заболеваниях связывают с доставкой в мозг терапевтических генов, кодирующих молекулы, сдерживающих гибель нейронов и стимулирующих нейрорегенерацию. Перспективным способом доставки терапевтических генов считается — трансплантация генетически модифицированных клеток. Ранее нами была выдвинута гипотеза о том, что генетически модифицированные мононуклеарные клетки крови пуповины (МККП) человека, продуцирующие рекомбинантные

молекулы стимуляторы нейрорегенерации могут быть эффективным лекарственным препаратом для сдерживания гибели нейронов (Islamov, et al., 2016).

Лечение нейродегенеративных заболеваний, обусловленных мутациями определенных генов *a priori* требует вмешательство в организм пациента на генном уровне. Генная терапия предполагает доставку искусственной ДНК для коррекции функции мутантного гена. В настоящее время такой подход активно разрабатывается для доставки терапевтических генов, продуцирующих молекулы стимуляторы нейрорегенерации.

Впервые, для сдерживания гибели нейронов у трансгенных SOD1 G93A мышей с моделью бокового амиотрофического склероза нами был разработан генно-клеточный препарат на основе МККП и комбинации из трех аденовирусных векторов (Ad5), несущих по отдельности рекомбинантные гены, кодирующие VEGF, GDNF и NCAM (Islamov, et al., 2016). Внутривенная инъекция МККП, трансдуцированных Ad5-VEGF, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM, обнаружила существенное улучшение показателей поведенческих тестов (сила хватки и открытое поле), а также увеличение продолжительности жизни экспериментальных животных. Таким образом, нами установлено, что комбинация из трех рекомбинантных молекул (VEGF, GDNF и NCAM) может иметь более выраженный эффект, направленный на сдерживание гибели нервных клеток. Важно отметить, что экспрессия в МККП гена нейрональной молекулы клеточной адгезии (NCAM), способствовала адресной миграции трансплантированных клеток и поддерживала их выживание в спинном мозге мыши.

Таким образом, целесообразность генетической модификации мононуклеарных клеток крови пуповины человека для стимулирования нейрорегенерации обусловлена: (1) высоким уровнем трансдукции мононуклеарных клеток и подтвержденной экспрессией терапевтических генов, (2) миграцией через гемато-энцефалический барьер и повышением жизнеспособности трансплантированных клеток в ЦНС реципиента; (3) адресной доставкой специфических ростовых и трофических факторов в область дегенерации; (4) секрецией мононуклеарными клетками крови пуповины собственных биологически активных молекул, способствующих регенерации, (5) действием терапевтических молекул на клетки-мишени по аутокринному, паракринному или эндокринному механизму, (6) направленной дифференцировкой трансплантированных клеток в разные паренхиматозные клетки (макрофаги, эндотелиальные клетки, астроциты и др.), (7) трансплантацией клеток без учета гистосовместимости по HLA, (8) отсутствием прямого иммуногенного и токсического воздействия вирусных частиц на организм реципиента (Islamov, et al., 2016).

В другой работе, используя экспериментальную модель контузионной травмы спинного мозга на крысах (Islamov, et al., 2017) и мини-свиньях (Islamov, et al., 2017) мы разработали способ доставки рекомбинантных генов, кодирующих VEGF, GDNF и NCAM в зону нейродегенерации. В этих исследованиях гены *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1* доставляли путем прямой интратекальной инъекции

аденовирусных векторов, несущих целевые гены, или с помощью генетически модифицированных МККП, одновременно трансдуцированных тремя аденовирусами (Ad5-VEGF, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM), через 4 часа после моделирования контузионной травмы спинного мозга. Комплексный анализ поведенческих тестов, электрофизиологических и гистологических исследований выявил положительное действие рекомбинантных молекул VEGF, GDNF и NCAM на морфофункциональное восстановление спинного мозга подопытных животных. Эти исследования свидетельствуют, что интратекальная инфузия МККП, сверхэкспрессирующих молекулы стимуляторы нейрорегенерации VEGF, GDNF и NCAM, представляет собой новый потенциально успешный подход к преодолению последствий ишемического инсульта. Таким образом, разработанные нами технологии получения генного препарата (Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM), генно-клеточного препарата (МККП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM) и способы их доставки в ЦНС легли в основу настоящей работы.

