

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

На правах рукописи

Гарифулин Равиль Расимович

**ВЛИЯНИЕ АУТОЛОГИЧНОГО ЛЕЙКОКОНЦЕНТРАТА,
ОБОГАЩЕННОГО ГЕНЕТИЧЕСКИМ МАТЕРИАЛОМ,
НА ПОСТТРАВМАТИЧЕСКУЮ РЕГЕНЕРАЦИЮ СПИННОГО МОЗГА У
СВИНЕЙ**

1.5.22. Клеточная биология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Исламов Рустем Робертович

Казань – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.	15
1.1 Позвоночно-спинномозговая травма.	15
1.2 Морфофункциональные изменения при травме спинного мозга.	18
1.2.1 Первичная травма спинного мозга.	19
1.2.2 Вторичная травма спинного мозга.	20
1.2.2.1 Микроглия.	20
1.2.2.2 Астроциты.	22
1.2.2.3 Олигодендроциты.	24
1.2.2.4 Эпендимоциты.	24
1.2.3 Морфологические изменения спинного мозга в удаленной от травмы области.	25
1.2.4 Морфологические изменения периферических нервов после травмы спинного мозга.	26
1.2.5 Морфологические изменения скелетных мышц после травмы спинного мозга.	27
1.3 Существующие методы лечения травмы спинного мозга.	29
1.3.1 Хирургическая декомпрессия.	29
1.3.2 Регулирование артериального давления.	30
1.3.3 Фармакологические средства.	31
1.3.3.1 Метилпреднизолон.	31
1.3.3.2 Рилузол.	32
1.3.3.3 Миноциклин.	33
1.4 Генная терапия.	34
1.4.1 Нейротрофические факторы.	35
1.4.2 Генетические вектора.	39
1.4.2.1 Аденовирусы.	39
1.4.2.2 Аденоассоциированные вирусы.	40

1.4.2.3 Лентивирусы.	43
1.5 Клеточная терапия.	44
1.5.1 Нейральные стволовые клетки.	44
1.5.2 Мезенхимальные стволовые клетки.	45
1.5.3 Шванновские клетки.	46
1.5.4 Обкладочные нейроэпителиальные клетки.	47
1.5.5 Мононуклеарные клетки пуповинной крови.	48
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.	50
2.1 Дизайн эксперимента.	50
2.2 Получение аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами vegfl65, gdnf и ncam1.	52
2.2.1 Химерные аденовирусные векторы.	52
2.2.2 Забор периферической крови.	52
2.2.3 Выделение лейкоконцентрата.	53
2.2.4 Трансдукция лейкоконцентрата.	54
2.2.5 Оценка эффективности трансдукции лейкоконцентрата.	54
2.3 Экспериментальное моделирование травмы спинного мозга.	56
2.3.1 Предоперационная подготовка.	56
2.3.2 Моделирование контузионной травмы.	57
2.3.3 Введение аутологичного лейкоконцентрата.	58
2.3.4 Послеоперационный период.	58
2.4. Поведенческие тесты.	59
2.5 Электрофизиологические исследования.	60
2.6 Гистологические исследования.	61
2.6.1 Приготовление срезов.	61
2.6.2 Окрашивание гистологических препаратов.	62
2.6.3 Морфометрический анализ.	63
2.7 Статистический анализ.	64
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.	65
3.1 Характеристика аутологичного генетически модифицированного	

лейкоконцентрата.	65
3.2 Оценка посттравматических морфофункциональных изменений спинного мозга у свиней в условиях внутривенного введения аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генетическим материалом.	69
3.2.1 Поведенческие тесты.	70
3.2.2 Электрофизиологическое исследование.	71
3.3 Пластичность поясничного утолщения спинного мозга.	74
3.3.1 Сохранность поясничного утолщения спинного мозга.	74
3.3.2 Оценка двигательных нейронов.	76
3.3.3 Состояние клеток нейроглии в условиях травмы спинного мозга.	82
3.4 Морфометрический анализ скелетных мышц.	90
3.5 Оценка состояния большеберцового нерва в условиях травмы спинного мозга.	93
ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.	98
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.	104
ВЫВОДЫ.	110
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.	112
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.	113
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.	115

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность избранной темы

Позвоночно-спинномозговая травма относится к наиболее тяжелым и часто встречаемым повреждениям опорно-двигательного аппарата и центральной нервной системы (ЦНС), и лечение ее последствий является одной из актуальных проблем современной медицины в области нейрохирургии и травматологии. Негативные последствия травматического повреждения спинного мозга (СМ) обусловлены значительным количеством осложнений, связанных с нарушением двигательных, чувствительных и вегетативных функций у таких пациентов, и высоким уровнем их инвалидизации, приводящей к социальной и психологической дезадаптации [4, 175]. За последние 30 лет распространенность травмы спинного мозга (ТСМ) увеличилась с 236 до 1 298 случаев на миллион населения, и по некоторым оценкам, ежегодно в мире регистрируется от 250 000 до 500 000 случаев ТСМ [30, 204].

В значительной степени негативные последствия ТСМ напрямую зависят от степени тяжести и уровня повреждения СМ [21]. Такие травмы могут возникать в результате смещения позвонков или перелома позвоночника, что приводит к компрессии (сдавлению) или трансекции (разрыву) тканей СМ. Нарушения целостности структур СМ (первичные повреждения) в свою очередь запускают развитие вторичных посттравматических повреждений СМ, увеличивающих область первичной травмы и приводящих к большим осложнениям [68, 160]. К сожалению, существенным лимитирующим фактором посттравматической регенерации СМ является изначально ограниченный регенераторный потенциал нейронов ЦНС [262].

Еще одной нерешенной проблемой являются последствия патологических сдвигов при ТСМ, которые развиваются и в областях, удаленных от первичного очага повреждения СМ, но функционально связанных с ним [41]. Зона вторичного повреждения СМ постепенно распространяется от эпицентра травмы в ростральном и каудальном направлениях, что следует учитывать при выборе

тактики лечения и реабилитации пациентов с ТСМ [190].

Несмотря на то, что последние достижения в молекулярной биологии расширили наши представления об основных патофизиологических процессах, развивающихся после ТСМ, стандартные протоколы ведения пациентов с ТСМ до сих пор направлены лишь на симптоматическое лечение и облегчение общего состояния, но кардинально не решают проблему преодоления возникших посттравматических последствий [89]. Следует также отметить, что длительная терапия таких пациентов и повседневный уход за ними создают в семье существенные моральные, экономические и социальные проблемы, отражающиеся в конечном итоге и на государственном уровне [36, 179, 232]. Вот почему разработка принципиально новых подходов терапии пациентов со спинальной травмой, направленных на сдерживание массовой гибели нейронов СМ, стимулирование посттравматической регенерации их аксонов и формирование новой транстравматической нейронной сети, является одной из актуальных проблем в современной медицине в целом и неврологической практике в частности [81, 262].

Степень разработанности темы диссертации

На сегодняшний день терапия ТСМ включает ряд направлений: раннюю хирургическую декомпрессию СМ, использование вазопрессорных препаратов и введение высоких доз кортикостероидов. Однако эффективность таких методов терапии пациентов с ТСМ не высока и напрямую зависит от тяжести повреждения СМ и времени начала лечения [110].

Наряду с традиционными подходами одним из современных, обладающих большим потенциалом преодоления последствий ТСМ подходом является генная терапия. С помощью генной терапии для стимулирования посттравматической регенерации в область эпицентра нейротравмы доставляют рекомбинантные гены, кодирующие различные факторы, регулирующие выживаемость нейронов, рост аксонов, синаптогенез [107, 154]. В зависимости от способа доставки терапевтических генов, различают прямую (*in vivo*) и клеточно-опосредованную

(*ex vivo*) генную терапию [19]. Прямая генная терапия подразумевает доставку терапевтических генов с использованием вирусных векторов, которые непосредственно вводят в организм пациента. К наиболее часто используемым для этого вирусным системам относят аденовирусы (Ad), аденоассоциированные вирусы (AAV) и лентивирусы (ЛВ). Применение вирусных векторов для доставки терапевтических генов уже доказало свою эффективность в лечении некоторых видов рака, инфекционных и наследственных заболеваний, и клинические исследования с их использованием продолжают расширяться [261]. Генно-клеточная терапия основана на доставке терапевтических генов с помощью клеточных носителей – стволовых или зрелых соматических клеток ауто- или аллогенного происхождения. Доставку терапевтических генов в клетку *ex vivo* преимущественно осуществляют с помощью вирусных систем [26]. Однако использование клеточных носителей позволяет снизить иммуногенное или цитотоксическое действие вируса на организм реципиента [93, 98].

Для стимулирования посттравматической нейрорегенерации могут быть использованы гены с нейротрофическими эффектами, такие как сосудистый эндотелиальный фактора роста (VEGF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF) и молекула клеточной адгезии нейронов (NCAM) [60, 64, 139, 177]. Перечисленные факторы играют важную роль в развитии, поддержании и функционировании нервной системы, и терапевтическая ценность такого подхода заключается в повышении их содержания в области нейротравмы [100]. Однако выбор клеточного носителя терапевтических генов до сих пор остается сложной задачей. Клетки для *ex vivo* генной терапии должны отвечать требованиям безопасности, достаточно время сохранять жизнеспособность после трансплантации и обеспечивать высокую секреторную активность определенное время [85].

Мононуклеарные клетки пуповинной крови (МКПК) являются хорошо изученным в регенеративной медицине объектом, который применяют для клеточной терапии самых различных соматических заболеваний [229, 245, 255]. Трансплантацию генетически модифицированных МКПК, продуцирующих

рекомбинантные нейротрофические факторы, такие как VEGF, GDNF и NCAM, использовали для сдерживания гибели мотонейронов у трансгенных мышей с фенотипом бокового амиотрофического склероза, а также для стимулирования посттравматической и постишемической нейрорегенерации у крыс и свиней после инсульта головного мозга или TCM [12, 141, 170, 206, 219].

Существенными недостатками использования МКПК в качестве клеточного носителя для генно-клеточной терапии являются не только риски, связанные с аллотрансплантацией МКПК, но и относительно небольшое содержание моноклеарных клеток в крови пуповины, которые можно получить от одного донора, что ограничивает трансплантацию МКПК взрослым пациентам в практической медицине. В этой связи применение для доставки терапевтических генов в организм пациента его собственных (аутологичных) лейкоцитов, выделенных из венозной (периферической) крови, может стать одним из успешных направлений в персонифицированной генно-клеточной терапии, например, дегенеративных, ишемических и травматических повреждений ЦНС, включая TCM.

Цель исследования

Оценить морфофункциональное состояние поясничного отдела спинного мозга у свиней с контузионной травмой в нижнегрудном отделе в условиях внутривенного введения аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами сосудистого эндотелиального фактора роста (*vegfl65*), глиального нейротрофического фактора (*gdnf*) и нейрональной молекулы клеточной адгезии (*ncam1*).

Задачи исследования

1. Получить обогащенный генетическим материалом аутологичный лейкоконцентрат на основе периферической крови свиней и химерных аденовирусных векторов, несущих гены сосудистого эндотелиального фактора роста (Ad5/35F-VEGF165), глиального нейротрофического фактора

(Ad5/35F-GDNF) и нейрональной молекулы клеточной адгезии (Ad5/35F-NCAM1), и оценить синтез рекомбинантных белков генетически модифицированными лейкоцитами *in vitro*.

2. Изучить морфофункциональные нарушения в удаленном от эпицентра нейротравмы поясничном отделе (L6-S1) спинного мозга свиньи с контузионной травмой в нижнегрудном отделе (Th8-Th9).

3. Изучить морфологические и электрофизиологические изменения в нервно-мышечном аппарате (большеберцовом нерве и камбаловидной мышце) задних конечностей свиньи с контузионной травмой в нижнегрудном отделе (Th8-Th9).

4. Оценить влияние внутривенной инфузии аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, на морфофункциональное восстановление поясничного отдела (L6-S1) спинного мозга и нервно-мышечного аппарата (большеберцового нерва и камбаловидной мышцы) задних конечностей свиньи с контузионной травмой в нижнегрудном отделе (Th8-Th9).

Научная новизна

Разработан способ получения аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами *vegfl65*, *gdnf*, *ncam1*, и его применения для терапии спинальной травмы у свиньи (патент РФ на изобретение № 2784233).

В настоящем исследовании получены приоритетные данные о вторичном повреждении СМ в удаленном от эпицентра нейротравмы поясничном отделе (L6-S1) спинного мозга свиньи с контузионной травмой в нижнегрудном отделе (Th8-Th9), свидетельствующие о распространении вторичных повреждений в каудальном направлении.

Новыми являются данные о том, что через 2 месяца после нейротравмы в поясничном отделе СМ выявляются негативные изменения функционального состояния нейронов и патологическое распределение нейроглиальных клеток. Также установлены нарушения в нервно-мышечном аппарате нижних конечностей

свиней, проявляющиеся в нарушении двигательной функции. Морфометрический анализ показал, что в этих условиях в большеберцовом нерве наблюдается уменьшение количества миелиновых волокон и увеличение толщины миелина и диаметра аксона нервного волокна. В камбаловидной мышце у таких животных на фоне снижения мышечной массы происходило уменьшение средней площади поперечного сечения мышечных волокон (МВ) и количества медленных МВ при ТСМ. При электрофизиологическом исследовании скелетных мышц травмированных свиней был обнаружен полифазный М-ответ с увеличенной длительностью и амплитудой. Полученные данные электрофизиологического и морфологического исследования скелетных мышц свидетельствуют о развитии денервационного синдрома у свиней с контузионной ТСМ в нижнегрудном отделе (Th8-Th9).

Через 2 месяца после контузионной травмы у животных в условиях внутривенного введения аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами *vegfl65*, *gdnf*, *ncam1*, выявлено положительное ремоделирование нейроглиальных клеток и восстановление экспрессии синаптических белков в двигательных нейронах поясничного отдела СМ. Привнесенные гуморальные факторы обеспечивают сохранность нервных волокон в составе большеберцового нерва, предотвращение атрофии скелетных мышц и трансформации медленных мышечных волокон в быстрые после ТСМ свидетельствуют о сохранности двигательных нейронов поясничного отдела СМ, иннервирующих скелетные мышцы задних конечностей и обеспечивающих их нейротрофическим контролем.

Теоретическая и практическая значимость работы

Фундаментальное значение выполненного исследования определяется новыми данными о клеточных основах вторичных повреждений в поясничном отделе СМ свиньи после контузионной травмы в нижнегрудном отделе. Обнаруженные изменения экспрессии синаптических белков (синаптофизина, белка постсинаптической плотности 95 кДа, холинацетилтрансферазы) и негативное ремоделирование клеток нейроглии в поясничном утолщении СМ после

его травмы дополняют нынешние представления о механизме распространения нейродегенерации в удаленную от эпицентра повреждения область. Снижение количества миелинизированных нервных волокон, увеличение их диаметра и толщины миелиновой оболочки в большеберцовом нерве, наряду с атрофией и изменением фенотипа камбаловидной мышцы задней конечности, свидетельствуют о нарушении нейротрофического контроля как со стороны центральных нейронов, так мотонейронов СМ в этих условиях. Результаты внутривенного введения аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами *vegfl65*, *gdnf*, *ncam1*, свиньям с ТСМ дают основание полагать, что положительный эффект на морфофункциональные характеристики поясничного утолщения клеток СМ, большеберцового нерва и камбаловидной мышцы обусловлен действием рекомбинантных терапевтических молекул VEGF165, GDNF и NCAM1, продуцируемых аутологичными генетически модифицированными лейкоцитами свиньи.

Данные о способе получения и применения аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами *vegfl65*, *gdnf*, *ncam1*, для стимулирования посттравматической регенерации спинного мозга у свиньи могут стать основой для разработки генно-клеточного препарата на основе лейкоцитов человека и терапевтических генов с нейротрофическим действием для персонализированной генной терапии пациентов с ТСМ.

Методология и методы диссертационного исследования

Исследование одобрено Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол заседания № 5 от 26.05.2020) и поддержано грантом РФ № 16-15-00010. Контузионную травму спинного мозга в нижнегрудном отделе у свиней моделировали по ранее разработанному нами способу [152]. Аутологичный лейкоконцентрат, обогащенный искусственным генетическим материалом, готовили из периферической крови свиньи и химерных аденовирусных векторов (Ad5/F35), несущих по отдельности терапевтические гены *gdnf*, *vegfl65* и *ncam1*, по

оригинальному протоколу [82, 152]. Эффективность введения генно-клеточного препарата свиньям с контузионной ТСМ оценивали с помощью поведенческих тестов, гистологических и электрофизиологических методов исследования. Статистический анализ и визуализацию данных проводили в среде R версии 4.1.2 (R Foundation for Statistical Computing, Вена, Австрия). Для сравнения экспериментальных групп использовали тест Краскела – Уоллиса с апостериорным тестом Данна. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Положение, выносимое на защиту

Однократное внутривенное введение аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного рекомбинантными генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, оказывает положительное влияние на посттравматическую регенерацию спинного мозга у свиней с контузионной травмой в нижнегрудном отделе, проявляющееся сдерживанием развития вторичных повреждений, а именно увеличением экспрессии синаптических белков, снижением астроглиоза и ростом числа олигодендроцитов в поясничном утолщении спинного мозга, а также морфологической сохранностью периферических нервов и скелетных мышц задних конечностей и восстановлением двигательной активности животных.

Степень достоверности

В настоящем исследовании для достижения поставленных задач были использованы современные морфологические, функциональные и статистические методы исследования.

Апробация результатов исследования

Основные результаты диссертационного исследования были представлены и обсуждены на: 28-й Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 2021); 8-й Международном молодежном научном медицинском форуме «Белые цветы» (Казань, 2021); 5-м национальном конгрессе по Регенеративной Медицине (Москва, 2022); научно-практической

конференции «Вопросы морфологии XXI века: инновационные технологии в исследованиях, диагностике и преподавании» (Санкт-Петербург, 2022); 10-м Международном молодежном научном медицинском форуме «Белые цветы», посвященном 150-летию С. С. Зимницкого (Казань, 2023); 11-м Международном молодежном научном медицинском форуме «Белые цветы» посвященном 150-летию Н. А. Семашко (Казань, 2024).

Диссертационная работа апробирована на заседании научной проблемной комиссии «Фундаментальные медицинские и биологические науки» ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России (Казань, 2025).

Внедрение результатов исследования

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс кафедр гистологии, цитологии и эмбриологии и оперативной хирургии и топографической анатомии ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Публикации

По теме диссертации опубликованы 14 научных работ, в том числе 2 патента на изобретение и 4 статьи в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и систем цитирования Scopus и Web of Science, из них 2 статьи в научных журналах и изданиях, включенных в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук.

Объем и структура работы

Диссертационная работа представлена в виде специально подготовленной рукописи и оформлена в соответствии с требованиями ГОСТ Р 7.0.11-2011.

Диссертация изложена на 142 страницах машинописного текста и состоит из

введения, 4 глав, заключения, выводов, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы. Список литературы представлен 262 источниками, из которых 255 в зарубежных изданиях. Полученные результаты проиллюстрированы с помощью 9 таблиц и 26 рисунков.

Личный вклад автора

Диссертант лично принимал участие в планировании дизайна эксперимента, формулировании целей и задач исследования. Соискатель самостоятельно выполнил экспериментальную часть работы: забирал биологический материал, готовил гистологические препараты, анализировал и проводил статистическую обработку полученных данных, готовил к печати статьи и тезисы по результатам выполненных работ. Текст диссертации, положение, выносимое на защиту, и выводы исследования подготовлены лично диссертантом.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Позвоночно-спинномозговая травма

Позвоночно-спинномозговые травмы, вызывающие временные или необратимые изменения функций спинного мозга (СМ), характеризуются широкой распространенностью, очень высокой стоимостью лечения и значительным уровнем инвалидизации [21]. Повреждения СМ могут быть вызваны травмами позвоночника высокой степени тяжести, полученными вследствие дорожно-транспортных происшествий, падения с большой высоты, что приводит к перелому позвоночника или смещению позвонков. Кроме того, повреждения позвонков могут быть следствием инфекций и опухолей и, в связи с этим подразделяются на травматические и нетравматические [202]. Согласно литературным данным, в целом у 40 % пациентов травма позвоночника сопровождается повреждением СМ. Наибольшее число травм позвоночника, сопровождающихся неврологическим дефицитом, отмечается при переломах шейного отдела (до 34 % всех случаев позвоночно-спинномозговой травмы), 26 % – при переломах грудного отдела позвоночника и 19 % – при переломах поясничных позвонков [7]. По данным последних отчетов NSCISC (от англ. National Spinal Cord Injury Statistical Center – Национальный центр статистики травм спинного мозга) при университете Алабамы (Бирмингем), с 2010 г. структура причин повреждений СМ резко изменилась и выглядит следующим образом: 38 % – в результате дорожно-транспортных происшествий, 30,5 % – в результате падений, 13,5 % – в результате насильственных действий, 9 % – при занятиях спортом и 9 % – другие причины [205]. Повреждения структур СМ, связанные с травмой, чаще встречаются у мужчин, чем у женщин – 79,8 % и 20,2 %, соответственно. Первый пик случаев ТСМ приходится на лиц в возрасте от 15 до 29 лет; второй пик регистрируется у пациентов старше 50 лет [243]. Повреждения позвоночника и СМ занимают ведущее положение в структуре травматизма мирного времени и составляют 17 % от всех повреждений опорно-двигательного аппарата. Ежегодно в России такую

травму получают 8 тыс. человек, и в 10–12 % случаев повреждения затрагивают два и более сегмента спинного мозга, множественные повреждения встречаются у 34 % таких пациентов [5]. Последствия травмы спинного мозга (ТСМ) в значительной степени зависят от тяжести и степени его повреждения [111].