Экспрессию рекомбинантных генов в генетически модифицированных МККП *in vitro* изучали через 48 часов после трансдукции МККП аденовирусным вектором, несущим ген репортерного зеленого флуоресцирующего белка (*gfp*) и после трансдукции МККП одновременно тремя аденовирусными векторами, несущими гены *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*. Эффективность трансдукции МККП аденовирусным вектором Ad5-GFP доказана методом иммунофлуоресценции. В цитоплазме генетически модифицированных МККП (МККП+ Ad5-GFP) выявлено специфическое зеленое свечение, что свидетельствует в пользу того факта, что данные аденовирусные векторы способны проникать в МККП человека, экспрессировать целевой трансген и обеспечивать продукцию рекомбинантного зеленого флуоресцирующего белка (Рис. 1А). Следует отметить, что экспрессия GFP в МККП *in vitro* сохраняется в течение 30 дней после трансдукции клеток.

Эффективность одновременной трансдукции МККП аденовирусными векторами Ad5-VEGF, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM оценивали методом ПЦР-РВ с помощью специфических праймеров к трансгенам. Показано, что уровень мРНК генов-мишеней в генетически модифицированных МККП (МККП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM) был выше для VEGF в $121,2 \pm 1,34$ раз, для GDNF в $96,81 \pm 0,65$ раз и для NCAM в $118,2 \pm 0,5$ раз по сравнению с уровнем мРНК генов-мишеней в нетрансдуцированных нативных МККП (Рис. 1Б).

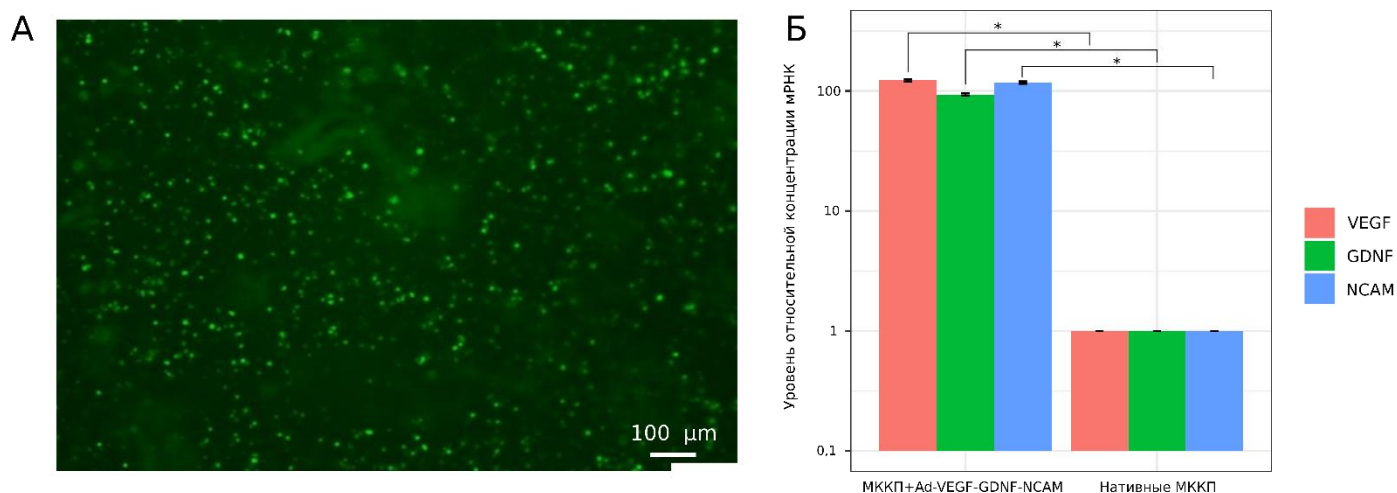


Рисунок 1. А — Продукция рекомбинантного зелёного флуоресцирующего белка в МККП человека через 48 часов после трансдукции клеток с помощью Ad5-GFP. Б — Количественный анализ уровня мРНК *vegf165*, *gdnf* и *ncaml* в генетически модифицированных мононуклеарных клетках крови пуповины человека (МККП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM) и нативных (нетрансдуцированных) МККП. Данные двух независимых экспериментов представлены как среднее значение $\pm$ С.О., $p < 0,05$.

Экспрессию репортерного гена зеленого флуоресцирующего белка в головном мозге крысы с моделью ишемического инсульта изучали на 21-е сутки после интратекальной инъекции Ad5-GFP или МККП, трансдуцированных Ad5-GFP (МККП+Ad5-GFP). С помощью флуоресцентной микроскопии микропрепаратов головного мозга подопытных крыс через 3 недели после интратекального введения 2×10^7 вирусных частиц Ad5-GFP, зеленый флуоресцирующий белок был выявлен в клетках мозга, как в зоне ишемии левого полушария мозга, так и в соответствующей области правого полушария.

В головном мозге подопытных крыс с моделью ишемического инсульта, которым интратекально вводили 2 млн МККП, трансдуцированных Ad5-GFP *ex vivo*, через 3 недели эксперимента с помощью флуоресцентной микроскопии были обнаружены клетки со специфическим зеленым свечением. МККП, экспрессирующие *gfp*, присутствовали как в зоне инфаркта левого полушария, так и в соответствующей области правого полушария головного мозга.

Таким образом, Ad5-GFP и МККП+Ad5-GFP после интратекальной инъекции вместе с током спинномозговой жидкости достигают головного мозга. При этом Ad5-GFP трансдуцируют нервные и глиальные клетки обоих полушарий и вызывают в них продукцию рекомбинантного белка. Важно отметить, что генетически модифицированные МККП мигрируют в зону ишемического поражения и демонстрируют способность продуцировать зеленый флуоресцирующий белок. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности доставки рекомбинантного гена в головной мозг крысы путем интратекальной инфузии, как аденовирусных векторов, несущих трансген, так и с помощью генетически модифицированных МККП.

Экспрессию рекомбинантных генов, кодирующих VEGF, GDNF и NCAM, в коре головного мозга исследовали через 3 недели после интратекальной инъекции одновременно трех аденовирусных векторов (группа Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM) или генетически

модифицированных МККП, сверхэкспрессирующих VEGF, GDNF и NCAM (группа МККП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM), иммунофлуоресцентным методом с использованием специфических АТ против целевых белковых молекул. Иммунофлуоресцентный анализ головного мозга в очаге ишемического поражения подтвердил экспрессию рекомбинантных генов *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1* в нервных и глиальных клетках на 21 сутки после одновременной доставки трех аденовирусных векторов (Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM).

Экспрессию рекомбинантных генов *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1* в трансплантированных, генетически модифицированных МККП изучали с помощью двойного иммунофлуоресцентного окрашивания. Для идентификации МККП в коре головного мозга использовали АТ против ядерного антигена человека (HNA). Рекомбинантные молекулы в МККП выявляли с помощью АТ к одной из молекул-мишеней (VEGF, GDNF или NCAM). Через три недели после интратекальной инъекции генетически модифицированных МККП в левом полушарии в зоне ишемического повреждения были найдены HNA-положительные клетки, способные синтезировать рекомбинантные молекулы человека VEGF, GDNF и NCAM.

Таким образом, нами показано, что интратекальная инфузия одновременно трех рекомбинантных терапевтических генов с помощью аденовирусных векторов или генетически модифицированных МККП обеспечивает их доставку в зону ишемического повреждения и способность экспрессировать молекулы симуляторы нейрорегенерации (VEGF, GDNF и NCAM) в течение 21 суток после доставки в головной мозг.

Морфологический анализ коры головного мозга крыс через три недели после моделирования ишемического инсульта выявил стандартной локализации мелкоочаговый инфаркт в теменной доле головного мозга (Par1), соответствующий месту окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) (рис. 2А). Гистологическое исследование периинфарктной области ишемического инсульта после дистальной окклюзии средней мозговой артерии выявило очаг некроза ткани, характеризующийся деструктуризацией и разряжением ткани, скоплением полинуклеарных лейкоцитов. Морфометрический анализ объема инфаркта мозга обнаружил значимые различия между опытными и контрольными группами животных. Так, объем инфаркта коры головного мозга в группах Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM (0.007[0.001; 0.012]) и МККП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM (0.021 [0.010; 0.025]) был значительно меньше по сравнению с контрольными группами — Ad5-GFP (0.091[0.080; 0.098]) и NaCl (0.168 [0.148, 0.171]). В группе МККП+Ad5-GFP (0.023 [0.005; 0.033]) объем инфаркта не отличался от опытных групп (Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM и МККП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM) и был ниже по сравнению с группой NaCl (введение физиологического раствора), $p < 0.05$ (Рис. 2Б).