Для классификации тяжести повреждения СМ чаще всего используется шкала нарушений ASIA (от англ. American Spinal Injury Association impairment scale – импактная шкала американской ассоциации спинальной травмы), которая представляет собой международный стандарт билатерального исследования дерматомов и миотомов определенных сегментов СМ и аноректальное обследование пациентов с ТСМ. Для определения чувствительных функций у пациента проводится билатеральное обследование 28 дерматомов (от С2 до S4-5) путем оценки чувствительности к легкому прикосновению (обычно медицинской ватой) и к укалыванию иглой, причем каждое обследование регистрируется по трехзначной шкале (0–2 балла). Оценка двигательной активности пациентов заключается в тестировании пяти групп мышц верхних и нижних конечностей, соответствующих основным шейным (С5-Т1) и поясничным (L2-S1) миотомам. Сила мышц оценивается по универсальной шестибалльной шкале (0–5 баллов) и регистрируется билатерально для каждой группы мышц. На основании результатов этих обследований устанавливают уровень, степень тяжести травмы и полноту (полное/неполное) повреждения СМ. Полное повреждение спинного мозга определяется как отсутствие всех двигательных и чувствительных функций, включая крестцовые корешки, дистальнее места травмы. Такие повреждения СМ относят к классу А по шкале ASIA. К неполным повреждениям СМ относятся травмы с некоторой степенью сохранности двигательной и/или чувствительной функций ниже места повреждения и распределяются по шкале ASIA от В до D. Пациенты с ТСМ класса В обладают некоторой чувствительной функцией, но лишены подвижности. Класс С характеризуется наличием двигательной функции с оценкой менее 3 баллов ниже неврологического уровня травмы, а у класса D оценка этой функции составляет не менее 3 баллов. Также выделяют класс Е с сохраненными чувствительными и двигательными функциями, но у данных пациентов могут

наблюдаться отклонения при тестировании рефлексов [186].

Согласно вышеописанной шкале нарушений у 15 % пострадавших наблюдается отсутствие чувствительности и возможности к движению (класс А). Сохранение дистальной чувствительности с отсутствием двигательной функции отмечается в 3 % случаев таких травм (класс В). У 6 % пострадавших отмечается частичная сохранность двигательных функции, но они не являются эффективными (класс С). В 8 % случаев наблюдается полезная двигательная функция (класс D). В остальных случаях наличие неврологического дефицита не отмечается (класс E). Улучшение клинического исхода на один или более пунктов по шкале ASIA в период стационарного лечения наблюдается лишь у 39 % пациентов [7].

Для определения полноты повреждения СМ необходимо верифицировать развитие спинального шока, который характеризуется как временное состояние вялого паралича после ТСМ, включающее потерю двигательных, чувствительных функций и рефлексов в месте травмы или ниже [186]. Такое состояние может повлиять на корректность первичного неврологического осмотра, цель которого – определение степени тяжести ТСМ. Однако точно понять, когда пациент перестает испытывать спинальный шок, достаточно сложно [243].

Состояния, при которых происходит потеря способности двигаться или ощущать часть тела, классифицируют как тетраплегия и параплегия. Тетраплегия возникает при ТСМ в шейных сегментах СМ и характеризуется полной потерей функций туловища, тазовых органов, верхних и нижних конечностей, тогда как параплегия характеризуется выпадением функций туловища, нижних конечностей, тазовых органов и связана в первую очередь с повреждением грудных и поясничных сегментов СМ [125]. На основании клинических проявлений ТСМ выделяют следующие синдромы: центромедулярный синдром – является наиболее распространенным и составляет около 9 % травматических ТСМ, в этом случае повреждение встречается только в шейном отделе и характеризуется выраженной слабостью в верхних конечностях; переднемедулярный синдром – встречается в 2,7 % случаев таких травм, и при данном синдроме происходит выпадение двигательной функции и теряется чувствительность к боли и температуре; синдром

Броун-Секара – составляет 1–4 % случаев ТСМ и характеризуется потерей двигательной функции и проприоцептивной чувствительности на ипсилатеральной стороне и выпадением болевой и температурной чувствительности на контралатеральной стороне; синдромы поражения конуса и конского хвоста – составляют менее 1 %, в случае данных синдромов отмечается вялый паралич нижних конечностей с выраженной арефлексией мочевого пузыря и кишечника [205].

В настоящее время методы терапии ТСМ являются ограниченными и прежде всего направлены на диагностику и хирургическое вмешательство на как можно более ранних этапах развития травмы с целью предотвращения возможной потери неврологических функций. Однако продолжающиеся процессы повреждения, такие как гибель нейронов и глиальных клеток, последующая демиелинизация, образование астроглиальных рубцов и кистозных полостей приводят к прогрессирующей нейродегенерации [111].

Упомянутые состояния неврологической дисфункции в свою очередь приводят к невозможности продолжения профессиональной деятельности, что негативно сказывается на психосоциальном состоянии таких пациентов и их семей. Как правило, около 50 % таких пациентов не могут восстановить свои нормальные функции и вернуться к повседневной жизни. Невозможность эффективно помочь таким пациентам обусловлена изначально ограниченной регенераторной способностью нейронов центральной нервной системы (ЦНС), что и является важнейшей медицинской проблемой [40, 89, 129, 202, 256].

1.2 Морфофункциональные изменения при травме спинного мозга

Патогенез ТСМ включает прямое механическое воздействие на СМ (первичная травма) и последующие клеточные реакции – гибель нервных клеток, демиелинизация, окислительный стресс и формирование астроглиального рубца (вторичная травма) – на такое первичное повреждения [202].

По временным характеристиками ТСМ подразделяется на острую

(до 48 часов), подострую (от 48 часов до 14 дней), промежуточную (от 14 дней до 6 месяцев) и хроническую (более 6 месяцев) фазы [243].

1.2.1 Первичная травма спинного мозга

Травматическая ТСМ является наиболее распространенной и возникает в результате механического воздействия, приводящего к перелому или смещению позвонков, что в свою очередь затрагивает структуры СМ и называется первичной травмой [162]. Такое механическое действие вызывает прямое повреждение структур нервной ткани и сосудистой сети, что в свою очередь приводит к острой дисфункции клеток и их гибели. В целом описаны четыре механизма возникновения первичной травмы: (а) компрессионная травма; (б) удар с преходящей компрессией; (в) дистракция; (г) разрыв/рассечение СМ [210]. Наиболее распространенной формой первичного воздействия является компрессионная травма, которая обычно возникает при разрывных переломах позвоночного столба, когда образующиеся костные отломки сдавливают СМ. Удар с преходящей компрессией наблюдается реже, но чаще всего при гиперэкстензионных повреждениях. Дистракционные травмы возникают при расхождении двух соседних позвонков, что приводит к растяжению и разрыву позвоночного столба в осевом направлении. Наконец, травмы, связанные с разрывом или рассечением СМ, могут возникать при ранениях, сильных вывихах или смещениях острых костных фрагментов и имеют высокую вариабельность от незначительных повреждений до полной транссекции СМ [162].

Однако независимо от формы первичного воздействия на СМ все равно происходит повреждение нейронов, глиальных клеток, сосудистого русла и нарушение структуры гематоспинального барьера со всеми вытекающими последствиями. В совокупности эти процессы запускают каскад негативных изменений в нервной ткани (вторичная травма), которые приводят к дальнейшему еще большему повреждению СМ и развитию неврологических дисфункций в различных системах организма [243].

1.2.2 Вторичная травма спинного мозга

В течение нескольких минут или часов после первичной травмы продолжается дегенерация нервной ткани СМ, которую принято называть вторичной травмой СМ. В большинстве случаев степень вторичной травмы пропорциональна размерам первичных повреждений СМ. Вторичная травма сопровождается усилением проницаемости сосудов, нарушением ионного обмена, глутаматной эксайтотоксичностью, нейровоспалением и запуском образования глиального рубца [88].

Первичная травма приводит к разнообразным нарушениям сосудистых структур, что вызывает кровоизлияния и отеки в тканях СМ. Ткани СМ расположены в ограниченном пространстве, обрамленном телами позвонков, вот почему кровоизлияния, тромбоз и отек увеличивают локальное давление на нервные структуры в пределах этого ограниченного пространства, и это в конечном итоге приводит к ишемии [176]. Вышеназванные процессы, наряду с увеличением проницаемости гемато-спинального барьера и нарастающим отеком, усугубляют первичные нарушения в тканях СМ и приводят к гибели большого количества нервных клеток путем некроза или апоптоза [204]. Еще одним из отягощающих факторов вторичной травмы являются кальциевая дисрегуляция и неконтролируемый выброс глутамата из нейронов. Накопление глутамата до нейротоксического уровня в месте повреждения СМ приводит к глутаматной эксайтотоксичности, вызывающей гибель нейронов [88, 176, 204]. Продукты гибели клеток, остатки поврежденных аксонов и их миелиновых оболочек также способствуют развитию вторичной травмы СМ [46].

1.2.2.1 Микроглия

Отличительной особенностью развития вторичной травмы СМ является нейровоспаление, которое характеризуется рядом молекулярных и клеточных изменений [102]. Оно опосредовано активацией клеток микроглии и притоком

других иммунокомпетентных клеток в очаг травмы [202]. Количество активированных клеток микроглии достигает максимума на 7 сутки после нейротравмы [83]. Известно также, что при патологических состояниях моноциты способны проходить через гематоэнцефалический барьер и дифференцироваться в клетки, подобные микроглии [22]. Активация микроглии является одной из ответных реакций на механическое повреждение нервных структур СМ, и она включает морфологические и функциональные изменения этих клеток с последующим разделением их на фенотипы M1 и M2 [224].

К функциональным изменениям микроглиальных клеток следует отнести способность к активной миграции и секреции провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли- α (TNF- α), интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-12 (IL-12), интерлейкин-18 (IL-18), и хемокинов. Однако стоит отметить, что секреция этих факторов осуществляется клетками с фенотипом M1, а клетки с фенотипом M2 продуцируют противовоспалительные цитокины, такие как интерлейкин-10 (IL-10), и трансформирующий фактор роста-бета (TGF- β), необходимые для поддержания гомеостаза в близлежащих структурах [101]. Фенотип микроглии M2 также способствует очищению зоны травмы от клеточных остатков. Вместе с тем функциональное состояние микроглии M2 гораздо сложнее, что позволяет выделить 3 фенотипа, таких как M2a, M2b и M2c, которые стимулируются различными факторами и имеют относительно разные функции [70]. Клетки M2a являются основным фенотипом M2-микроглии, индуцируемым интерлекином 4 (IL-4) или интерлекином 13 (IL-13). Они в основном выделяют противовоспалительные и нейротрофические факторы, необходимые для восстановления и реконструкции нервной ткани после ТСМ. Клетки M2b считаются переходным фенотипом между M1 и M2a микроглией и проявляют как провоспалительные, так и противовоспалительные свойства. Фенотип M2c проявляет нейропротективные свойства и демонстрирует высокую экспрессию TGF- β , SOCS3 (от англ. Suppressor Of Cytokine Signaling 3 – супрессор сигнализации цитокинов 3) и рецептора интерлейкина IL4R- α , которые участвуют

в морфофункциональном восстановлении СМ после травмы [15].

Однако в подострой и хронической фазах ТСМ фенотип М1 становится преобладающим, что связывают с активной пролиферацией клеток микроглии и переходом фенотипа М2 в М1 [70]. Усиленная секреция клетками микроглии М1 перечисленных выше провоспалительных факторов приводит к гибели нейронов и усиливает вторичные повреждения СМ [224]. Кроме того, установлено, что активированная микроглия секретацией различных факторов, таких как ИЛ-1 α , TNF и С1q, вызывает активацию астроцитов, что приводит к их трансформации в реактивные астроциты [150].

1.2.2.2 Астроциты

В ответ на повреждение СМ астроциты так же, как и клетки микроглии, переходят в реактивное состояние, характеризующееся усилением пролиферации и секретацией медиаторов воспаления [260]. Активация астроцитов начинается в течение нескольких часов после ТСМ, а в течение 3–5 дней наблюдается их быстрая пролиферация [62]. Следует отметить, что активация астроцитов, наряду с увеличением экспрессии GFAP (от англ. **G**lial **F**ibrillary **A**cidic **P**rotein – глиальный фибриллярный кислый белок), сопровождается характерными морфологическими изменениями. Общепринято, что морфологические изменения, происходящие в астроцитах при переходе в реактивное состояние, заключаются в гипертрофии тела клетки, а также в увеличении количества и длины отростков. Эти морфологические изменения зависят от типа астроцитов, плотности их распределения и локализации в момент повреждения [173]. Вместе с тем среди реактивных астроцитов различают фенотипы А1 (провоспалительный) и А2 (противовоспалительный). При этом классификация реактивных астроцитов учитывает множество критериев, включая транскриптом, протеом, морфологию и специфические клеточные функции, а также их влияние на патологические характеристики [172]. Фенотип А1 демонстрирует повышенную экспрессию генов каскада системы комплемента, таких как С1r, С1s, С3 и С4, а также секрецию провоспалительных факторов ИЛ-1 β ,

TNF- α и NO. Было установлено, что этот фенотип реактивных астроцитов индуцируется активированными клетками микроглии, а именно фенотипом M1 [27]. Реактивные астроциты фенотипа A2 секретируют CLCF1 (от англ. Cardiotrophin-Like Cytokine Factor 1 – кардиотрофиноподобный цитокиновый фактор – 1), HIF (от англ. Hypoxia-Inducible Factor – фактор, индуцируемый гипоксией), IL-6, IL-10 и тромбоспондины, способствующие выживанию нейронов и росту нейритов [105].

Стоит отметить, что благодаря секреции TNF- α , IL-6 и MMP-9 реактивными астроцитами активируется еще большее количество астроцитов, а гипертрофия тела, удлинение и расширение отростков позволяют реактивным астроцитам формировать на границе повреждения СМ барьероподобную структуру, а именно глиальный рубец [34, 224].

Глиальный рубец формируется в течение нескольких месяцев после ТСМ [56]. Однако в формировании глиального рубца участвуют не только астроциты, но и клетки микроглии в сочетании с другими типами клеток, включая макрофаги, клетки-предшественники олигодендроцитов, фибробласты, эпендимные и эндотелиальные клетки [240].

Помимо формирования скопления с плотной организацией, клетки глиии изменяют состав внеклеточного матрикса сверхэкспрессией хондроитинсульфат протеогликанов, что оказывает негативное влияние на нервные структуры и представляет собой один из основных факторов, препятствующих регенерации аксонов, а также является одной из основных причин, по которой глиальный рубец традиционно рассматривается как негативный фактор, влияющий на восстановление СМ после его травмы [164]. Однако появление глиального рубца имеет и позитивное влияние, поскольку разграничивает поврежденную и жизнеспособную ткани в ЦНС и создает физический барьер, препятствующий увеличению области травмы [56].

1.2.2.3 Олигодендроциты

Олигодендроциты весьма восприимчивы к негативным изменениям микросреды после ТСМ, которые приводят к их некрозу, апоптозу и аутофагии. Было установлено, что гибель олигодендроцитов наступает в течение 15 минут после травмы, а их количество стремительно снижается к 7 суткам после ТСМ [224]. Некроз и апоптоз олигодендроцитов являются потенциально основными причинами демиелинизации аксонов. Гибель олигодендроцитов после ТСМ длится около 3 месяцев, после чего запускаются процессы ремиелинизации [135].

Потенциальным источником замены утраченных олигодендроцитов являются их клетки-предшественники, составляющие 5–8 % в ЦНС [202]. В ответ на ТСМ клетки-предшественники олигодендроцитов пролиферируют, а затем дифференцируются в олигодендроциты. Однако ремиелинизация – это лишь одна из функций олигодендроцитов после ТСМ, вместе с астроцитами они способствуют формированию глиального рубца, например, за счет экспрессии цитокинов, поддерживающих иммунный ответ после ТСМ [223]. Негативным фактором также являются секретируемые олигодендроцитами молекулы-ингибиторы регенерации аксонов, такие как ингибитор роста нейритов А (Nogo-A), олигодендроцит-миелиновый гликопротеин и миелин-ассоциированный гликопротеин. Эти молекулы сходятся на общем рецепторе Nogo (NgR1), который взаимодействует с трансмембранным белком LINGO-1, ограничивая рост аксонов [211].

Длительная потеря олигодендроцитов в хронической фазе ТСМ представляет собой одно из основных препятствий для эффективного функционального восстановления проводящих путей спинного мозга [180].

1.2.2.4 Эпендимоциты

Эпендимоциты – нейроэпителиальные клетки, выстилающие центральный канал СМ, среди которых присутствуют стволовые эпендимные клетки. В

патологических условиях, особенно при нарушении целостности эпендимальной области после ТСМ, стволовые эпендимные клетки способны к пролиферации и активной миграции в область повреждения [97, 106]. Активация эпендимных прогениторных клеток происходит за счет Ras-сигнальных путей и сопровождается их дифференцировкой в олигодендроциты и астроциты, которые принимают участие в формировании глиального рубца [184, 189]. Дифференцировка эпендимных прогениторных клеток в астроциты может быть обусловлена секрецией реактивными астроцитами HMGB1 (от англ. **H**igh **M**obility **G**roup **B**ox 1 – белок группы высокой мобильности 1), который также подавляет дифференцировку эпендимных прогениторных клеток в нейроны [94]. Вместе с тем скорость пролиферации и дифференцировки эпендимных прогениторных клеток напрямую зависит от тяжести повреждения СМ [189].

1.2.3 Морфологические изменения спинного мозга в удаленной от травмы области

Изменения нервных структур при травмах могут наблюдаться в областях, удаленных от первичного очага повреждения ЦНС, но функционально связанных с ним [41]. Было показано, что последствия ТСМ постепенно распространяются от эпицентра травмы в роstralном и каудальном направлениях [190]. Однако результаты исследований, посвященных состоянию нейронов в отдаленных от эпицентра травмы областях, являются противоречивыми. В одном из экспериментов дорсальная гемисекция СМ на шейном уровне показала аутофагическую гибель аксономированных руброспинальных нейронов, что сопровождалось функциональным дефицитом [28]. В другом исследовании после гемисекции СМ на уровне С2 показана выживаемость мотонейронов ниже места травмы как в острой, так и хронической фазах [167]. Сохранность мотонейронов также была показана в поясничном отделе СМ при полной трансекции на уровне Т9 грудного отдела СМ. При этом, несмотря на жизнеспособность мотонейронов в этих условиях, произошло значительное снижение их активности [161].

Важно отметить факт инфильтрации поясничного отдела СМ миелоидными клетками при травме грудного отдела СМ [123]. Инфильтрация миелоидных клеток в поясничный отдел СМ способствует высокому уровню экспрессии воспалительных цитокинов (IL-1 β , IFN γ), хемокинов (CCL2, CXCL2), медиаторов (COX-1, MMP-9) и рецепторов (CCR2, Ly6C), а также снижению секреции ростовых факторов (GDNF, BDNF), что в конечном итоге препятствует нейрорегенерации и может вызвать повреждение интактных тканей [32].

Считается, что миелоидная инфильтрация после ТСМ является следствием повышения уровня MMP-9 в эпицентре травмы и в отдаленных областях. Провоспалительные цитокины и MMP-9 индуцируют астроциты и клетки микроглии к трансформации в провоспалительный фенотипы. Увеличением MMP-9 после ТСМ в грудном отделе у мышей коррелирует со снижением двигательных функций в поясничном отделе СМ [67].

Стоит также отметить, что дегенерация аксонов, проецирующихся в удаленную от травмы область, приводит к разрушению синапсов и неврологическому дефициту. Астроциты реагируют на дегенерацию аксонов и устранение синапсов, переходя в реактивное состояние, при котором вырабатывают различные хондроитин сульфат протеогликаны, которые подавляют рост аксонов и оказывают негативное действие на нервную ткань. Кроме того, реактивные астроциты и клетки микроглии выделяют многочисленные провоспалительные и нейротоксические молекулы, которые активируют воспалительные сигнальные пути в нейронах, что приводит к повреждению синапсов и неврологическому ухудшению [41].