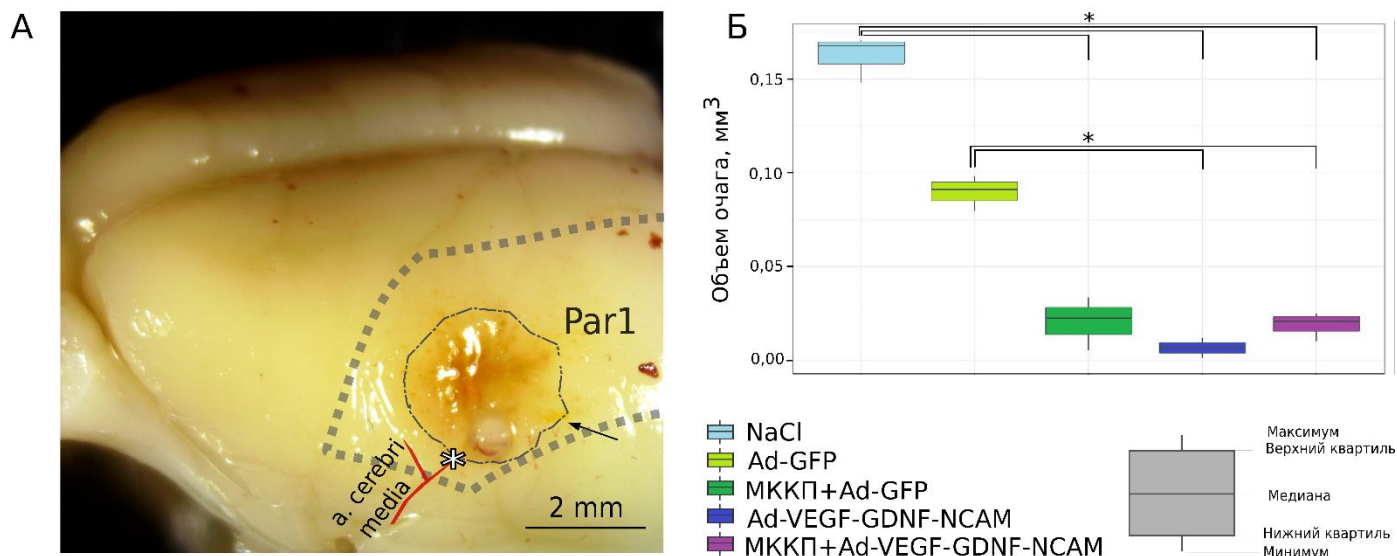


Рисунок 2. А — Головной мозг крысы из контрольной группы (интратекальная инъекция физиологического раствора) через 21 сутки после дистальной окклюзии средней мозговой артерии (*a. cerebri media*), Par 1 — область теменной доли, * — место окклюзии артерии, стрелка указывает на зону инфаркта. Б — Морфометрический анализ объема инфаркта головного мозга подопытных крыс через 21 сутки после дистальной окклюзии средней мозговой артерии. * — $p < 0.05$.

Таким образом, у крыс после дистальной ОСМА в теменной доле формировался стандартный мелкоочаговый инфаркт головного мозга. Большой объем инфаркта мозга у крыс из контрольных групп свидетельствует о положительном действии МККП и аденовирусных векторов, несущих гены *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, на сохранность ткани мозга. Полученные результаты исследования позволяют заключить, что МККП и рекомбинантные молекулы VEGF, GDNF, и NCAM способны сдерживать гибель нейронов в зоне ишемического поражения мозга.

Известно, что в центральной нервной системе (ЦНС) экспрессия белка теплового шока Hsp70 имеет конститутивный и индуцибельный варианты экспрессии. При этом экспрессия Hsp70 значительно усиливается в ответ на ишемическое поражение головного мозга, что подтверждается в многочисленных исследованиях на животных. В настоящем исследовании установлено, что уровень иммуноэкспрессии Hsp70 различался в клетках мозга у контрольных и опытных животных. Наибольший уровень иммуноэкспрессии Hsp70 был документирован в группах NaCl (введение физиологического раствора) (40.6[39.5; 41.3]) и Ad5-GFP (39.6[32.9; 43.2]). При этом иммуноэкспрессия Hsp70 в терапевтических группах Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM (34.7[30.7; 39.1]) и МККП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM (33.1[30.0; 35.8]) была значительно ниже по сравнению с контрольной группой NaCl. В группе МККП+Ad5-GFP (38[35.1; 42.7]) уровень Hsp70 не отличался от контрольных групп, но был значительно выше, чем в группе МККП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM.

Таким образом, снижение иммуноэкспрессии Hsp70 у подопытных животных из группы Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM и МККП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM свидетельствуют о положительном влиянии рекомбинантных молекул VEGF, GDNF и NCAM на преодоление негативных последствий ишемии и восстановление клеток мозга в реабилитационном периоде.

Апоптоз нейронов головного мозга активно происходит в «ишемической полутени» в период «терапевтического окна» и продолжается в течение нескольких дней и недель после возникновения инсульта. С помощью АТ против про-апоптозного белка Caspase 3 нами была проведена оценка количества клеток, вступивших в апоптоз в области ишемического повреждения головного мозга экспериментальных животных через 21 день после моделирования инсульта. Значительное снижение Caspase 3-позитивных клеток было выявлено во всех опытных группах по сравнению с контрольной группой NaCl (введение физиологического раствора) (12[6;17]). Количество Caspase 3-позитивных клеток в опытных группах МККП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM (5[3;7]), Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM (7[5;8]) и МККП+Ad5-GFP (5[4;8]) не различалось. Количество Caspase 3-положительных клеток в группе Ad5-GFP (9[5; 10]) не отличалось от группы NaCl и было значительно выше по сравнению с группой МККП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM. Таким образом, данные анализа количества Caspase 3-позитивных клеток в зоне ишемического поражения мозга экспериментальных животных свидетельствуют о положительном влиянии МККП (группа МККП+Ad5-GFP), генетически модифицированных МККП (группа МККП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM) и комбинации из трех аденовирусных векторов, несущих целевые гены (группа Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM) на сдерживание вступления клеток мозга в апоптоз в условиях ишемии.

Функциональное восстановление нейронов коры головного мозга после моделирования инсульта оценивали с помощью иммуофлуоресцентного окрашивания с АТ против пресинаптического белка синаптофизина (Synaptophysin) и белка постсинаптической плотности 95 (PSD95). В качестве показателя уровня иммуоэкспрессии белков Synaptophysin и PSD95 в клетках мозга использовали величину интенсивности флуоресценции соответствующих маркеров на цифровом изображении микропрепаратов. Анализ иммуоэкспрессии Synaptophysin и PSD95 в нейронах коры головного мозга в области ишемического повреждения показал существенные различия в экспериментальных (контрольных и опытных) группах.

Иммуоэкспрессия синаптофизина в мозге группы МККП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM (12.6[8.3; 18.3]) была значительно выше по сравнению со всеми другими экспериментальными группами, а в мозге группы Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM (7.9[4.5; 16.1]) — выше по сравнению с контрольными группами и группой МККП+Ad5-GFP (5.4[1.0; 9.8]). Уровень синаптофизина в мозге группы МККП+Ad5-GFP не отличался от контрольных групп NaCl (2.3[1.0; 4.5]) и Ad5-GFP (5.7[2.3; 10.0]).

Интенсивность флуоресценции PSD95 в мозге опытных групп Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM (17.9[10.9; 26.0]) и МККП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM (17.7[8.8; 26.7]) была значительно выше по сравнению с группой МККП+Ad5-GFP и контрольными группами. Экспрессия PSD95 в группе МККП+Ad5-GFP (7.5[4.0; 10.5]) не отличалась от группы Ad5-GFP (4.7[2.6; 8.6]), но была выше, чем в группе с введением физиологического раствора (2.1[1.0; 4.2]).

Таким образом, можно предположить, что у животных на фоне интратекального введения МККП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM и Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM происходит восстановление функциональной активности нейронов коры головного мозга в области ишемического повреждения, в том числе за счет усиления экспрессии синаптических белков.

Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток макро- и микроглии спинного мозга проводили с помощью специфических антител против белков-мишеней для каждого типа клеток. Астроциты маркировали антителами против глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), олигодендроглиальные (прогениторные и зрелые) клетки — антителами против фактора транскрипции олигодендроцитов 2 (Olig2). Клетки микроглии выявляли при помощи антител к кальций-связывающему белку Iba1. Иммунопозитивные клетки подсчитывали в перинфарктной зоне коры головного мозга.