1.2.4 Морфологические изменения периферических нервов после травмы спинного мозга

Вследствие гибели нейронов в очаге травмы СМ происходят не только нарушение структуры белого вещества и функционирование проводящих путей СМ, но и патологические изменения в спинномозговых нервах. После повреждения

проксимальной части аксона или тела нейрона, в результате валлеровской дегенерации, происходят демиелинизация и последующее разрушение дистальной части аксонов [109, 196]. При этом сегментарное повреждение серого вещества СМ, прилегающего к эпицентру травмы, при котором гибнут двигательные нейроны выше и ниже основной зоны повреждения, также сопровождается негативными изменениями со стороны периферических нервов данных сегментов [44]. Так, в одном из исследований было показано снижение количества двигательных нейронов в эпицентре травмы и в смежных сегментах, что также соответствовало снижению количества миелиновых волокон в вентральных корешках СМ [58]. Меньшее количество миелиновых волокон было обнаружено и в образце периферического нерва у пациентов с ТСМ в шейном отделе [74]. Однако детальное морфологическое исследование периферических нервов на фоне ТСМ показало, что наиболее распространенным отклонением от нормы является утолщение и складчатость миелина наряду с демиелинизацией и снижением плотности миелина у нервных волокон большого диаметра [78]. Подобные деструктивные изменения были выявлены и при исследовании седалищного нерва у крыс с контузионной ТСМ в грудном отделе [3].

1.2.5 Морфологические изменения скелетных мышц после травмы спинного мозга

На сегодняшний день сложилось представление о множественной регуляции морфофункционального состояния скелетных мышц. Влияние нервной системы является наиболее важным компонентом в такой регуляции. Фенотипические признаки скелетных мышц развиваются и находятся под постоянным контролем со стороны двигательных нейронов – нейротрофическим контролем [2]. Так, мотонейроны контролируют реализацию эндогенной программы мышечных волокон, такие как дифференцировка, поддержание дифференцированного состояния, и модулируют мышечную пластичность в пределах границы нормы фенотипической экспрессии миогенного клеточного типа. Информационные

межклеточные взаимодействия в системе «мотонейрон–скелетная мышца» регулируют активность различных генов, определяющих фенотипические признаки обоих клеточных партнёров. Импульсная активность мотонейронов и нейрогенные молекулы (фактор роста глии, херегулин), секретируемые из нервной терминали, контролируют экспрессию генов в скелетных МВ [35, 50, 54, 63, 197]. Мышца в свою очередь синтезирует миогенные нейротрофические факторы (*Muf5*, *MyoD*), которые транспортируются в перикарион и стимулируют экспрессию некоторых специфических генов в нервных клетках [86, 108, 187].

После ТСМ гибель двигательных нейронов с последующей валлеровской дегенерацией их аксонов заканчивается распадом нервно-мышечных синапсов, что в свою очередь приводит к атрофии иннервируемых ими скелетных мышц и развитию денервационного синдрома [130]. Отсутствие стимуляции мышечных волокон со стороны двигательных нейронов безусловно лишает их возможности к сокращению и, как следствие, к нарушению двигательной активности мышцы [145]. Стоит также отметить, что повышенный протеолиз, снижение синтеза белка и уменьшение регенераторных возможностей МВ в конечном итоге приводят к атрофии денервированных скелетных мышц. Активация разнообразных протеолитических путей, таких как убиквитин-протеасомная система, аутофаголизосомный путь и кальпаины, вносит значительный вклад в атрофию скелетных мышц [103]. Так, после ТСМ убиквитин-протеасомные системы путем деградации внутриклеточных белков способствуют катаболизму скелетных мышц, а повышенная экспрессия и активность кальпаина, связанная с повреждением митохондрий, вызывает деструктивные процессы в скелетных мышечных волокнах [42]. На поздних стадиях денервации происходит разрастание соединительной ткани, возникают застойные явления в сосудах, развивается жировая дегенерация мышечной ткани [2]. Вследствие этого пациенты с полной ТСМ могут терять до 20–55 % мышечной массы, в то время как пациенты с неполным повреждением СМ теряют от 20 до 30 % [198]. Атрофия скелетных мышц характеризуется не только уменьшением мышечной массы, но и снижением площади поперечного сечения МВ, например, в передней большеберцовой мышце крыс с ТСМ в нижнегрудном

отделе [48, 200].

Вместе с тем существует возможность трансформации МВ из одного типа в другой, что лежит в основе феномена пластичности фенотипа скелетных мышц, который определяется дифференциальной активностью генов. Показано, что при разных функциональных и патологических состояниях фенотипические признаки скелетных мышц могут изменяться в широких пределах [2].

Так, в условиях ТСМ наблюдаются и видимые изменения распределения различных типов волокон, а именно увеличение количества МВ типа IIb (быстрых, высокогликолитических) при уменьшении содержания МВ типа I (медленных, окислительных) и типа IIa (смешанных), что приводит к развитию повышенной утомляемости этих мышц [163]. В исследовании камбаловидной мышцы у крыс с ТСМ грудного отдела на фоне снижения мышечной массы было показано снижение количества волокон типа I и трансформация МВ-волокон в быстрые [120, 185].

1.3 Существующие методы лечения травмы спинного мозга

1.3.1 Хирургическая декомпрессия

Как было описано ранее, наиболее частой непосредственной причиной повреждения СМ при травме является его компрессия и контузия, которые запускают описанный выше каскад морфофункциональных событий. Как можно более раннее устранение физических повреждающих факторов, оказывающих негативное воздействие на СМ при его травмировании, является важнейшей целью нейрохирургов для сохранения неповрежденных тканей СМ и обеспечения возможности посттравматической нейрорегенерации [114].

Экспериментальные данные и клинические наблюдения подтверждают предположение о том, что операция по декомпрессии СМ после его травмы в какой-то мере сдерживает развитие первичных повреждений и улучшает общий неврологический исход. Следует отметить, что хирургическая возможность минимизации развития негативных последствий после ТСМ обратно

пропорциональна времени, прошедшему с момента травмы [201]. Так, анализ результатов STASCIS (от англ. Surgical Timing in Acute Spinal Cord Injury Study – сроки хирургического вмешательства при острой травме спинного мозга) при исследовании 313 пациентов с ТСМ в области шеи показал, что ранняя декомпрессионная операция (проведенная в течение 24 часов после получения травмы) увеличила вероятность улучшения состояния пациентов с ТСМ на 2 балла по шкале ASIA, по сравнению с теми, которые получили хирургическую помощь на более поздних сроках (более чем через 24 часа после травмы) [114]. Причем, пациенты, перенесшие раннюю спинальную операцию после ТСМ, имели более высокие результаты неврологического восстановления и меньшие сроки госпитализации [20]. Это было подтверждено при исследовании 1 031 пациента, где было показано лучшее восстановление двигательных и чувствительных функций после ранней хирургической декомпрессии СМ в течение 1 года наблюдения [226]. Кроме того, после проведенной хирургической декомпрессии у таких пациентов отсутствует увеличение частоты послеоперационных осложнений [65].

1.3.2 Регулирование артериального давления

После острой ТСМ у пациентов часто развивается гипотония, которая имеет несколько причин, включая гиповолемию вследствие кровопотери, отсутствие оттока венозной крови в пределах парализованной атонической мускулатуры и брадикардию. Гипотония может быть вызвана также вазодилатацией в результате потери симпатического тонуса, что способствует развитию нейрогенного шока. Ожидаемо, что нейрогенный шок развивается у таких пациентов при уровне травмы выше Т6, поскольку при такой его локализации происходит нарушение импульсации по нервам симпатической нервной системы, играющим важную роль в поддержании сосудистого тонуса [96, 104, 258].

Следует отметить, что гипотония усугубляет ишемию СМ и, таким образом, усиливает первичные повреждения [115]. Для минимизации последствий

нейротравмы в клинике был предложен фармакологический способ повышения артериального давления (АД) за счет поддержания объема крови и вазопрессоров [124]. Существуют убедительные доказательства того, что предотвращение развития гипотонии в острой фазе после травмы улучшает общую картину неврологического восстановления и снижает смертность. Основываясь на существующих в основном ретроспективных данных, Американская ассоциация хирургов-неврологов рекомендует поддержание среднего артериального давления у пациентов на уровне 85–90 мм рт. ст. в течение первых 7 дней после травмы [9].

1.3.3 Фармакологические средства

Однако декомпрессия и предотвращение гипотонии нельзя назвать полноценными методами терапии, поскольку первичные повреждения носят многообразный характер и, следовательно, для их преодоления также необходимы комплексные, в том числе и фармакологические подходы.

1.3.3.1 Метилпреднизолон

Последующий после ТСМ временной период предоставляет собой терапевтическое окно, которое можно использовать для сдерживания негативных воздействий первичного повреждения. В нескольких исследованиях изучалось влияние метилпреднизолона (синтетический глюкокортикоидный препарат) в условиях ТСМ и был установлен ряд положительных эффектов препарата в месте повреждения СМ, включая ингибирование перекисного окисления липидов, снижение экспрессии ФНО- α , ингибирование активности провоспалительных транскрипционных факторов, таких как активирующий белок-1 (AP-1) и NF- κ B, уменьшение количества макрофагов из периферической крови и клеток микроглии, а также сдерживание гибели клеток нейроглии и деградацию миелина [134, 220, 231].

В течение последнего десятилетия эффективность данного вида препаратов

при лечении острой ТСМ у пациентов была изучена более подробно. В 2017 году было проведено клиническое исследование, включавшее в себя анализ результатов лечения 160 пациентов с острой ТСМ, получавших метилпреднизолон. В ходе исследования было установлено, что препарат не оказывает негативного воздействия на организм, независимо от возраста, пола, расы, веса, уровня расположения травмы и наличия хирургического вмешательства, но в то же время и не способствует улучшению исхода по уровню двигательной активности и неврологических показателей по шкале ASIA. В итоге, авторы исследования заключили, что метилпреднизолон не следует применять в качестве лечебного средства при ТСМ из-за отсутствия его эффективности [246].

В 2019 году группа других ученых провела анализ результатов 16 исследований, посвященных применению высоких доз метилпреднизолона при лечении острой ТСМ. В анализ были включены 1863 пациента, получавших метилпреднизолон после ТСМ. В результате было документировано отсутствие улучшения двигательных функций и восстановления чувствительности по шкале ASIA. Однако это исследование, в отличие от предыдущих, продемонстрировало и многочисленные негативные побочные эффекты этого препарата, включая увеличение частоты желудочно-кишечных кровотечений, развития инфекций дыхательных путей, вплоть до увеличения риска развития пневмонии и возникновению гипергликемии, что в конечном итоге, по мнению авторов, должно привести к отказу от терапии ТСМ метилпреднизолоном [95]. Тем не менее метилпреднизолон и ныне остается распространенным препаратом, используемым в большинстве лечебных учреждений при лечении пациентов с ТСМ, несмотря на многочисленные доказательства его неэффективности.

1.3.3.2 Рилузол

Современные методы лечения пациентов с ТСМ включают применение препарата рилузола (рилутек), обладающего антиноцицептивным и антиспастическим действиями. Этот препарат одобрен Управлением по

санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) и считается безопасным и эффективным лекарственным средством для лечения пациентов с боковым амиотрофическим склерозом (БАС) [194]. Нейропротекторный эффект рилузола связывают с его ингибирующим действием на натриевые каналы, повышенная активность которых вовлечена в патогенез гибели двигательных нейронов ЦНС [20].

В 2010–2011 гг. в клиническом испытании рилузола участвовали 36 пациентов с ТСМ в острой фазе (28 пациентов с ТСМ на уровне шейного и 8 пациентов на уровне грудного отделов). По шкале ASIA у пациентов с ТСМ шейного отдела на фоне проводимого лечения показано значительное улучшение, по сравнению с контрольной группой [121]. Клинические испытания рилузола, начатые в октябре 2013 года при лечении пациентов с ТСМ в острой фазе, не достигли заранее установленной точки эффективности этого препарата, что связывают с недостаточной мощностью испытаний. Однако в ходе вторичного анализа у подгруппы пациентов с ТСМ в шейной области (ASIA класса А, В и С), получавших рилузол, было обнаружено улучшение функционального восстановления [192]. Таким образом, клиническая эффективность применения рилузола при ТСМ все еще остается не до конца определенной. Можно надеяться, что результаты всестороннего исследования могли бы определить целесообразность применения рилузола для терапии пациентов с ТСМ, который в настоящее время пока не рекомендован.

1.3.3.3 Миноциклин

Возможность уменьшения после ТСМ интенсивности воспалительного ответа фармакологическими препаратами является одним из наиболее адекватных и перспективных подходов к достижению эффективности терапии таких пациентов, так как снижение уровня воспалительных реакций в этих условиях является ключевым фактором сдерживания формирования вторичного повреждения. Одним из таких препаратов, способных уменьшать интенсивность процессов воспаления,

является антибиотик миноциклин, обладающий противовоспалительным и одновременно нейропротекторным свойствами [162]. Миноциклин ингибирует выработку активированными клетками микроглии воспалительных цитокинов, таких как TNF- α и IL-1 β . Кроме того, этот препарат снижает активность таких ферментов, как iNOS, циклооксигеназа-2 (COX-2) и MMPs, что также вносит свой вклад в уменьшении количества факторов, повреждающих нейроны [149]. В группе пациентов с ТСМ на уровне шейного отдела позвоночника, получавших миноциклин, было зарегистрировано частичное неврологическое восстановление по шкале ASIA, приближенное к статистически значимым различиям при сравнении с группой плацебо [165]. Однако, несмотря на установленную эффективность, данный препарат не используют в клинике.

1.4 Генная терапия

Перспективной технологией лечения различных заболеваний является генная терапия, которая предполагает экзогенную доставку генов в клетки с терапевтической целью при их отсутствии или же сниженной экспрессии [31]. Однако эффективность генной терапии напрямую зависит от системы доставки генов [252]. Доставку генетического материала можно осуществлять с помощью вирусных или невирусных векторов (прямая генная терапия) или при помощи клеточных носителей (клеточно-опосредованная генная терапия). В обоих случаях целью является доставка терапевтического гена в целевую ткань или орган [216].

Повышение уровня нейротрофических факторов в области нейродегенерации оказывает положительное влияние на нейропластичность СМ. По этой причине многие исследования в области генной терапии ТСМ сосредоточены на использовании различных нейротрофических факторов [198].

1.4.1 Нейротрофические факторы

Поиск новых методов лечения ТСМ направлен на снижение негативных последствий, развивающихся в результате вторичных повреждений СМ, усугубляющих нарушения чувствительных и двигательных функций. Поэтому с целью морфологического и функционального восстановления СМ после его травмы используют различные нейротрофические факторы [60]. Нейротрофические факторы участвуют в нейрогенезе и поддерживают оптимальную среду в развивающихся нервных структурах. При возникновении любых негативных изменений в ЦНС происходит секреция нейротрофических факторов для поддержания структурной и функциональной пластичности нейронов, однако такие компенсаторные усилия часто оказываются недостаточно эффективными [57]. Отсутствие явного терапевтического эффекта связано в том числе с ограниченной концентрацией необходимых нейротрофических факторов в месте повреждения СМ. Так, эффективная и постоянная доставка экзогенных нейротрофических факторов в место повреждения СМ является наиболее адекватной мерой для морфофункционального восстановления нервных структур после ТСМ [212]. Выбор нейротрофического фактора или их комбинации для сдерживания гибели нейронов и изменения фенотипа клеток нейроглии зависит от чувствительности конкретной популяции клеток к определенным факторам [60]. В ряде исследований сообщалось, что BDNF (от англ. brain-derived neurotrophic factor – мозговой нейротрофический фактор), NT-3 (от англ. neurotrophin-3 – нейротрофин-3), GDNF (от англ. glial cell line-derived neurotrophic factor – глиальный нейротрофический фактор), VEGF (от англ. vascular endothelial growth factor – сосудистый эндотелиальный фактор роста) усиливают регенераторный эффект как в различных моделях на животных, так и у пациентов с нейровоспалительными и нейродегенеративными заболеваниями [151].

Мозговой нейротрофический фактор относится к семейству нейротрофинов, играющих важную роль в выживании и дифференцировке различных нейронов в процессе развития [34]. Причем BDNF необходим для поддержания

жизнеспособности дофаминергических, ГАМК-ергических, холинергических и серотонинергических нейронов [233]. Он является одним из наиболее изученных нейротрофических факторов, секретируемых нейронами и глиальными клетками. Свои функции опосредует через рецептор тирозин киназы В (TrkB), стимулируя внутриклеточные сигнальные каскады, приводящие к синаптической пластичности, выживанию клеток и росту и разветвлению аксонов [47]. Так, в исследованиях на крысах с ТСМ было показано, что BDNF снижает количество клеток, вступивших в апоптоз, способствует регенерации аксонов, а также обладает мощным антиоксидантным действием [60]. В эксперименте на мышях с контузионной ТСМ после введения BDNF было обнаружено улучшение восстановления двигательных функций и увеличение экспрессии противовоспалительных факторов [71].

Широко распространенным белком семейства нейротрофинов в ЦНС является NT-3. Благодаря связыванию с рецепторами тирозин киназы С (TrkC), NT-3 может модулировать выживание, стимулировать рост, дифференцировку нейронов и формирование синапсов [91, 248]. Показано также, что интраспинальное введение NT-3 крысам с ТСМ положительно влияет и на пролиферацию олигодендроцитов [156].

Глиальный нейротрофический фактор (GDNF) представляет собой класс ростовых факторов, которые имеют важное значение для развития, поддержания и регенерации в центральной и периферической нервной системах [236].

Секреция GDNF происходит в астроцитах, олигодендроцитах, шванновских клетках и нейронах, однако со временем экспрессия гена GDNF снижается [137]. Передача сигнала осуществляется через рецепторы тирозин киназы RET (**RE**arrangedin **T**ransfection), однако взаимодействие GDNF происходит не напрямую, а через ко-рецептор GFR α (от англ. GDNF **F**amily **R**еceptor α – GDNF семейство рецепторов альфа) [112]. Преимущественно рецепторы GDNF экспрессируются в нейронах передних рогов СМ [60]. Нейропротекторное действие GDNF заключается в подавлении агрессивного фенотипа M1 микроглии, снижении секреции TNF- α и iNOS и увеличении выработки противовоспалительных IL-10,

IL-4 и TGF- β 1 [84]. Кроме того, в различных моделях ТСМ установлено, что GDNF сдерживает гибель двигательных нейронов, усиливает ремиелинизацию аксонов и, таким образом, способствует восстановлению двигательной активности [60, 139]. GDNF также снижает проницаемость гематоспинального барьера, что в свою очередь уменьшает отек СМ после его травмы и оказывает поддерживающее влияние на функциональное состояние нервных структур СМ [222].

Сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) изначально позиционировался лишь как ангиогенный фактор, который воздействует на сосудистую систему путем стимулирования васкуло- и ангиогенеза. В настоящее время существует множество данных, указывающих на то, что VEGF также является нейротрофическим фактором [23, 188]. Существует пять основных представителей семейства VEGF: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и плацентарный фактор роста, которые связываются через специфические тирозинкиназные рецепторы (TKRs) – VEGF-R1, VEGF-R2 и VEGF-R3 [13, 235]. Стимулирование посттравматического восстановления СМ достигается доставкой разных изоформ VEGF (VEGF-A165, VEGF-A121, VEGF-A189) отдельно или в комбинации с другими факторами роста, например, с PDGF (от англ. platelet-derived growth factor – фактор роста тромбоцитов), FGF2 (от англ. fibroblast growth factor 2 – фактор роста фибробластов-2), ANG1 (от англ. angiopoietin-1 – ангиопоэтин-1) при помощи вирусных векторов или же прямого введения в эпицентр травмы СМ [14, 24, 49, 92, 168, 213, 250]. Комбинированная доставка VEGF с другими ростовыми факторами у крыс приводила к увеличению плотности кровеносных сосудов, снижению проницаемости гематоспинального барьера и улучшению кровоснабжения в СМ после его травмы [23]. В другом исследовании на крысах также было показано влияние VEGF на сохранность нейронов при ТСМ, что в свою очередь сопровождалось функциональным восстановлением СМ [66].

Нейрональная молекула клеточной адгезии (NCAM1 – от англ. neural cell adhesion molecule 1) принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов и играет важную роль в направленном росте аксонов, синаптогенезе, нейропластичности как в нейроонтогенезе, так и при нейрорегенерации [33, 37, 64]. В нервной системе

позвоночных в результате альтернативного сплайсинга образуются различные изоформы NCAM1 (NCAM-120, NCAM-140 и NCAM-180), которые демонстрируют разные паттерны экспрессии и функции [75].

У трансгенных мышей с дефицитом экспрессии NCAM было показано сниженное восстановление двигательных функций и большее количество клеток, вступивших в апоптоз в сером и белом веществе СМ после его травмы, при сравнении с мышами дикого типа с TCM. Дефицит экспрессии NCAM у мышей после TCM сопровождался нарушением синаптического ремоделирования и увеличением площади глиального рубца [99, 144].