Морфометрический анализ GFAP-позитивных клеток показал, что они присутствуют в мозге крыс в значительно меньшем количестве в группах Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM (3[1;6]) и МККП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM (4[1;9]) по сравнению с мозгом животных контрольных групп — NaCl (18[10;25]) и Ad5-GFP (12[10;15]). Количество GFAP-положительных клеток в группе МККП+Ad5-GFP (12[10;17]) было выше, чем в Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM и МККП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM группах и не отличалось от контрольных групп.

Подсчет Olig2-позитивных клеток в опытных группах Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM (18[12;22]) и МККП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM (17[14;24]) выявил значительно большее количество олигодендроглиальных клеток, чем в контрольных группах — NaCl (4[3;8]), Ad5-GFP (8[5;12]) и в группе МККП+Ad5-GFP (9[4;14]). При этом количество Olig2-положительных клеток в мозге группы МККП+Ad5-GFP не отличалось от группы Ad5-GFP, но было значительно выше по сравнению с контрольной группой NaCl.

Количество Iba1-положительных клеток не различалось в мозге во всех опытных группах: МККП+Ad5-GFP (1[0;4]), Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM (1[0;3]) и МККП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM (0[0;2]) и было значительно ниже по сравнению с контрольной группой Ad5-GFP (6[2;10]). При этом в контрольной группе с введением физиологического раствора (4[0;8]) количество клеток микроглии было значительно выше, чем в группе МККП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM.

Полученные нами данные свидетельствуют о положительном влиянии МККП и рекомбинантных VEGF, GDNF, NCAM на нейропластичность мозга в условиях ишемии. На положительный эффект генных и генно-клеточных конструкций на ремоделирование головного мозга в зоне ишемического повреждения указывают данные о снижении количества астроцитов и клеток микроглии, ответственных за астроглиоз и увеличении численности олигодендроглиальных клеток, способствующих миелинизации нервных отростков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одним из важных компонентов пластичности нервных структур мозга является защитный механизм — нейропротекция, обеспечивающая поддержание жизнеспособности нервных клеток, их морфологическую и функциональную целостность при неблагоприятных воздействиях. Нейропротекция осуществляется с участием нейротрофических взаимодействий, реализующихся в том числе с помощью нейротрофических факторов, которые вырабатываются, как в нервных, так и иных клетках и оказывают защитное действие на нейроны при ишемическом повреждении, либо другой патологии мозга. В связи с этим современная стратегия, направленная на сдерживание гибели нейронов после инсульта головного мозга основана на применении нейротрофических факторов.

Однако, на сегодняшний день готовых, апробированных и эффективных подходов для сдерживания гибели нейронов при инсульте не существует. Проблема разработки нового класса лекарственных средств на основе рекомбинантных генов, кодирующих нейротрофические факторы, а также способов их доставки в мозг для преодоления последствий инсульта головного мозга является крайне актуальной, не только для фундаментальной, но, в первую очередь, для практической медицины.

В данной работе, нами показано, что в результате интратекальной инъекции одновременно трех аденовирусных векторов, несущих гены *vegfl65*, *gdnf*, *ncam1*, или генетически модифицированных МККП, продуцирующих рекомбинантные нейропротекторные факторы, вместе с током спинномозговой жидкости достигают головного мозга и обеспечивают в зоне ишемического поражения продукцию рекомбинантных молекул VEGF, GDNF и NCAM, продолжающуюся до 21 суток эксперимента. Морфометрический анализ объема инфаркта мозга и количества Caspase 3-позитивных клеток в области ишемического поражения через 21 сутки после моделирования инсульта свидетельствуют о положительном влиянии рекомбинантных молекул VEGF, GDNF и NCAM на сдерживание гибели нейронов в условиях ишемии. Кроме того на фоне рекомбинантных VEGF, GDNF и NCAM в процессе постишемического ремоделирования коры головного мозга установлено понижение уровня белков теплового шока Hsp70 в нервных и глиальных клетках (снижение клеточного стресса), более высокая экспрессия синаптических белков (PSD95 и синаптофизин) в нейронах (восстановление функциональной активности), снижение астроглиоза (уменьшение количества GFAP-позитивных астроцитов и Iba1-позитивных клеток микроглии) и поддержание миелинизации (увеличение числа Olig2-позитивных клеток) нервных отростков.

Подводя итог, в настоящем исследовании мы показали, что интратекальная инфузия генетического материала, состоящего из гена сосудистого эндотелиального фактора роста (*vegfl65*), гена глиального нейротрофического фактора (*gdnf*) и гена нейрональной молекулы клеточной адгезии (*ncam1*), оказывает положительное влияние на нейропластичность мозга в условиях

ишемии. Данные настоящего исследования могут служить основой для разработки нового класса лекарственных средств, содержащих генетический материал, для сдерживания гибели нейронов при ишемическом инсульте и стимулирования нейрорегенерации головного мозга в реабилитационном периоде.

ВЫВОДЫ

1. Гены *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1* в составе рекомбинантного репликативно-дефектного аденовируса человека 5 серотипа эффективно трансдуцирует мононуклеарные клетки крови человека *ex vivo* и обеспечивает в них эффективную экспрессию рекомбинантных генов.
2. Прямое интратекальное введение рекомбинантных генов *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1* с помощью аденовирусного вектора обеспечивает трансдукцию клеток в области ишемии коры головного мозга крысы и продукцию в них целевых молекул VEGF, GDNF и NCAM.
3. При моделировании ишемического инсульта генетически модифицированные мононуклеарные клетки крови пуповины человека, трансдуцированные *ex vivo* аденовирусными векторами, несущих гены *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, после интратекальной инфузии мигрируют в область ишемического повреждения в головном мозге крысы и обеспечивают локальную продукцию рекомбинантных молекул VEGF, GDNF и NCAM.
4. Интратекальная доставка в ишемизированный мозг крысы с помощью аденовирусных векторов или клеточных носителей сочетания рекомбинантных генов *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1* поддерживает сохранность ткани головного мозга, уменьшает объем зоны инфаркта, снижает экспрессию молекулы клеточного стресса Hsp 70 и проапоптозной молекулы Caspase 3.
5. Одновременное увеличение экспрессии всех рекомбинантных генов *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1* в зоне ишемического повреждения мозга крысы оказывает положительное влияние на нервную ткань и характеризуется снижением интенсивности астроглиоза (уменьшение количества GFAP–позитивных астроцитов и Iba1–позитивных клеток микроглии) и поддержанием миелинизации (увеличение количества Olig2–миелинообразующих клеток).
6. Рекомбинантные молекулы VEGF, GDNF и NCAM в условиях ишемического инсульта не зависимо от способа доставки способствуют повышению экспрессии синаптических белков (PSD95 и синаптофизин) в нейронах коры головного мозга, что свидетельствует о возможном восстановлении функциональной активности нейронов.
7. Интратекальная доставка в ишемизированный мозг крысы рекомбинантных генов *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1* с помощью генетически модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины человека оказывает более выраженный положительный эффект по сравнению с прямой доставкой тех же генов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Экспериментальное обоснование генной терапии ишемического инсульта головного мозга / **М.Е. Соколов**, Ф.В. Баширов, З.З. Сафиуллов // Каз. Мед. Журнал. – 2017. – Т. 98, № 5. – С. 763-769.
2. Пат. 2676701 Российская Федерация, МПК А 61 К 31/7088, А 61 К 48/00. Средство для сдерживания гибели нейронов при ишемическом инсульте головного мозга и способ клеточно-опосредованной генной терапии ишемического инсульта головного мозга средством сдерживания гибели нейронов при ишемическом инсульте головного мозга / Исламов Р.Р., **Соколов М.Е.** и др.; заявитель и патентообладатель Каз. мед. универ., Исламов Р.Р., **Соколов М.Е.** - № 2017142047; заявл. 01.12.2017; опубл. 10.01.2019, Бюл. № 1. – 3 с.

В прочих изданиях:

1. Triple-Gene Therapy for Stroke: A Proof-of-Concept in Vivo Study in Rats / **М. Е. Sokolov**, F. V. Bashirov, V/ A. Markosyan et al. // Frontiers in Pharmacology. - 2018. - V. 9 - Article 111.
2. Spinal cord molecular and cellular changes induced by adenoviral vector- and cell-mediated triple gene therapy after severe contusion / A.A. Izmailov, T.V. Povysheva, F.V. Bashirov, **М.Е. Sokolov** et al. // Frontiers in Pharmacology. - 2017.- V.8. - Article 813.
3. Evaluation of direct and cell-mediated triple-gene therapy in spinal cord injury in rats / R.R. Islamov, A.A. Izmailov, **М.Е. Sokolov**, et al. // Brain Research Bulletin. - 2017.- V.132. - P. 44-52.
4. A pilot study of cell-mediated gene therapy for spinal cord injury in mini pigs / R.R. Islamov, **М.Е. Sokolov**, F.V. Bashirov, et al. // Neuroscience Letter. - 2017. - V.644. - P.67-75.
5. Tandem Delivery of Multiple Therapeutic Genes Using Umbilical Cord Blood Cells Improves Symptomatic Outcomes in ALS / R.R. Islamov, A.A. Rizvanov, V.Y. Fedotova, A.A. Izmailov, Z.Z. Safiullov, E.E. Garanina, I.I. Salafutdinov, **М.Е. Sokolov** et al. // Mol Neurobiol. - 2016.- V.54, №6.- P. 4756-4763.

В сборниках тезисов и материалов конференций:

1. Functional recovery of mini-pigs with spinal cord injury due to epidural spinal cord electrical stimulation combined with ex vivo triple gene therapy / I.I. Salafutdinov, F.O. Fadeev, A.A. Izmailov, A.A. Ereemeev, F.V. Bashirov, **М.Е. Sokolov** et al. // European journal of clinical investigation. - 2019. - V.49. - P.167.
2. Umbilical Cord Blood Mononuclear Cells for Ex-Vivo Gene Therapy / F.V. Bashirov, I.I. Salafutdinov, **М.Е. Sokolov** et al. // 60th ASH Annual Meeting Abstracts American Society of Hematology. - San Diego, USA, 2018. - Blood - 29 November 2018 - V. 132, Issue Supplement S1. – P. 5797.
3. Cell mediated gene therapy for neurodegenerative diseases, neurotrauma and stroke / F.V. Bashirov, **М. Е. Sokolov**, A.A. Izmailov et al. // Changing the Face of Modern Medicine:Stem Cell and Gene Therapy Organized Jointly by the European Society of Gene & Cell Therapy (ESGCT),International Society for Stem Cell Research (ISSCR) and the French Society of Gene and Cell Therapy (SFTCG). - Lausanne, Switzerland ,October 16–19. - Human Gene Therapy. - 2018. - A 68. – P. 139.
4. Genetically engineered umbilical cord blood mononuclear cells for therapy of spinal cord injury in combination with epidural stimulation / F.O. Fadeev, F.V. Bashirov, A.A. Izmailov, **М.Е. Sokolov** et al. // Changing the Face of Modern Medicine:Stem Cell and Gene Therapy Organized Jointly by the European Society of Gene & Cell Therapy (ESGCT),International Society for Stem Cell Research (ISSCR) and the French Society of Gene and Cell Therapy (SFTCG). - Lausanne, Switzerland ,October 16–19, Human Gene Therapy. - 2018. - A 89. - P. 2080.
5. Pharmacokinetics of recombinant molecules in rat CNS after intrathecal injection of mixture of adenoviral vectors carrying VEGF, GDNF and NCAM genes / A.A. Izmailov, **М.Е. Sokolov**, V.A.

Markosyan et al. // EMBO 2018 meeting. - San Diego, USA, 8-12 December. - Molecular Biology of the Cell. - V. 29. - N. 26. – P. 2679.

6. Efficacy of triple gene therapy based on adenoviral vector- or cell-mediated intrathecal delivery for spinal cord injury treatment in rat model / R.R. Islamov, A.A. Izmailov, F.V. Bashirov, **M.E. Sokolov** et al. // 42nd FEBS Congress From Molecules to Cells and Back. - Jerusalem, Israel, 2017. – September, 2017 - P.247.

7. Preventive gene therapy for stroke / V.A Markosyan, F.V. Bashirov, **M.E Sokolov** et al. // Precision medicine for healthy ageing. – Barcelona, Spain, 30 May, 2017. - European Journal of Clinical Investigation. - V. 48 . - P.99.

E-mail автора: supermihon@yandex.ru

Контактный телефон автора: 89600341124

Адрес для отзывов на автореферат: 420008, Казань, ул. Кремлёвская, 18, Казанский федеральный университет, отдел аттестации научно-педагогических кадров, Ученому секретарю Диссертационного совета КФУ 03.06 Аникиной Татьяне Андреевне, факс: (843)238-76-01, e-mail: tania57vg1@rambler.ru.