В исследовании на свиньях было показано, что интратекальное введение генетически модифицированных моноклеарных клеток крови пуповины, сверхэкспрессирующие рекомбинантные гены, кодирующие VEGF165, GDNF и NCAM1, способствовало сдерживанию развития астроглиоза, поддержанию миелинизации и восстановлению функциональной активности нейронов после TCM у свиней [1].

Стоит также отметить и другие нейротрофические факторы, которые используют для стимулирования нейрорегенерации. Например, фактор роста нервов (NGF) после TCM может поддерживать выживание нейронов, ремоделирование нейронной сети, рост аксонов и образование синапсов, тем самым стимулируя регенерацию нервов, что способствует восстановлению двигательной функции [155]. Фактор роста фибробластов (FGF), который участвует в регуляции различных аспектов развития нервной системы, таких как рост аксонов и синаптогенез, также оказывает положительное влияние на регенерацию аксонов после TCM [77]. Цилиарный нейротрофический фактор (CNTF) способствует сохранности поврежденных аксонов [202].

1.4.2 Генетические вектора

Генетические векторы на основе репликативно-дефектных вирусных конструкций широко применяются в генной терапии, поскольку обладают высокой

эффективностью трансдукции клеток-мишеней. Наиболее широко используемыми вирусными векторами для доставки терапевтических генов являются аденовирусы, аденоассоциированные вирусы и лентивирусы, относящиеся к роду ретровирусов [230].

Вирусные векторы легко проходят через клеточные мембраны, доставляя генетический материал в ядро, где он может быть транскрибирован в мРНК и впоследствии клеткой будет произведен рекомбинантный белок с заданными свойствами [81]. Однако существуют факторы, ограничивающие их применение в клинической практике, такие как иммуногенность, токсичность, канцерогенность и широкий тропизм [80].

1.4.2.1 Аденовирусы

Аденовирусы (Ad) относят к ДНК содержащим вирусам, которые способны к эффективной трансдукции как делящихся, так и неделящихся клеток. Такой тип вирусных векторов не интегрируется в геном клетки-хозяина, а экспрессия трансгена (до 7,5 тысяч пар нуклеотидов) в организме хозяина является временной в течение 3 недель [116, 253]. Отсутствие интеграции вирусных частиц в геном хозяина снижает риск мутагенеза, что является преимуществом с точки зрения безопасности их применения в медицине для генной терапии и создания вакцин [17]. Известно более 60 серотипов Ad, наиболее широко используют аденовирусы 5 серотипа (Ad5), доля которого в различных клинических испытаниях составляет около 26 % среди всех вирусных векторов [53, 55, 252].

Национальным исследовательским центром эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи была разработана комбинированная вакцина Спутник V (Гам-КОВИД-Вак) для профилактики коронавирусной инфекции COVID-19 на основе рекомбинантных Ad5 и 26 серотипов, несущих ген S-белка коронавируса SARS-CoV-2 [169, 183, 191, 193]. Положительное влияние Ad5, несущих терапевтические гены NT-3 и BDNF, на рост аксонов, сохранность нейронов и восстановление локомоторных функций задних конечностей было

показано у экспериментальных животных с различными моделями ТСМ [177].

Существуют прямые и непрямые способы доставки Ad, несущих терапевтические трансгены в ЦНС. К прямым относят интрацеребровентрикулярный, интрапаренхимальный или же интратекальный способы доставки. Хотя эти методы и приводят к экспрессии трансгенов, но они достаточно инвазивны, что увеличивает риск распространения и усугубления повреждений в ЦНС, включая некроз и апоптоз [177]. К непрямым методам относят внутримышечную доставку Ad, которая предполагает интернализацию вирусных частиц в периферические нервные окончания с последующим ретроградным транспортом в двигательные и чувствительные нейроны СМ [239].

В эксперименте прямая инъекция Ad, несущих ген GDNF, в СМ после его повреждения способствовала сохранности нейронов и восстановлению двигательной функции задних конечностей крыс [18]. Существуют данные о применении комбинации Ad, содержащих разные нейротрофические факторы. Так, при интратекальном введении одновременно трех Ad, несущих по отдельности гены VEGF, GDNF и NCAM, крысам с ТСМ был достигнут положительный эффект в отношении посттравматического ремоделирования и функционального восстановления СМ у экспериментальных животных [206].

Вместе с тем Ad имеют ряд недостатков, главными из которых являются прямое цитотоксическое действие и иммуногенность, что ограничивает их повторное использование [52, 126].

1.4.2.2 Аденоассоциированные вирусы

Аденоассоциированные вирусы (AAV) – одноцепочечные ДНК вирусы, принадлежащие к семейству *Parvoviridae*. Жизненный цикл AAV зависит от наличия вируса-помощника, такого как Ad5, в связи с чем они и получили такую таксономическую классификацию. Вместе с тем репликация AAV также возможна в случае коинфекции, например, с вирусом простого герпеса 1 типа [195, 254]. Рекомбинантный AAV, как и AAV дикого типа, сохраняет способность интеграции

в геном хозяина и обеспечивает более долговременную (более 6 месяцев), по сравнению с Ad, экспрессию трансгена [251]. На сегодняшний день выявлено 13 серотипов AAV (AAV1–AAV13) и множество дополнительных вариантов, полученных от человека, приматов и других млекопитающих [73]. Эффективность генной терапии с использованием AAV напрямую определяется выбором серотипа, что обусловлено различиями в тканевом тропизме и эффективности трансдукции [127].

Генные препараты на основе AAV широко используют в клинических исследованиях и активно внедряют в практическую медицину [249]. Так, в 2012 году Европейское агентство по лекарственным средствам (EMA) одобрило препарат на основе AAV 1 серотипа – «Глибера» (Glybera, alipogene tiparvovec) для лечения наследственного дефицита липопротеинлипазы [76]. Однако в 2017 году «Глибера» была снята с продажи из-за высокой стоимости единичной дозы препарата [259]. В последнее время Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (US FDA) одобрило целый ряд препаратов, основанных на AAV, а именно «Люкстурна» (Luxturna, Voretigene neparvovec, Spark Therapeutics, Inc.), «Золгенсма» (Zolgensma, Onasemnogene aberparvovec, Novartis Gene Therapies, Inc.), «Хемдженикс» (Hemgenix, Etranacogene dezaparvovec, CSL Behring LLC.) и «Роктавиан» (Roctavian, valoctocogene roxaparvovec, BioMarin International Limited.) [16, 252].

«Люкстурна» представляет собой генный препарат на основе AAV 2 серотипа, несущий ген *rpe65*, и показан для лечения дистрофии сетчатки, а именно врожденного амавроза Лебера 2 типа [79]. Для лечения спинальной мышечной атрофии I типа у детей в 2019 году US FDA одобрила препарат «Золгенсма» на основе AAV 9 серотипа, предназначенного для доставки гена *smn1* [113]. На основании данных III фазы клинических исследований, препарат «Роктавиан» – AAV 5 серотипа, экспрессирующий комплементарную ДНК фактора свертывания VIII с удаленным доменом В, был одобрен US FDA для терапии пациентов с тяжелой формой гемофилии А. Препарат «Хемдженикс» на основе на AAV 5 серотипа, экспрессирующего трансген высоко активного фактора

свертывания крови IX, применяют для лечения пациентов с тяжелой формой гемофилии В [90].

В экспериментальных и доклинических исследованиях AAV используют также с целью стимулирования регенерации в поврежденном СМ путем усиления экспрессии прорегенераторных факторов и подавления ингибирующих факторов регенерации и апоптоза [209].

Установлено, что AAV способны проникать через гематоэнцефалический барьер, имеют высокую эффективность трансдукции клеток нервной системы и инфицирует преимущественно нейроны, что открывает перспективы использования генетических векторов на основе AAV в качестве прямых нейрон-специфических систем доставки трансгенов в нейроны ЦНС [81]. В настоящее время особое внимание исследователей направлено на AAV девятого серотипа (AAV9), который эффективно проходит через интактный гематоэнцефалический барьер после внутривенного введения [254].

Так, в экспериментах на крысах с ТСМ в грудном отделе на фоне введения AAV 9 серотипа, несущего гены NT-3 и IGF-1, было показано улучшение двигательных функций у подопытных животных [228].

Однако применение AAV имеет ряд сопутствующих недостатков, таких как небольшая емкость вектора (до 5 тыс. пар оснований) и риск инсерционного мутагенеза [251]. Кроме того, лимитирующим фактором использования AAV является наличие нейтрализующих антител у лиц уже инфицированных AAV ранее. Эти антитела могут стимулировать выработку воспалительных молекул и вызывать активацию CD8⁺ Т лимфоцитов направленных на уничтожение AAV-содержащих клеток [252].

1.4.2.3 Lentivirus

Лентивирусные векторы (ЛВ) были изначально получены из вируса иммунодефицита человека и принадлежат к семейству *Retroviridae*. Для генной терапии ЛВ обладают рядом перспективных особенностей, таких как трансдукция

неделящихся и медленно пролиферирующих клеток, длительная экспрессия трансгена и большая емкость вектора (до 9 тыс. пар оснований) [87, 174, 257]. Однако устойчивая экспрессия трансгена ими достигается путем интеграции в геном клеток хозяина. Такая отличительная черта может стать причиной нежелательных явлений, связанных с инсерционным мутагенезом [122]. Уменьшение вероятности инсерционного мутагенеза достигается путем использования модифицированных неинтегрирующих лентивирусных векторов [153].

Широкие возможности конструирования ЛВ позволяют добиться доставки терапевтических генов в конкретные клеточные популяции и обеспечения высокого уровня трансдукции клеток ЦНС [128]. В исследованиях на мышах с моделью очаговой ишемии головного мозга было показано, что доставка GDNF с помощью ЛВ способствовало улучшению двигательной координации и спонтанной локомоторной активности наряду с усилением ремоделирования, нейрогенеза и уменьшением образования астроглиального рубца в периинфарктной области [118]. Улучшение неврологического статуса у мышей с левосторонней гемисекцией СМ на уровне С5 установлено на фоне введения ЛВ, кодирующих противовоспалительные цитокины (IL-10) [117].

Таким образом, выбор терапевтического гена, векторной системы и способа доставки трансгена в организм реципиента может зависеть от характера заболевания (наследственное или приобретенное), длительности планируемого лечения (пожизненное, в острой или хронической фазе заболевания), предполагаемого действия (местное или системное), а также поставленной цели лечения (этиотропное, патогенетическое или симптоматическое).

1.5 Клеточная терапия

Стремительный прогресс в области развития медицинских технологий значительно расширил сферу возможностей применения стволовых клеток для лечения широкого спектра неврологических расстройств [207]. Клеточная терапия

получила широкое применение в нейропротекции и регенерации нервных структур СМ, в том числе благодаря многочисленным вариантам воздействия, таких как иммуномодуляция, паракринная регуляция и модификация внеклеточного матрикса [227].

Клеточная терапия ТСМ предполагает трансплантацию эмбриональных или зрелых стволовых клеток аутологичного или же аллогенного происхождения и направлена как на замещение утраченных в результате ТСМ клеток, так и на изменение микроокружения поврежденного СМ, например, путем секреции нейротрофических факторов, способствуя регенерации СМ после его травмы [69, 171]. Наиболее изученными типами клеток, используемых для терапии ТСМ, являются нейральные стволовые клетки (НСК), мезенхимальные стволовые клетки (МСК), шванновские клетки (ШК), обкладочные нейроэпителиальные клетки (ОНК) и моноклеарные клетки пуповинной крови человека [45].

В то же время существует и ряд ограничений в использовании стволовых клеток в качестве терапии ТСМ. Одной из основных проблем трансплантации стволовых клеток является потенциальный риск развития опухолей, непредвиденное изменение фенотипа и вероятность возникновения негативных иммунных реакций. К лимитирующим факторам их использования также следует отнести низкую выживаемость трансплантированных клеток наряду с невысоким потенциалом нейрональной дифференцировки [208].

1.5.1 Нейральные стволовые клетки

Нейральная стволовая клетка (НСК) способна к пролиферации и дифференцировке как в нейроны, так и в клетки нейроглии [119]. В зрелом мозге млекопитающих НСК локализуется в субвентрикулярной зоне латеральной стенки боковых желудочков и субгранулярной зоне зубчатой фасции гиппокампа [234].

В многочисленных исследованиях было показано, что трансплантация НСК после ТСМ снижает уровень провоспалительных цитокинов, тем самым уменьшая образование астроглиального рубца у мышей с ТСМ в грудном отделе [29]. Более

того у мышей с повреждением задних столбов СМ, нейроны, полученные из НСК, встраивались в нейрональную сеть реципиента и активировались моторными и сенсорными сигналами, демонстрируя восстановление транстравматической синаптической связи [147]. В клинических испытаниях трансплантации человеческих НСК для лечения пациентов с ТСМ в хронической фазе не было выявлено нежелательных побочных эффектов, а у двух участников этого испытания показано частичное улучшение функций СМ [238].

1.5.2 Мезенхимальные стволовые клетки

На сегодняшний день мезенхимальные стволовые клетки (МСК) широко используются в клеточной терапии различных заболеваний и регенеративной медицине благодаря простоте их получения из разных тканей организма, включая костный мозг, жировую ткань, пуповинную кровь [133]. Ранее нейрорегенераторный потенциал МСК связывали с их способностью дифференцироваться в нейроны и глиальные клетки, замещающие утраченные клетки СМ [178]. Такая дифференцировка МСК возможна лишь за счет их предварительного перепрограммирования в нужном направлении *in vitro*, например, с помощью эпигенетической модификации [61]. Вместе с тем исследования *in vivo* продемонстрировали ограниченную способность МСК к направленной дифференцировке. Трансплантированные МСК не проявляли специфической для нейронов электрофизиологической активности, а их выживаемость в этих условиях была слишком мала, чтобы обеспечить регенерацию поврежденных структур СМ [138].

Данные многих исследований указывают, что терапевтическая эффективность МСК при различных видах патологии основана на секреции множества цитокинов, факторов роста и других биологически активных молекул, которые по паракринному механизму воздействуют на различные клетки и структуры СМ в области его травмы [237]. Известно, что МСК секретируют факторы роста и нейротрофические факторы, такие как BDNF, VEGF, GDNF, NGF,

FGF, NT-3, которые способствуют регенерации поврежденных структур СМ. Кроме того, продукты МСК снижают уровень апоптоза клеток и провоспалительных цитокинов, таких как IL-1, TNF- α , IL-6, IL-2, IL-4 и IL-12, что уменьшает интенсивность процессов воспаления в очаге травмы [217].

Простота получения, хорошая сохранность после криоконсервации, высокий потенциал многостадийной дифференцировки и отсутствие иммуногенности после аллогенной трансплантации являются решающими причинами использования МСК в разнообразных клинических исследованиях [132].

В серии I/II фазы клинических испытаний с применением МСК, полученных из костного мозга (КМ-МСК), были продемонстрированы безопасность их применения и отсутствие побочных эффектов [214]. Однако III фаза клинических исследований показала незначительный терапевтический эффект у пациентов с ТСМ в хронической стадии на фоне введения КМ-МСК в СМ [244].

1.5.3 Шванновские клетки

Шванновские клетки (ШК) – миелинообразующие клетки, которые отвечают за миелинизацию и регенерацию нервных отростков в составе периферических нервов. Тот факт, что ШК способны выполнять аналогичную функцию в СМ, наряду с возможностью их аллотрансплантации, служит основой применения ШК для клеточной терапии ТСМ [140]. Трансплантированные ШК создают благоприятную среду для регенерации аксонов за счет секреции трофических факторов (NGF, BDNF, CNTF и NT-3), компонентов внеклеточного матрикса (ламинин, фибронектин и коллаген) и молекул клеточной адгезии (NCAM) [181].

В эксперименте на фоне трансплантации ШК крысам с ТСМ в хронической фазе было продемонстрировано снижение образования глиального рубца, ускорение роста аксонов и их миелинизации и, как следствие этого, улучшение двигательной активности подопытных животных [242]. В I фазе клинических исследований у пациентов с ТСМ в шейном и грудном отделах после трансплантации аутологичных ШК не было выявлено побочных явлений, что

подтверждает безопасность данного вида клеточной терапии ТСМ [166].

1.5.4 Обкладочные нейроэпителиальные клетки

Обкладочные нейроэпителиальные клетки (ОНК) – специализированный тип глиальных клеток, которые окружают обонятельные нейроны и их отростки, а также способствуют их обновлению в течение жизни у млекопитающих. Такие клетки обладают некоторыми свойствами ШК и астроцитов, а их способность к интеграции в ЦНС с последующим выполнением своих физиологических функций служит основой для их использования в клеточной терапии ТСМ [157, 221]. В исследовании на крысах с ТСМ было показано, что терапевтический эффект после трансплантации ОНК достигается в том числе за счет секреции ими некоторых нейротрофических и ростовых факторов (BDNF, GDNF, NT-3, NT-4/5 и NGF), обеспечивающих как сохранности нейронов, так и регенерацию их аксонов [203]. В другом исследовании функциональное восстановление у крыс с ТСМ после трансплантации ОНК было установлено за счет повышения экспрессии VEGF и увеличения плотности кровеносных сосудов в области нейротравмы [247]. Кроме того, показано, что ОНК способны секретировать противовоспалительные цитокины, такие как IL-4, IL-10 и TGF- β , что ингибирует выработку макрофагами провоспалительных факторов и снижает интенсивность миграции иммунокомпетентных клеток в очаг травмы, тем самым эффективно сдерживая развитие воспаления [225]. Клинические исследования с использованием ОНК для терапии пациентов с ТСМ показали отсутствие осложнений и безопасность их применения [25].

1.5.5 Мононуклеарные клетки пуповинной крови

Мононуклеарные клетки пуповинной крови (МКПК) являются хорошо изученным объектом в регенеративной медицине, их применяют для терапии множества самых различных заболеваний, таких как сахарный диабет, сердечная

недостаточность, церебральный паралич, инсульт, ТСМ и т. д. Одним из явных преимуществ МКПК является присутствие среди них гетерогенных стволовых и прогениторных клеток [245]. В частности, моноклеарная фракция содержит гемопоэтические стволовые клетки, прогениторные эндотелиальные клетки, МСК и другие менее изученные стволовые клетки с плюрипотентными свойствами [8]. Доступность, простота получения и хранения, наряду с возможностью аллотрансплантации являются достаточными преимуществами для использования МКПК в регенеративной медицине [215]. Терапевтический потенциал МКПК реализуется через секрецию разнообразных ростовых факторов, стимулирующих регенерацию, и иммуномодулирующее действие, предотвращающее миграцию нейтрофилов и макрофагов в зону повреждения СМ.

В экспериментах было показано улучшение восстановления локомоторной функции задних конечностей у крыс с контузионной ТСМ на фоне однократного введения МКПК [51]. В клинических испытаниях для аллотрансплантации используют как МКПК, так и МСК, полученные из пуповинной крови (МКПК-МСК) [10]. Так, в I/II фазе клинического исследования было показано, что интратекальная доставка аллогенных МКПК-МСК пациентам с ТСМ в хронической фазе является безопасной и улучшает неврологический исход. В данной исследовании пациентам вводили 10^6 клеток/кг один раз в месяц в течение 4 месяцев [182]. В наших исследованиях у свиней с моделью контузионной ТСМ в нижнегрудном отделе было продемонстрировано восстановление двигательной активности задних конечностей и позитивное ремоделирование СМ на фоне интратекального введения генетически модифицированных МКПК, сверхэкспрессирующих VEGF, GDNF и NCAM, в комбинации с эпидуральной электростимуляцией [72].

До настоящего времени ТСМ представляет серьезную проблему здравоохранения из-за отсутствия эффективных методов ее терапии. Сложные морфофункциональные сдвиги, возникающие на фоне как первичных, так и вторичных повреждений, затрагивающие различные структуры СМ на разных сроках, являются сложным препятствием в разработке лекарственных средств и

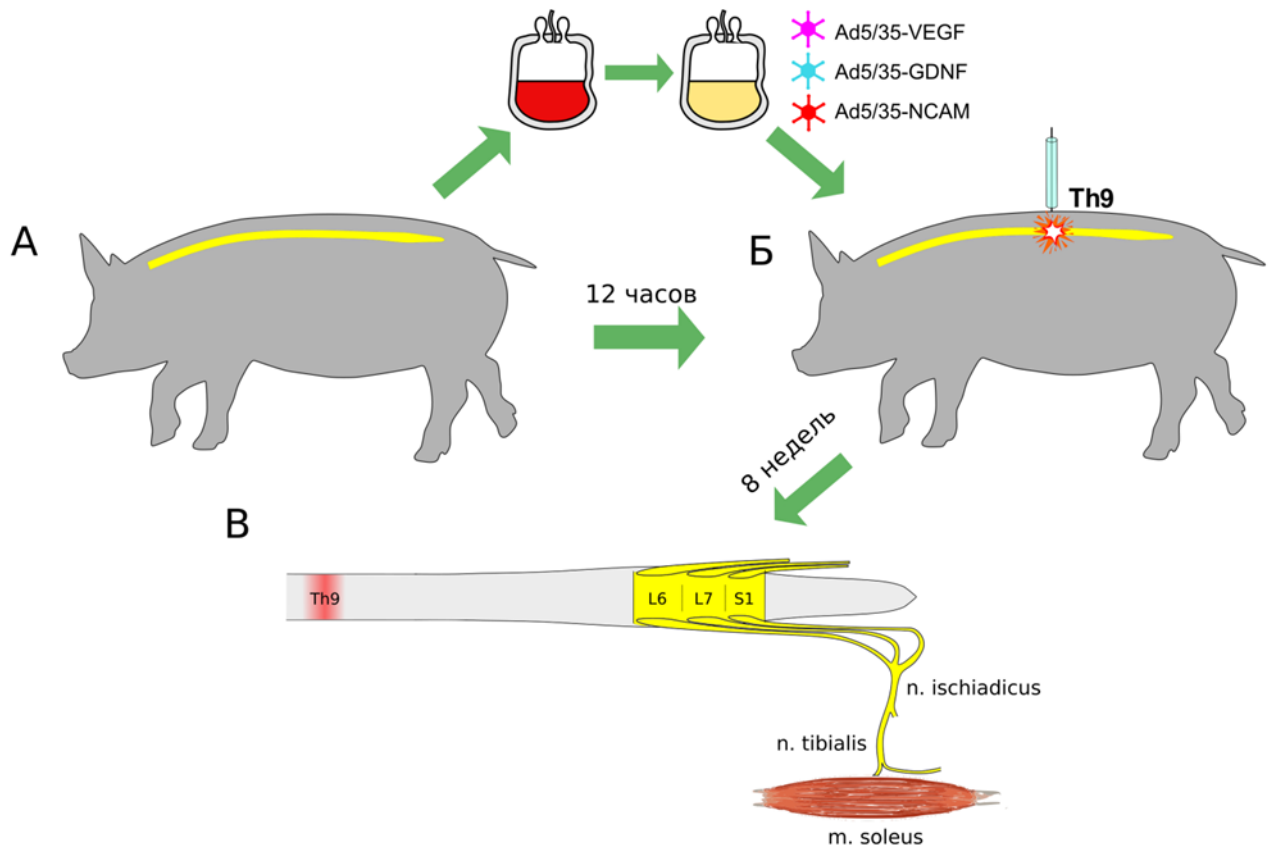
методов терапии таких травм. Применяемые методы терапии, такие как хирургическая декомпрессия СМ, регулирование АД и различные фармакологические средства не позволяют преодолеть последствия ТСМ по причине изначально ограниченной регенеративной способности СМ. Ввиду отсутствия эффективных методов терапии ТСМ необходим поиск новых способов лечения, включая современные разработки в области биотехнологии. Генная и клеточная терапии являются многообещающими направлениями в области преодоления последствий ТСМ. Однако, несмотря на убедительные доказательства их эффективности в эксперименте, клинические исследования подтверждают лишь безопасность их использования. Многообразие терапевтических генов и способов их доставки в организм пациента, сроки проведения лечения, а также вопросы безопасности генно-терапевтических препаратов остаются ключевыми факторами, которые необходимо учитывать при создании новых методов генной терапии ТСМ.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Диссертационная работа выполнена с разрешения Локального этического комитета ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол заседания № 5 от 26.05.2020). Исследование поддержано грантом РНФ № 16-15-00010.

2.1 Дизайн эксперимента

На первом этапе исследования у свиней забирали 50 мл периферической крови и готовили аутологичный лейкоконцентрат, обогащенный генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, который внутривенно вводили подопытным животным через 4 часа после моделирования контузионной травмы спинного мозга. Второй этап исследования включал в себя анализ восстановления двигательной активности животных с помощью поведенческого теста и электрофизиологического метода через 2, 4 и 8 недель после операции. На заключительном третьем этапе через 8 недель после моделирования нейротравмы животных наркотизировали и забирали поясничный отдел спинного мозга, большеберцовый нерв и камбаловидную мышцу для гистологического исследования, целью которого являлось изучение молекулярных и клеточных изменений в органах-мишенях. Эффективность функционального восстановления спинного мозга на фоне внутривенной инфузии генетически модифицированного лейкоконцентрата оценивали относительно изученных параметров у контрольных животных с нейротравмой после внутривенного введения нативного аутологичного лейкоконцентрата (Рисунок 1).



Примечание: А – Забор 50 мл венозной крови и приготовление аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генетическим материалом. Б – Моделирование контузионной травмы спинного мозга на уровне Th8-Th9 с последующим внутривенным введением аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генетическим материалом, через 4 часа после моделирования нейротравмы. В – Забор поясничного утолщения спинного мозга (L6-S1), а также большеберцового нерва и камбаловидной мышцы с обеих задних конечностей.

Рисунок 1 – Дизайн эксперимента

2.2 Получение аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*

2.2.1 Химерные аденовирусные векторы

В настоящем исследовании для обогащения аутологичного лейкоконцентрата терапевтическими генами использованы рекомбинантные репликативно-дефектные химерные вирусные векторы на основе аденовируса человека 5 серотипа (Ad5), экспрессирующего фибры аденовируса 35 серотипа (Ad5/F35). Химерные вирусные векторы наработаны в ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России (Москва, Россия) согласно договору с ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России № 18/ЭЛА/2020 от 03.08.2020 по описанной ранее методике [82, 152]. Для обогащения аутологичного лейкоконцентрата получены Ad5/F35, несущие по отдельности ген глиального нейротрофического фактора *gdnf* (Ad5/F35-GDNF), ген сосудистого эндотелиального фактора роста *vegfl65* (Ad5/F35-VEGF165) и ген нейрональной молекулы клеточной адгезии *ncam1* (Ad5/F35-NCAM1). Нуклеотидные последовательности, кодирующие VEGF165 (Gene Bank NM_001171626.1), GDNF (Gene Bank NM_000514.4) и NCAM1 (Gene Bank NM_001076682.2), синтезированы в компании Евроген (Москва, Россия). Титр генетических конструкций установлен методом бляшкообразования в клеточной линии НЕК-293 (Human Embryonic Kidney 293) и равнялся для каждого вирусного вектора следующим значениям: Ad5/35-GDNF – $7,0 \times 10^{10}$ БОЕ/мл, Ad5/35-VEGF165 – $2,0 \times 10^9$ БОЕ/мл и Ad5/35-NCAM1 – $5,0 \times 10^{10}$ БОЕ/мл.

2.2.2 Забор периферической крови

За 12 часов до моделирования нейротравмы у экспериментальных животных забирали 50 мл периферической крови из подключичной вены (*v. subclavia*)

(Рисунок 1А). Перед забором крови свиней вводили в наркоз путем инъекции тилетамина/золазепам (Zoletil 100, Virbac Laboratoires, Карро, Франция; 10 мг/кг) и ксилазина (Interchemiewerken 'De Adelaar' B.V., Кастенрэй, Нидерланды; 40 мг/кг) в трапециевидную мышцу (*m. trapezius*) с дальнейшей ингаляционной анестезией изофлураном (Laboratorios Karizoo SA, Барселона, Испания, 2–2,5 %). Кровь от каждого экспериментального животного собирали в пластиковые контейнеры, содержащие 35 мл ЦФДА-1 (раствор гемоконсерванта). Данные общего анализа крови получали с помощью гематологического автоматического анализатора Sysmex XP-300 (Sysmex Corporation, Кобе, Япония).

2.2.3 Выделение лейкоконцентрата

Процедура выделения лейкоконцентрата включала 3 последовательных этапа:

1) добавление стерильного 6 % гидроксиэтилкрахмала в контейнер с кровью в соотношении 1 : 1, центрифугирование при $50 \times g$ в течение 10 минут при 10°C с помощью центрифуги (BW21RC, Чанша, Хунань, Китай), экстракция надосадочной жидкости, содержащей лейкоциты, в новый пластиковый контейнер при помощи ручного плазмоекстрактора FK-01 (Leadcore, Екатеринбург, Россия);

2) соединение контейнера с лейкоцитами с пустым пластиковым контейнером, наложение зажима, центрифугирование при $490 \times g$ в течение 10 минут при 10°C , экстракция надосадочной жидкости из контейнера ручным плазмоекстрактором. Оставшийся в контейнере клеточный осадок считали лейкоконцентратом;

3) введение в контейнер с лейкоконцентратом стерильного физиологического раствора в соотношении 1:9, центрифугирование при $490 \times g$ в течение 10 минут при 10°C , элиминация надосадочной жидкости из контейнера ручным плазмоекстрактором. Объем полученного лейкоконцентрата довели стерильным физиологическим раствором до 30 мл. Образцы аутологичного лейкоконцентрата оценивали на гематологическом автоматическом анализаторе Sysmex XP-300 (Sysmex Corporation, Кобе, Япония).

2.2.4 Трансдукция лейкоконцентрата

Полученный лейкоконцентрат трансдуцировали химерными аденовирусными векторами в равном соотношении каждого: 1/3 Ad5/35-GDNF, 1/3 Ad5/35-VEGF165 и 1/3 Ad5/35-NCAM1. Трансдукцию лейкоконцентрата проводили в пластиковом контейнере с MOI (multiplicity of infection – множественность инфицирования) равным 10, согласно количеству лейкоцитов и титру вирусных векторов, при комнатной температуре и постоянном покачивании на шейкере. Через 10 часов в контейнер вводили стерильный физиологический раствор в соотношении 1 : 9 и центрифугировали при $490 \times g$ в течение 10 минут при $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Надосадочную жидкость удаляли с помощью ручного плазмаэкстрактора и объем лейкоконцентрата доводили стерильным физиологическим раствором до 30 мл. Полученный лейкоконцентрат, обогащенный генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncaml*, использовали для аутоинфузии свиньям после моделирования нейротравмы. Содержание форменных элементов крови в образцах генетически модифицированного лейкоконцентрата оценивали с помощью гематологического автоматического анализатора Sysmex XP-300 (Sysmex Corporation, Кобе, Япония).

2.2.5 Оценка эффективности трансдукции лейкоконцентрата

Анализ экспрессии трансгенов (*vegfl65*, *gdnf* и *ncaml*) в генетически модифицированном лейкоконцентрате выполняли с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания.

Образцы лейкоконцентрата высевали на покровные стекла, помещенные на дно лунок 10-см культурального планшета, и инкубировали в среде RPMI-1640 (ПанЭко, Москва, Россия) с 10 % эмбриональной бычьей сывороткой (FBS; Biosera, Ньюайе, Франция) и смесью 100 ед/мл пенициллина и 100 г/мл стрептомицина (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в инкубаторе содержащем 95 % O_2 и 5 % CO_2 .

Через 72 часа инкубации покровные стекла доставали из лунок, фиксировали в абсолютном спирте и проводили иммунофлуоресцентное окрашивание с помощью специфических первичных антител (АТ) к VEGF, GDNF и NCAM (Таблица 1). Для визуализации связавшихся первичных АТ применяли вторичные АТ, конъюгированные с флуорохромами (Таблица 1). Окрашенные препараты изучали с помощью люминесцентного микроскопа Axioscope A1 (Carl Zeiss, Оберкохен, Германия).

Таблица 1 – Список использованных антител

Антитела	Хозяин	Разведение	Производитель
Белок постсинаптической плотности молекулярной массой 95 кДа (PSD95)	Кролик	1 : 200	Abcam, Cambridge, UK
Глиальный нейротрофический фактор (GDNF)	Кролик	1 : 100	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP)	Мышь	1 : 200	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Ионизированная кальций-связывающая адаптерная молекула 1 (Iba1)	Кролик	1 : 150	Abcam, Cambridge, UK
Калий-хлорный котранспортер 2 (KCC2)	Кролик	1 : 100	Abcam, Cambridge, UK
Нейрональная молекула клеточной адгезии (NCAM1)	Кролик	1 : 100	Abcam, Cambridge, UK
Синаптофизин (Synaptophysin)	Кролик	1 : 100	Abcam, Cambridge, UK
Сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF165)	Кролик	1 : 300	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Транскрипционный фактор олигодендроцитов 2 (Olig2)	Кролик	1 : 100	Abcam, Cambridge, UK
Тяжелые цепи медленного миозина (Slow skeletal myosin heavy chain)	Кролик	1 : 100	Abcam, Cambridge, UK
Холинацетилтрансфераза (ChAT)	Кролик	1 : 100	Invitrogen
Мышиные IgG конъюгированные с Alexa 488	Осел	1 : 200	Invitrogen

Продолжение Таблицы 1

Антитела	Хозяин	Разведение	Производитель
Кроличьи IgG конъюгированные с Alexa 488	Осел	1:200	Invitrogen
Кроличьи IgG конъюгированные с Alexa 647	Осел	1:200	Invitrogen

2.3 Экспериментальное моделирование травмы спинного мозга

Исследование проводили на самках свиней породы вьетнамская вислобрюхая, полученных из Казанской академии ветеринарной медицины имени Н. Э. Баумана (25–30 кг; n = 11). Экспериментальных животных содержали в специально оборудованном помещении при температуре 24–25 °С с контролируемым притоком воздуха и организованным доступом к воде и пище. В настоящем исследовании подопытные животные были разделены на 3 экспериментальные группы (Таблица 2).

Таблица 2 – Группы экспериментальных животных

Группа	Проводимые манипуляции
Контрольная группа (n = 4)	Забор периферической крови, моделирование контузионной ТСМ, введение нативного аутологичного лейкоконцентрата
Опытная группа (n = 4)	Забор периферической крови, моделирование контузионной ТСМ, введение аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генетическим материалом (Ad5/35-VEGF165, Ad5/35-GDNF и Ad5/35-NCAM1)
Интактная группа (n = 3)	Здоровые животные, содержащиеся в стандартных условиях вивария

2.3.1 Предоперационная подготовка

Хирургические манипуляции проводили в условиях операционной, согласно санитарным правилам и нормам. Подготовка экспериментальных животных к оперативным вмешательствам начиналась с премедикации путем подкожной инъекции 1 мл атропина и внутримышечной инъекции тилетамина/золазепам в

сочетании с ксилазином. Операционное поле выбривали от шерсти, кожу обрабатывали антисептическими растворами (повидон йода 10 % и хлоргексидина биглюконат 0,05 %). Подключение к ингаляционному наркозному аппарату (Minor Vet Optima, Zoomed, Москва, Россия) осуществляли на операционном столе с дальнейшей подачей смеси изофлурана 2–2,5 % с кислородом на весь период операции. Перед началом оперативного вмешательства животным устанавливали силиконовый мочевого катетер размером 18 Fr, который сохраняли и в послеоперационном периоде. Во время операции температуру тела животных поддерживали на уровне 38 °С с помощью ветеринарного термоматраса.

2.3.2 Моделирование контузионной травмы

Доступ к спинному мозгу экспериментальных животных осуществляли в следующей последовательности:

- 1) разрез кожи по задней срединной линии над остистыми отростками грудных позвонков (Th7-Th12);
- 2) отделение скелетных мышц от остистых отростков и дуг позвонков;
- 3) рассечение связок и удаление остистых отростков позвонков Th8 и Th9;
- 4) создание открытого участка спинного мозга путем удаления дуг позвонков Th8 и Th9.

Моделирование контузионной травмы спинного мозга (КТСМ) выполняли путем удара импактора (металлический стержень) массой 50 г, падающего с высоты 50 см, по разработанному нами ранее способу [152]. Предварительно до нанесения удара животных фиксировали в оптимальной позе с вытянутым прямым позвоночником, а цилиндр импактора был зафиксирован на расстоянии 1 мм от открытого спинного мозга. Для восполнение утраченной крови во время операции свиньям внутривенно вводили 400 мл раствора Рингера.

2.3.3 Введение аутологичного лейкоконцентрата

Через 4 часа после моделирования КТСМ животным из опытной группы внутривенно (через ушную вену) вводили 30 мл аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного рекомбинантными генами (*vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*). Свиньям из контрольной группы вводили 30 мл нативного аутологичного лейкоконцентрата.

Мы использовали общепринятую модель спинномозговой травмы у свиней [11] и в наших предыдущих работах контрольные группы в зависимости от терапевтического воздействия включали животных с КТСМ, которым вводили физиологический раствор [1], или не подвергали введению каких-либо препаратов [6]. В представленном исследовании критерием препарата, вводимого контрольным животным с целью создания равных условий, явился клеточный носитель терапевтических генов, а именно аутологичный лейкоконцентрат.

Небольшое количество свиней в экспериментальных группах, как и в других доклинических исследованиях, выполненных на малом количестве крупных животных, объясняется сложностью содержания и ухода за ними в послеоперационном периоде [59, 241]. Снижение числа свиней в экспериментальных группах также исходит из этических соображений (принцип минимизации). При этом количество животных в группе соответствует условиям применения непараметрического теста Краскела – Уоллиса для статистической обработки результатов.

2.3.4 Послеоперационный период

В послеоперационном периоде все экспериментальные животные получали надлежащую антибактериальную терапию – цефотаксим 1 г (1 раз в день, внутримышечно), противовоспалительную терапию – дексаметазон 1 мл (1 раз в день, подкожно, 10 дней), витаминную терапию – тиамин (В1)/пиридоксин (В6) – 2 мл (1 раз в день, внутримышечно, 10 дней), цианокобаламин (В12) 2 мл (1 раз в день, внутримышечно, 10 дней), аскорбиновая кислота 4 мл (1 раз в день,

внутримышечно, 10 дней) и анальгезирующую терапию – кеторол 30 мг/мл (2 раза в день, внутримышечно, 10 дней).

Ежедневно проводили мониторинг состояния экспериментальных животных с обработкой и перевязкой послеоперационной раны.

2.4. Поведенческие тесты

Посттравматическое восстановление двигательных функций у экспериментальных животных с ТСМ оценивали с помощью поведенческого теста PTIBS (от англ. **P**orcine **T**horacic **I**njury **B**ehavioral **S**cale – шкала поведения свиньи при травме грудного отдела спинного мозга) [11]. Животных помещали в центр арены (2,5 м × 2,5 м) и регистрировали движения в задних конечностях по 10-балльной шкале PTIBS (Таблица 3). Результаты поведенческого теста получали от двух независимых исследований, выполненных до моделирования нейротравмы и через 2, 4 и 8 недель после операции.

Таблица 3 – 10-балльная шкала оценки поведения PTIBS

Баллы	Описание
1	Нет активных движений задними конечностями, крестец и колени лежат на полу
2	Есть активные движения задними конечностями, крестец и колени лежат на полу
3	Активные движения задних конечностей, с единичными «весовыми разгибаниями», которые поднимают крестец и колено с пола (тазобедренные суставы сгибаются, а коленные суставы сгибаются и разгибаются)
4	Активные ползущие и ритмические движения задних конечностей (не менее трех возвратно-поступательных движений). Крестец постоянно приподнят над полом, наблюдаются единичные «весовые разгибания» задних конечностей
5	Животное может сделать минимум 2 шага (максимум 6 шагов) с постоянно приподнятым крестцом и коленями. Коленные суставы разгибаются не полностью. Постановка копыта имеет комбинированное положение (дорсальное и плантарное). Баланс животного во время шагания ослаблен

Продолжение Таблицы 3

Баллы	Описание
6	Животное может сделать более 6 шагов с постоянно приподнятым крестцом и коленями. Коленные суставы разгибаются не полностью. Постановка копыта имеет комбинированное положение (дорсальное и плантарное). Баланс животного во время шагания ослаблен
7	Животное может сделать минимум 2 шага (максимум 6 шагов) с полным разгибанием коленных суставов. Постановка копыта имеет комбинированное положение (дорсальное и плантарное). Баланс животного во время шагания ослаблен
8	Животное может сделать минимум 6 шагов с полным разгибанием коленных суставов. Постановка копыта имеет комбинированное положение (дорсальное и плантарное). Баланс животного во время шагания ослаблен
9	Животное может сделать минимум 6 шагов с полным разгибанием коленных суставов. Постановка копыта имеет плантарное положение. Туловище животного во время ходьбы неустойчиво
10	Животное демонстрирует нормальную ходьбу с устойчивым балансом туловища

2.5 Электрофизиологические исследования

Электрофизиологическое исследование включало в себя игольчатую электромиографию скелетных мышц задних конечностей при стимуляции седалищного нерва. Перед исследованием животных вводили в наркоз путем внутримышечной инъекции тилетамина/золазепамы с последующим подключением к ингаляционному наркозному аппарату, по которому поступал изофлуран в 2,0–2,5 % в смеси с кислородом.

Стимулирующие электроды из нержавеющей стали (диаметром 0,6 мм и длиной 50 мм) вводили в область проекции седалищного нерва на 2 см ниже большого вертела бедренной кости. Регистрацию М-ответа проводили с помощью игольчатых электродов, введенных в камбаловидную мышцу. Стимуляцию нерва осуществляли одиночными прямоугольными импульсами с частотой 0,6 Гц, длительностью 0,2 мс и силой тока в диапазоне 4–72 мА.

Электрофизиологические исследования проводили до моделирования

нейротравмы и через 2, 4 и 8 недель после операции с использованием электростимулятора Digitimer DS7A (Digitimer Ltd., Уэлин-Гарден, Великобритания), усилителя биологического сигнала с фильтрами от 5 Гц до 2 кГц (Biosignal amplifier, g.tec medical engineering GmbH, Шидльберг, Австрия) и системы сбора и анализа данных LabChart (AD Instruments Inc., Колорадо-Спрингс, Колорадо, США).

2.6 Гистологические исследования

На 60 сутки после моделирования нейротравмы экспериментальных животных выводили из эксперимента под глубокой анестезией, которую достигали путем внутримышечной инъекции в заднюю часть шеи тилетамина/золазепама в сочетании с ксилазином свиньям вводили хлорид калия (150 мг/кг) через ушную вену.

Поясничное утолщение спинного мозга (L6-S1) выделяли из позвоночного столба и фиксировали в 4 % растворе параформальдегида (Sigma, Сент-Луис, Миссури, США) на фосфатно-солевом буфере (pH 7,4). Фрагменты большеберцовых нервов (*n. tibialis*) длиной 5 мм забирали с обеих конечностей и фиксировали в 2,5 % растворе глутаральдегида (Sigma, Сент-Луис, Миссури, США). Камбаловидные мышцы (*m. soleus*) выделяли с обеих задних конечностей, взвешивали и фиксировали в 4 % растворе параформальдегида.

2.6.1 Приготовление срезов

Для криопротекции фиксированные образцы поясничных утолщений спинного мозга и скелетных мышц насыщали в 30% растворе сахарозы, приготовленном на фосфатно-солевом буфере (pH = 7,4). Далее образцы помещали в пластиковые контейнеры, которые наполняли средством для замораживания тканей TBS (Triangle Biomedical Science, США), и замораживали в криостате Microm HM 560 (Thermo Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Из поясничного

утолщения спинного мозга готовили криостатные поперечные свободно плавающие срезы толщиной 20 мкм. Из образцов камбаловидной мышцы готовили криостатные поперечные срезы толщиной 10 мкм, которые монтировали на предметное стекло.

Фрагменты скелетных мышц также использовали для приготовления парафиновых блоков по общепринятой гистологической методике. Поперечные срезы толщиной 7 мкм готовили на ротационном микротоме HM 325 (Thermo Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) и монтировали на предметное стекло.

Фиксированные образцы большеберцового нерва инкубировали в 1 % растворе тетроксид осмия (Sigma, Сент-Луис, Миссури, США) в течение 24 ч. и заливали в полимерную смолу (EMbed 812, Electron Microscopy Sciences, Хатфилд, Пенсильвания, США). Полутонкие поперечные срезы *n. tibialis* получали с помощью ультрамикротомы LKB-3 (LKB, Соллентуна, Швеция).

2.6.2 Окрашивание гистологических препаратов

В настоящем исследовании полученные гистологические препараты окрашивали метиленовым синим, гематоксилином и эозином. Целевые молекулы выявляли с помощью иммунофлуоресцентного метода.

Криостатные поперечные срезы поясничного утолщения спинного мозга и парафиновые поперечные срезы скелетных мышц окрашивали гематоксилином и эозином. Полутонкие поперечные срезы большеберцовых нервов окрашивали метиленовым синим. Полученные микропрепараты изучали с помощью микроскопа Axioscope A1 и оцифровывали с использованием объективов с 10 и 20 кратным увеличением и камерой AxioCam 105 (Carl Zeiss, Оберкохен, Германия).

Иммунофлуоресцентное окрашивания проводили на срезах поясничного утолщения спинного мозга и камбаловидной мышцы. Проницаемость клеточных мембран увеличивали путем 3-х кратной инкубации срезов в 1 % растворе Triton X-100 на фосфатно-солевом буфере (PBST) в течение 10 минут. Блокирование неспецифических мест связывания проводили в 5 % растворе

ослиной сыворотки в PBST в течение 45 минут при комнатной температуре. Для выявления целевых молекул использовали специфические первичные АТ.

Для оценки состояния нейронов спинного мозга применяли АТ против белка калий-хлорного котранспортера 2 (KCC2), холинацетилтрансферазы (Chat), синаптофизина и белка постсинаптической плотности молекулярной массой 95 кДа (PSD95). Астроциты идентифицировали с помощью АТ к глиальному фибриллярному кислом белку (GFAP), олигодендроциты – АТ к транскрипционному фактору олигодендроцитов 2 (Olig2), клетки микроглии – АТ к ионизированной кальций-связывающей адаптерной молекуле 1 (Iba1). Для типирования скелетных мышечных волокон использовали АТ к тяжелым цепям медленного миозина (см. Таблица 1).

Инкубацию срезов с первичными АТ проводили при температуре 4 °С в течение 12 ч. После инкубации срезы промывали в фосфатно-солевом буфере 3 раза по 10 мин. Для идентификации первичных АТ применяли ослиные иммуноглобулины, конъюгированные с флуорохромами. Инкубацию срезов со вторичными АТ проводили при комнатной температуре в течение 2 ч.

Для визуализации клеточных ядер использовали DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол) в концентрации 10 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере (Sigma, Burlington, Массачусетс, США). После окрашивания срезы заключали в среду для защиты от выгорания флуоресценции Fluoroshield™ (Sigma Aldrich, США). Изучение и оцифровку препаратов проводили с помощью люминесцентного микроскопа Axioscope A1 и конфокального микроскопа Leica TCS SP5 MP (Leica Microsystems, Вецлар, Германия).

2.6.3 Морфометрический анализ

Цифровые изображения препаратов анализировали с помощью программы ImageJ (NIH). На препаратах спинного мозга экспрессию целевых молекул изучали в передних и задних рогах на площади 0,05 мм². Экспрессию нейрональных (KCC2, Chat, Synaptophysin, PSD95) и глиальных (GFAP, Iba1) маркеров оценивали как

относительную иммунопозитивную площадь и представляли в процентах от исследуемой площади. При подсчете количества олигодендроцитов (Olig2-позитивных ядер) учитывали совпадение иммунопозитивных ядер и ядер, окрашенных с помощью DAPI.

Морфометрический анализ оцифрованных изображений препаратов периферических нервов включал в себя подсчет количества миелиновых волокон, измерение толщины миелиновой оболочки и диаметра осевых цилиндров. Исследование проводили на хорошо прокрашенных контрастированных фрагментах нервных волокон. Полученные показатели нормировали на стандартную площадь 0,05 мм².

На оцифрованных микропрепаратах *m. soleus* измеряли площадь (мкм²) 200 МВ и проводили их фенотипирование. Количество медленных МВ выражали в процентах.

2.7 Статистический анализ

Статистический анализ и визуализацию данных проводили в среде R версии 4.1.2 (R Foundation for Statistical Computing, Вена, Австрия). Для визуализации выборочного распределения количественных данных использованы боксплоты, описательная статистика представлена в виде медианы [1-й квартиль; 3-й квартиль]. Результаты М-ответа и общего анализа форменных элементов крови показаны как среднее ± стандартная ошибка среднего. Для сравнения экспериментальных групп использовали тест Краскела – Уоллиса с апостериорным тестом Данна. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Характеристика аутологичного генетически модифицированного лейкоконцентрата

Из 50 мл периферической крови выделяли лейкоконцентрат, объем которого доводили с помощью физиологического раствора до 30 мл. На фоне сниженного содержания эритроцитов ($p = 0,028377$) общее количество лейкоцитов ($p = 0,000889$) и тромбоцитов ($p = 0,001071$) в лейкоконцентрате было увеличено по сравнению с периферической цельной кровью.

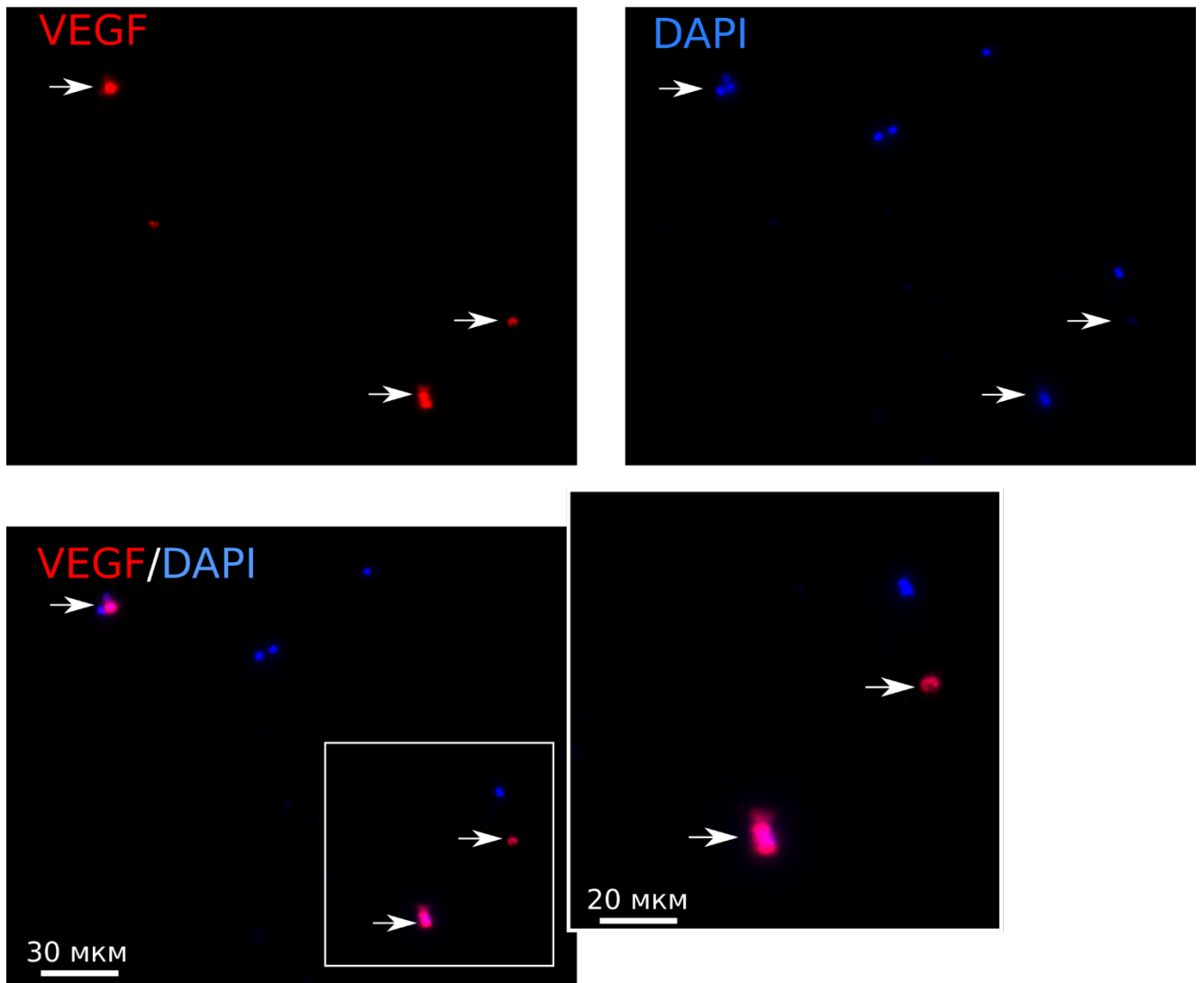
Общий объем отмытого лейкоконцентрата, обогащенного генетическим материалом, также доводили до 30 мл с помощью физиологического раствора. Содержание форменных элементов в лейкоконцентрате, обогащенном генетическим материалом, не отличалось от значений нативного лейкоконцентрата (Таблица 4).

Таблица 4 – Результаты общего анализа форменных элементов крови

Тип клеток	Цельная кровь	Лейкоконцентрат	Лейкоконцентрат, обогащенный генетическим материалом
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	$10,66 \pm 2,04$	$30,5 \pm 4,04$	$26,11 \pm 4,11$
Лимфоциты, $10^9/\text{л}$	$5,96 \pm 1,12$	$16,2 \pm 2,47$	$14,81 \pm 2,59$
Моноциты, $10^9/\text{л}$	$0,49 \pm 0,11$	$3,35 \pm 0,41$	$2,66 \pm 0,36$
Гранулоциты, $10^9/\text{л}$	$4,21 \pm 0,87$	$10,96 \pm 1,67$	$8,64 \pm 1,46$
Лимфоциты, %	$56,19 \pm 2,06$	$52,92 \pm 2,51$	$56,51 \pm 2,29$
Моноциты, %	$5,41 \pm 1,23$	$11,75 \pm 1,11$	$11,26 \pm 1,43$
Гранулоциты, %	$38,4 \pm 1,52$	$35,33 \pm 2,31$	$32,23 \pm 1,81$
Эритроциты, $10^{12}/\text{л}$	$4,3 \pm 0,16$	$3,27 \pm 0,36$	$2,97 \pm 0,41$
Тромбоциты, $10^9/\text{л}$	$236,12 \pm 55,25$	$707,75 \pm 93,15$	$546,25 \pm 85,24$
Объем, мл	50,0	30,0	30,0

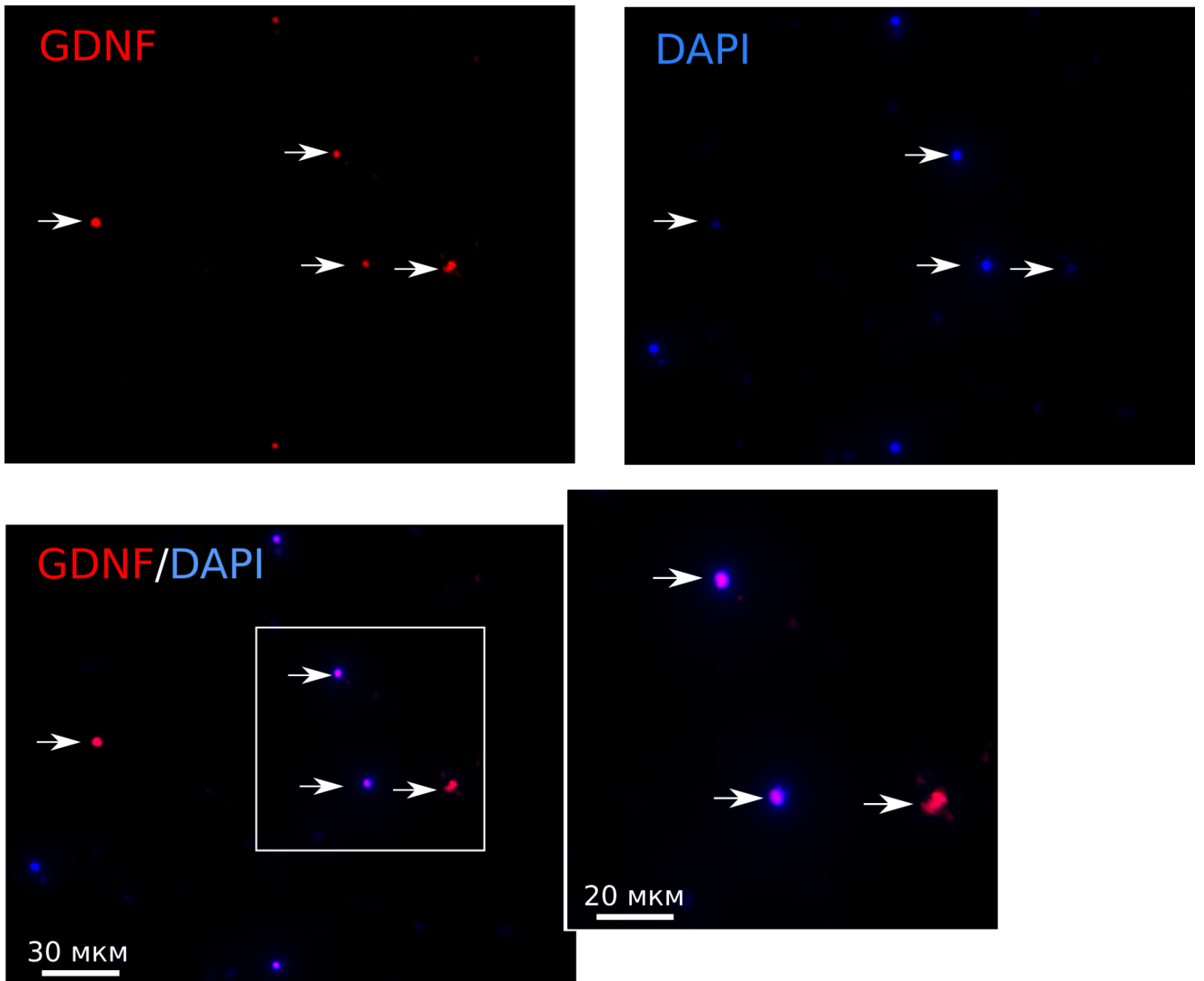
Иммунофлуоресцентное окрашивание аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного рекомбинантными генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, проводили через 72 часа после инкубации образцов с использованием специфических антител к рекомбинантным молекулам VEGF, GDNF и NCAM.

Эффективность трансдукции лейкоконцентрата была доказана с помощью флуоресцентной микроскопии. На микрофотографиях видно, что в цитоплазме трансдуцированных лейкоцитов выявляется специфическое красное свечение, что свидетельствует о наличии исследуемых рекомбинантных молекул (Рисунок 2, 3 и 4).



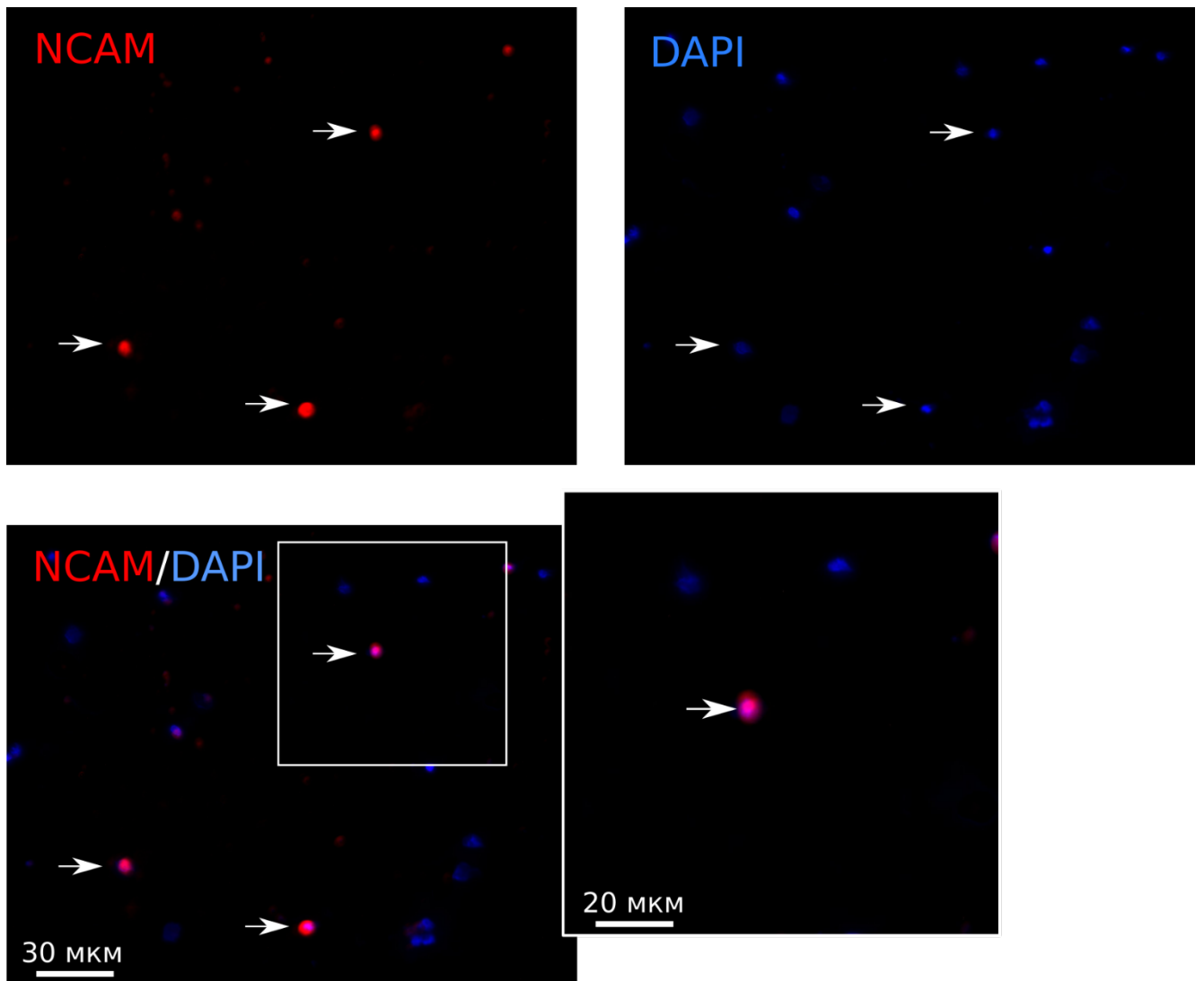
Примечание: Стрелками указаны VEGF-положительные клетки (красное свечение). Ядра окрашены DAPI (синее свечение).

Рисунок 2 – Иммунофлуоресцентное окрашивание образцов генетически модифицированного лейкоконцентрата через 72 часа после его трансдукции с помощью специфических АТ к сосудистому эндотелиальному фактору роста (VEGF).



Примечание: Стрелками указаны GDNF-положительные клетки (красное свечение). Ядра окрашены DAPI (синее свечение).

Рисунок 3 – Иммунофлуоресцентное окрашивание образцов генетически модифицированного лейкоконцентрата через 72 часа после его трансдукции с помощью специфических АТ к глиальному нейротрофическому фактору (GDNF).



Примечание: Стрелками указаны NCAM-позитивные клетки (красное свечение). Ядра окрашены DAPI (синее свечение).

Рисунок 4 – Иммунофлуоресцентное окрашивание образцов генетически модифицированного лейкоконцентрата через 72 часа после его трансдукции с помощью специфических АТ к нейрональной молекуле клеточной адгезии (NCAM).

3.2 Оценка посттравматических морфофункциональных изменений спинного мозга у свиней в условиях внутривенного введения аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генетическим материалом

Согласно дизайну эксперимента, свиньям опытной группы через 4 часа после моделирования нейротравмы внутривенно вводили аутологичный лейкоконцентрат, обогащенный терапевтическими генами (*vegfl65*, *gdnf*, *ncam1*). Контрольным животным после операции вводили нативный аутологичный лейкоконцентрат (без генетической модификации). Анализ эффективности терапии проводили путем сравнения полученных результатов в экспериментальных группах животных, с учетом изученных параметров у интактных свиней.

3.2.1 Поведенческие тесты

Через 2 недели после моделирования контузионной ТСМ у экспериментальных животных наблюдалось резкое снижение двигательной активности (Рисунок 5). Животные не могли вставать, а крестец и колени задних конечностей лежали на полу, что соответствует 1 баллу по шкале РТІBS. Через 4 недели после операции оценка по шкале РТІBS в опытной группе увеличилась до 2,0 (2,0; 2,75) баллов; животные пытались подтянуть задние конечности к животу и встать на них. Животные из контрольной группы к этому времени лишь пытались двигать задними конечностями; оценка РТІBS составила 2,0 (1,75; 2,0) балла. В опытной группе наблюдалось дальнейшее увеличение двигательной активности на 8 неделе после моделирования ТСМ, при этом оценка РТІBS составила уже 3,0 (2,25; 3,0). Животные из опытной группы демонстрировали активное сгибание в бедренном, коленном и голеностопном суставах задних конечностей, а также могли стоять на четырех копытах и пытались делать шаги. Животные из контрольной группы через 8 недель после ТСМ волочили задние конечности, передвигаясь на передних; оценка по шкале РТІBS составила 2,0 (1,75; 2,0) балла, что было меньше, чем в опытной группе ($p = 0,009$).



Рисунок 5 – Сравнительный анализ данных поведенческого теста PTIBS у экспериментальных животных из контрольной и опытной групп через 2, 4 и 8 недель после моделирования контузионной травмы спинного мозга

3.2.2 Электрофизиологическое исследование

Электрическая стимуляция седалищного нерва через 2, 4 и 8 недель после моделирования ТСМ выявила изменения в паттерне М-ответа в *m. soleus* у экспериментальных животных (Рисунок 6). У животных из контрольной группы М-ответ имел полифазную форму, что связано с увеличением его продолжительности на 2-й, 4-й и 8-й неделях после ТСМ (Рисунок 7). М-ответ в опытной группе животных также имел многофазный характер с увеличением продолжительности на 2-й, 4-й и 8-й неделях. Амплитуда М-ответа была увеличена через 2 недели после ТСМ как в контрольной, так и в опытной группах (Рисунок 8). В то же время на 4-й и 8-й неделях амплитуда М-ответа снизилась в обеих (контрольной и опытной) группах (Таблица 5).

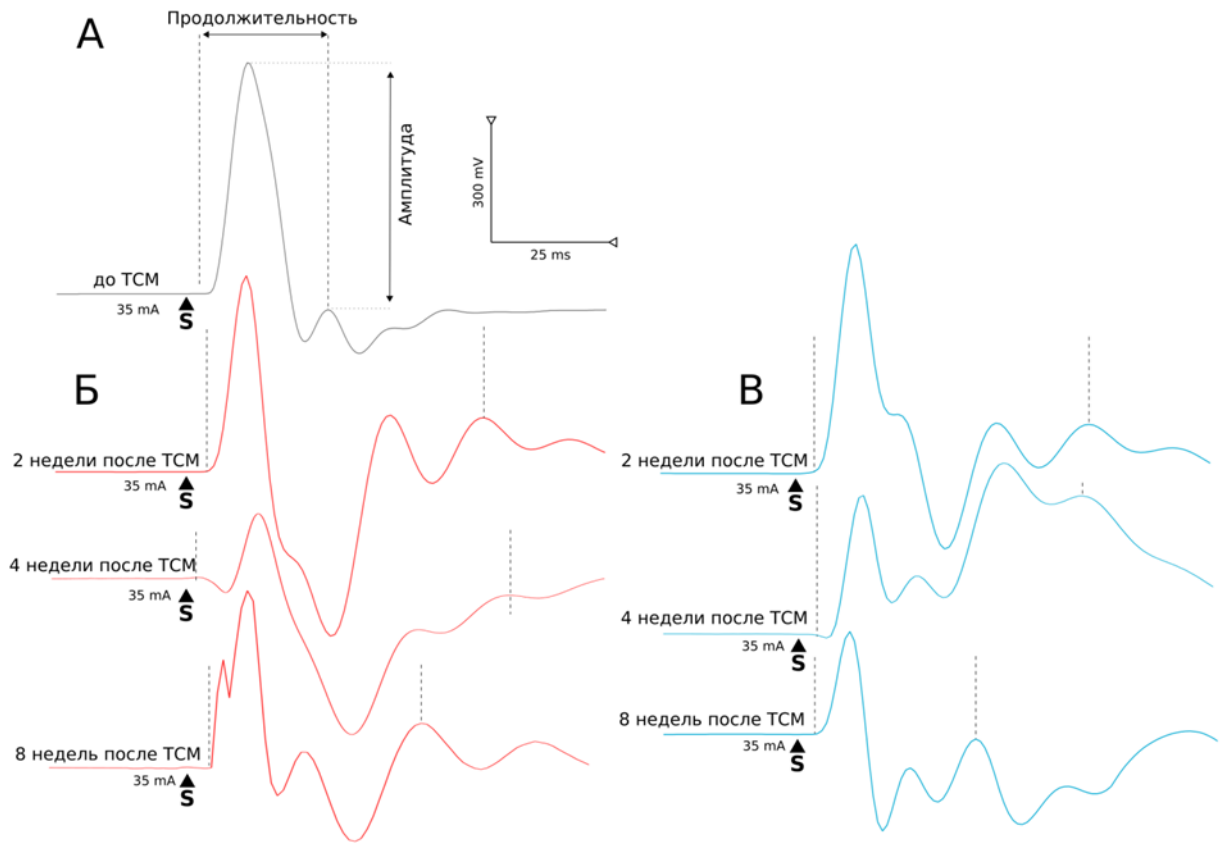


Рисунок 6 – Электромиограмма камбаловидной мышцы свиньи. М-ответ, вызванный электрической стимуляцией седалищного нерва, до моделирования нейротравмы (А) и через 2, 4 и 8 недель после операции у свиней из контрольной (Б) и опытной (В) групп

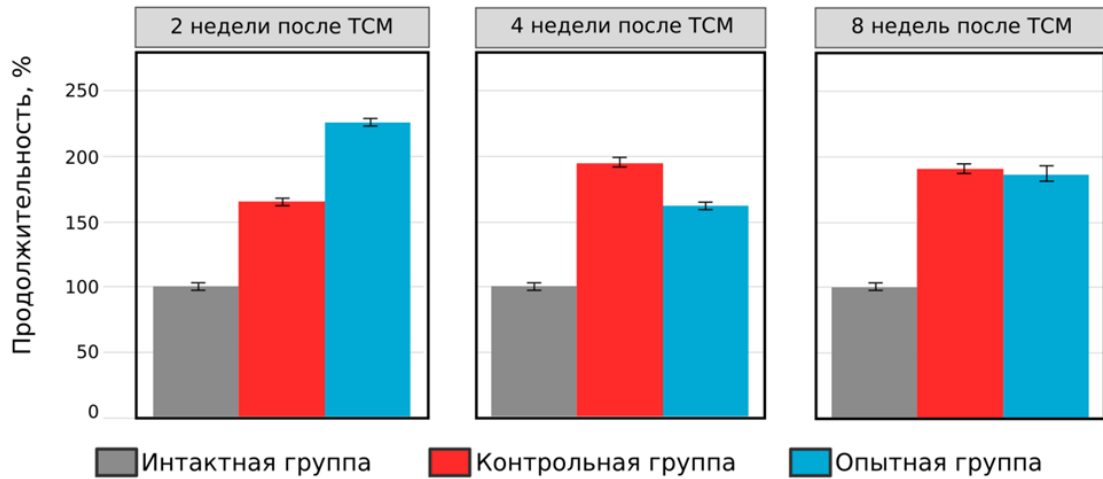


Рисунок 7 – Анализ продолжительности М-ответа камбаловидной мышцы, вызванного электрической стимуляцией седалищного нерва, у свиней из интактной, контрольной и опытной групп через 2, 4 и 8 недель после моделирования контузионной травмы спинного мозга

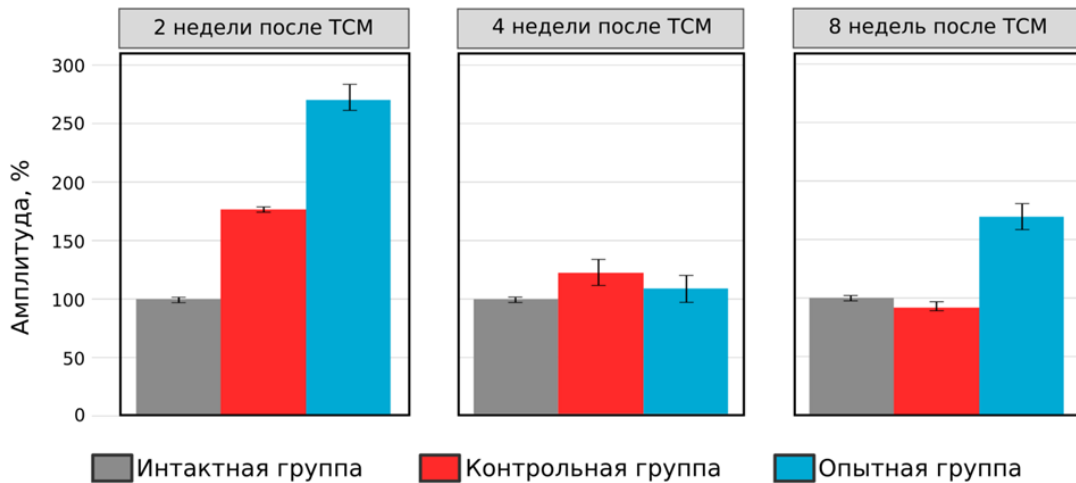


Рисунок 8 – Анализ амплитуды М-ответа камбаловидной мышцы, вызванного электрической стимуляцией седалищного нерва, у свиней из интактной, контрольной и опытной групп через 2, 4 и 8 недель после моделирования контузионной травмы спинного мозга

Таблица 5 – Результаты анализа электрофизиологического исследования *m. soleus* у свиней экспериментальных групп

Показатель	Группа	2 неделя	4 неделя	8 неделя
Амплитуда М-ответа	Контрольная	175 ± 4,6 %	121 ± 13,6 %	91 ± 6,3 %
	Опытная	274 ± 19,4 %	108 ± 22,6 %	169 ± 15 %
Продолжительность М-ответа	Контрольная	165 ± 7,1 %	194 ± 11 %	190 ± 8,5 %
	Опытная	225 ± 6 %	161 ± 5,9 %	185 ± 15,7 %

3.3 Пластичность поясничного утолщения спинного мозга

3.3.1 Сохранность поясничного утолщения спинного мозга

На поперечных срезах поясничного утолщения СМ животных с ТСМ, окрашенных гематоксилином и эозином, патологические изменения, характерные для спинальной травмы, такие как очаги деструкции, лейкоцитарная инфильтрация, кистозные полости, выявлены не были. Спинной мозг состоит из симметричных половин, центральный канал без особенностей, выстлан эпендимоцитами с овальными базофильными ядрами. Белое вещество, лежащее снаружи, и расположенное глубже серое вещество легко различимы. В передних рогах серого вещества визуализируются крупные мультиполярные двигательные нейроны, которые имеют эксцентрично расположенные ядра с крупным резко базофильным ядрышком. В задних рогах обнаруживаются более мелкие вставочные нейроны, имеющие округлые ядра и слабо выраженную цитоплазму. Между телами нейронов хорошо различима войлокообразная структура нейропиля. В задних, боковых и передних канатиках белого вещества визуализируются пучки нервных волокон и локализованные между ними ядра клеток нейроглии (Рисунок 9).

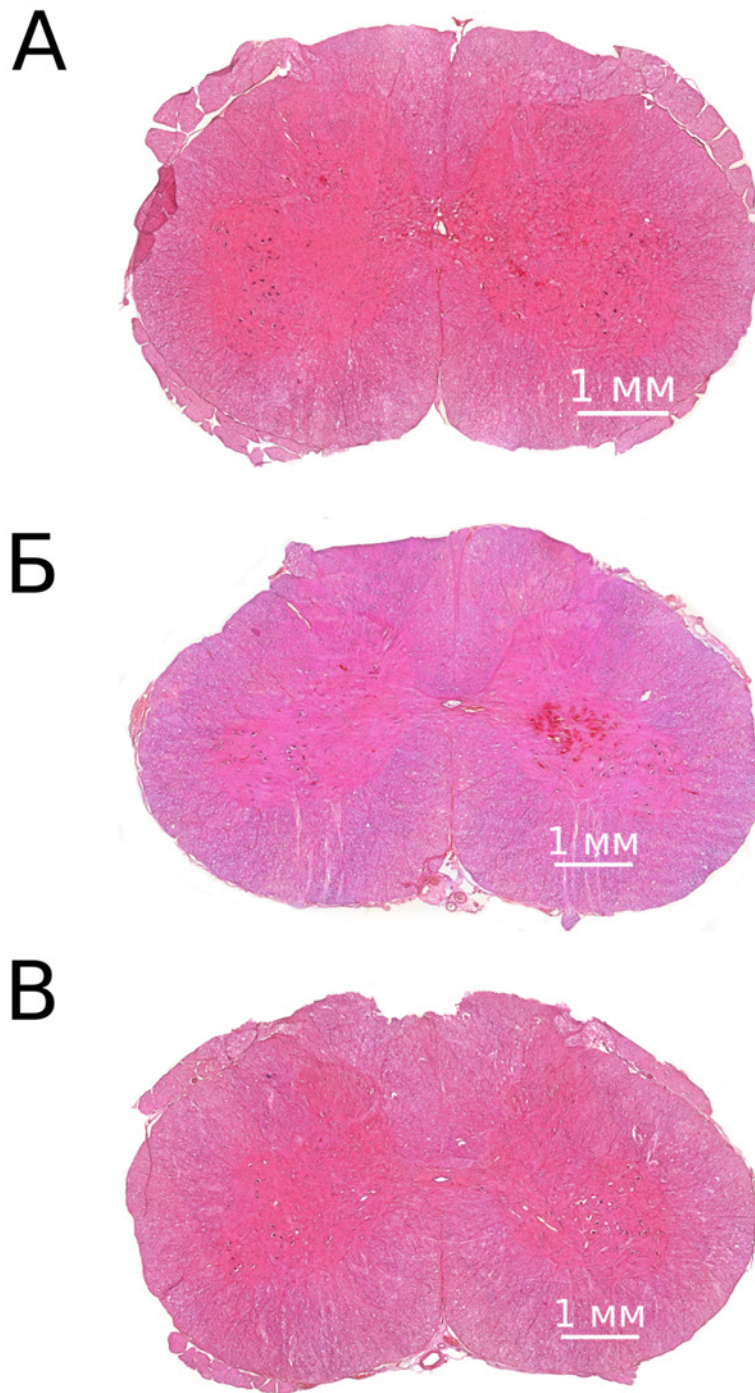


Рисунок 9 – Поперечные срезы поясничного утолщения спинного мозга, окрашенные гематоксилином и эозином, интактного (А), а также контрольного (Б) и опытного (В) животных через 8 недель после моделирования нейротравмы

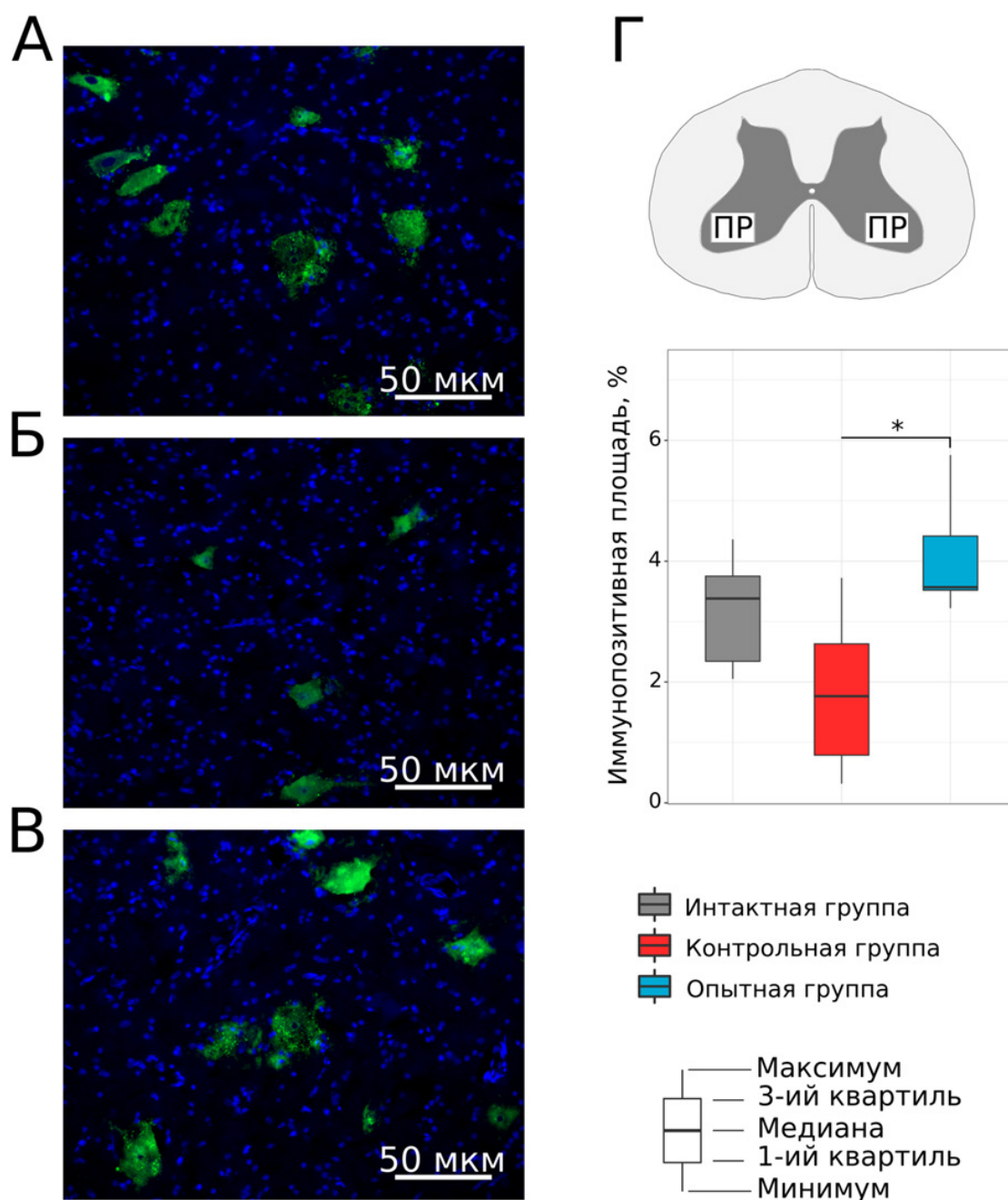
3.3.2 Оценка двигательных нейронов

Оценку состояния двигательных нейронов в передних рогах поясничного утолщения СМ проводили по экспрессии холинацетилтрансферазы (Chat – фермент, отвечающий за биосинтез ацетилхолина, который является показателем функционального состояния холинергических нейронов), белка постсинаптической плотности молекулярной массой 95 кДа (PSD95 – белок, локализующийся в постсинаптической плотности синапсов и связывающий рецепторы нейромедиаторов), синаптофизина (мембранный белок пресинаптических везикул, участвующий в экзоцитозе нейромедиатора) и калий-хлорного котранспортера 2 (KCC2 – K-Cl котранспортер в мембране нейронов ЦНС, обеспечивающий выведение Cl⁻ из клетки и ингибирование деполяризации постсинаптической мембраны).

Анализ экспрессии Chat показал, что относительная иммунопозитивная площадь данного маркера у животных из опытной группы была выше ($p = 0,0173$) по сравнению с контрольными животными и не отличалась от показателей интактной группы (Таблица 6, Рисунок 10). Снижение экспрессии PSD95 также было обнаружено у животных из контрольной группы по сравнению с животными из интактной группы ($p = 0,0235$) (Таблица 6, Рисунок 11). В опытной группе экспрессия PSD95 не отличалась от значений интактной группы. Анализ относительной иммунопозитивной площади синаптофизина и KCC2 не выявил значительных отличий в контрольной и опытной группах в сравнении с интактной группой (Рисунки 12 и 13, Таблица 6).

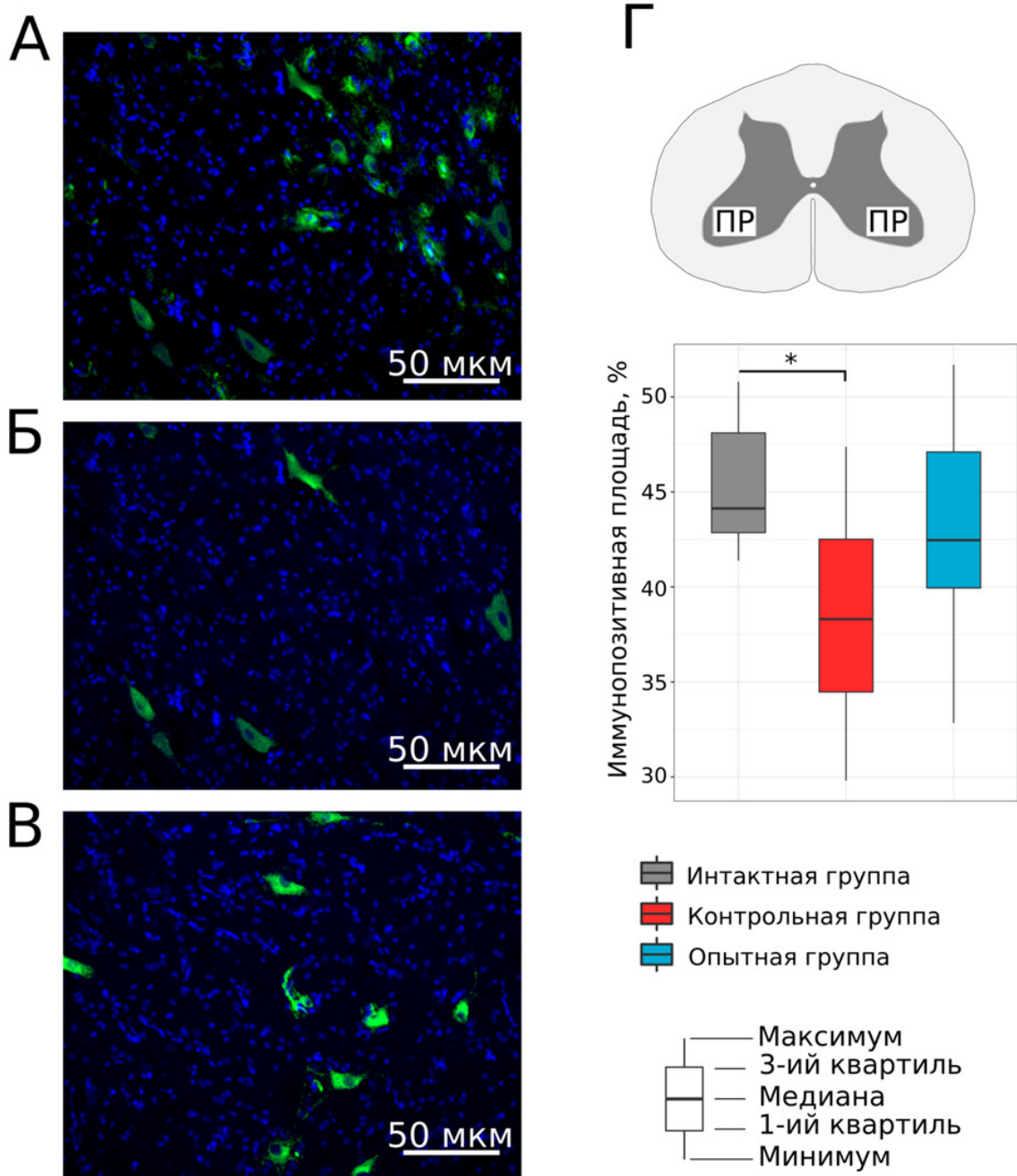
Таблица 6 – Результаты иммунофлуоресцентного анализа нейронов в передних рогах поясничного утолщения спинного мозга у свиней экспериментальных групп

Показатель	Группа	Значение
Холинацетилтрансфераза (Chat)	Интактная	3,382 (2,343; 3,752) %
	Контрольная	1,766 (0,789; 2,632) %
	Опытная	3,569 (3,520; 4,416) %
Белок постсинаптической плотности молекулярной массой 95 кДа (PSD95)	Интактная	44,132 (42,856; 48,104) %
	Контрольная	38,308 (34,474; 42,513) %
	Опытная	42,463 (39,947; 47,107) %
Синаптофизин	Интактная	34,665 (33,630; 38,147) %
	Контрольная	35,052 (33,501; 36,938) %
	Опытная	32,183 (29,530; 35,475) %
Калий-хлорный котранспортер 2 (KCC2)	Интактная	27,919 (26,426; 30,802) %
	Контрольная	27,550 (25,719; 28,408) %
	Опытная	27,394 (25,798; 30,154) %



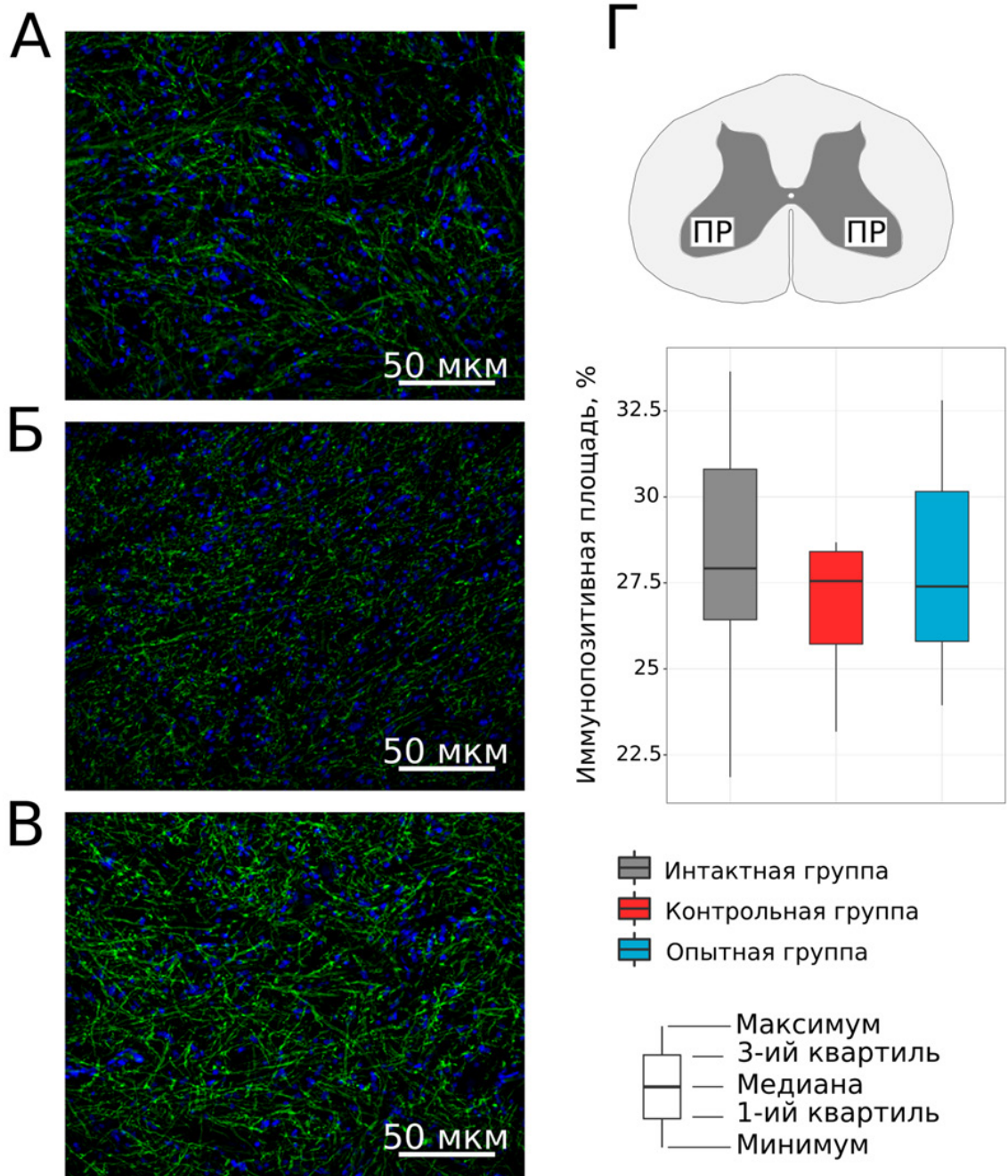
Примечание: * – статистически значимые различия, $p < 0,05$.

Рисунок 10 – Экспрессия холинацетилтрансферазы (Chat) в передних рогах спинного мозга у свиней из интактной (А), а также контрольной (Б) и опытной групп (В) через 8 недель после моделирования нейротравмы (зеленое свечение). Ядра клеток докрашены DAPI (синее свечение). Морфометрический анализ (Г) Chat-позитивной площади в передних рогах спинного мозга экспериментальных животных



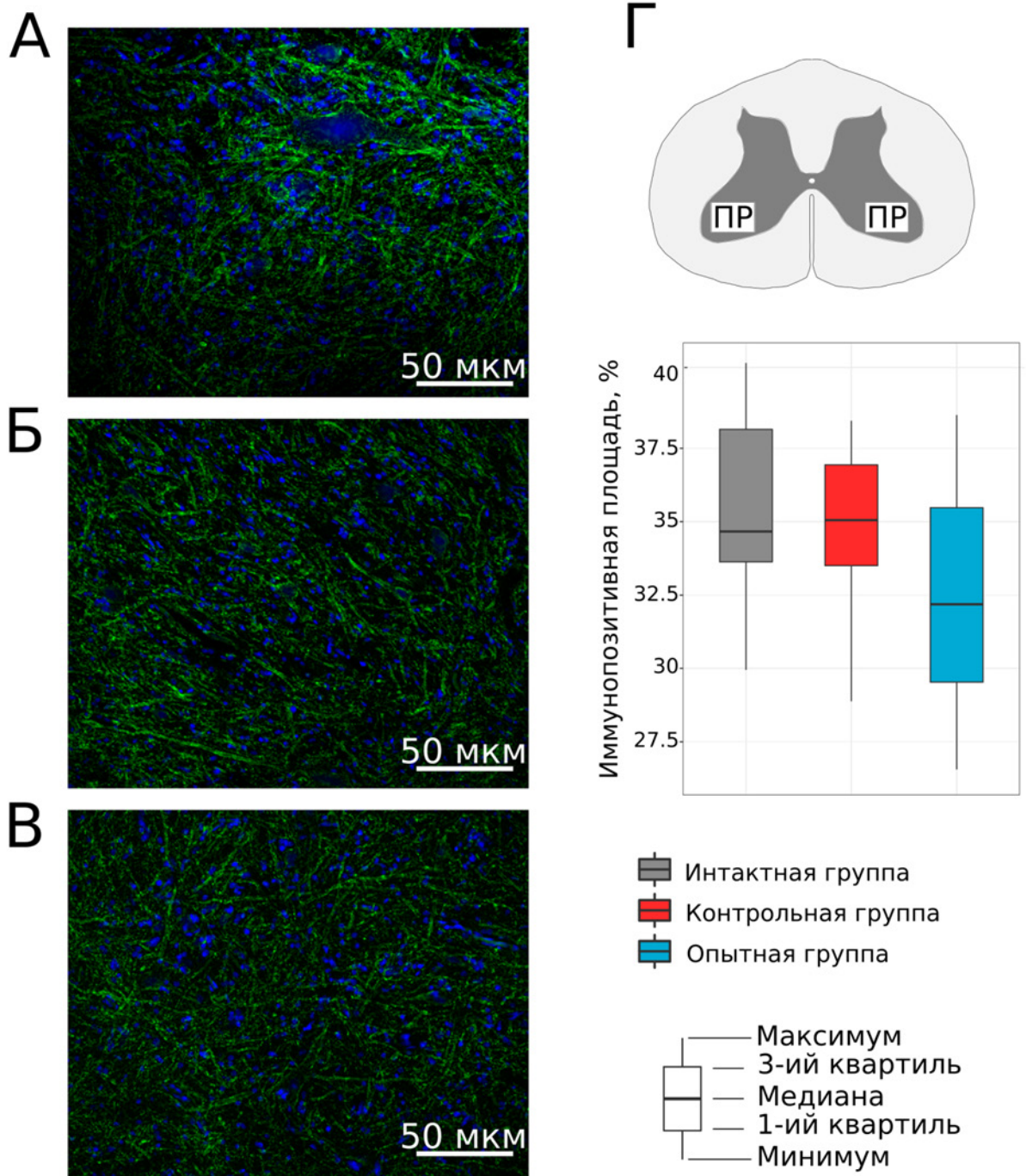
Примечание: * – статистически значимые различия, $p < 0,05$.

Рисунок 11 – Экспрессия белка постсинаптической плотности 95 кДа (PSD95) в передних рогах спинного мозга свиней из интактной (А), а также контрольной (Б) и опытной групп (В) через 8 недель после моделирования нейротравмы (зеленое свечение). Ядра клеток докрашены DAPI (синее свечение). Морфометрический анализ (Г) PSD95-позитивной площади в передних рогах спинного мозга экспериментальных животных



Примечание: * – статистически значимые различия, $p < 0,05$.

Рисунок 12 – Экспрессия калий-хлорного котранспортера 2 (КСС2) в передних рогах спинного мозга у свиней из интактной (А), а также контрольной (Б) и опытной групп (В) через 8 недель после моделирования нейротравмы (зеленое свечение). Ядра клеток докрашены DAPI (синее свечение). Морфометрический анализ (Г) КСС2-позитивной площади в передних рогах спинного мозга экспериментальных животных



Примечание: * – статистически значимые различия, $p < 0,05$.

Рисунок 13 – Экспрессия синаптофизина в передних рогах спинного мозга свиней из интактной (А), а также контрольной (Б) и опытной групп (В) через 8 недель после моделирования нейротравмы (зеленое свечение). Ядра клеток докрашены DAPI (синее свечение). Морфометрический анализ (Г) синаптофизин-позитивной площади в передних рогах спинного мозга экспериментальных животных

3.3.3 Состояние клеток нейроглии в условиях травмы спинного мозга

Состояние клеток нейроглии в передних и задних рогах поясничного утолщения СМ экспериментальных животных изучали иммунофлуоресцентным методом с помощью антител к глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP – белок цитоскелета астроцитов, повышение экспрессии которого коррелирует с развитием астроглиоза), фактору транскрипции олигодендроцитов 2 (Olig2 – маркер олигодендроглиальных клеток, отвечающих за миелинизацию нервных отростков в ЦНС) и ионизированной кальций-связывающей адаптерной молекуле 1 (Iba1 – маркер клеток микроглии, увеличение экспрессии которого может свидетельствовать о развитии астроглиоза и нейровоспаления).

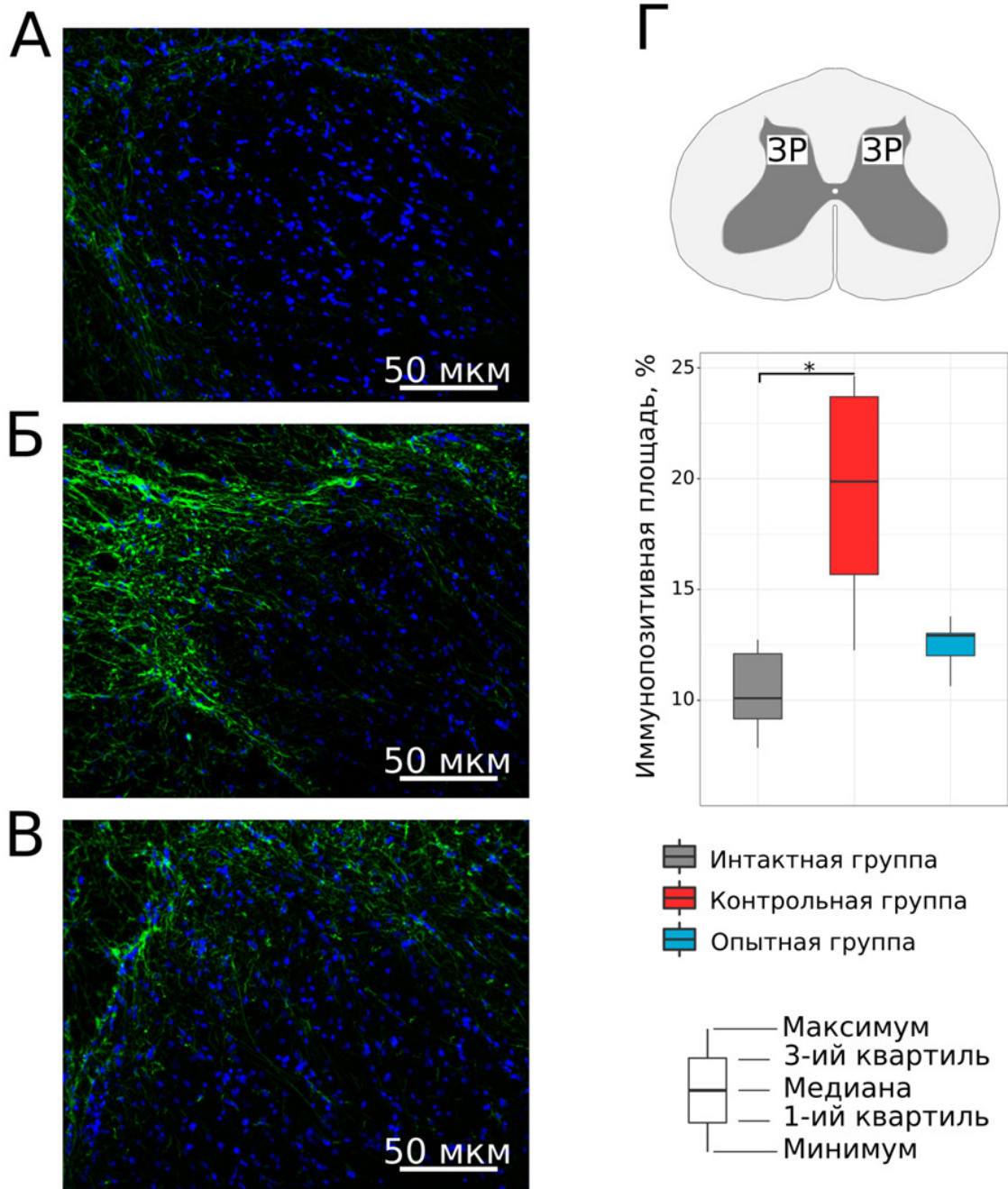
Анализ экспрессии GFAP показал увеличение относительной GFAP-позитивной площади в задних рогах СМ у животных из контрольной группы ($p = 0,002$) в сравнении с интактными свиньями (Таблица 7, Рисунок 14). В передних рогах СМ GFAP-позитивная площадь в контрольной группе не отличалась от интактной (Рисунок 15). В опытной группе GFAP-позитивная площадь в передних и задних рогах поясничного утолщения СМ не отличалась от значений интактной группы (Рисунки 14 и 15).

Оценка иммунопозитивной площади Iba1 показала ее увеличение у животных из контрольной и опытной групп как в передних ($p = 0,0001$; $p = 0,003$), так и задних ($p = 0,001$; $p = 0,0006$) рогах СМ в сравнении с животными из интактной группы (Рисунки 16 и 17).

Иммунофлуоресцентное исследование экспрессии Olig2 в передних рогах СМ выявило снижение количества Olig2-позитивных ядер в контрольной ($p = 0,0001$) и опытной ($p = 0,0055$) группах по сравнению с интактной (Рисунок 18). В задних рогах количество Olig2-позитивных ядер было снижено в контрольной группе в сравнении с интактной ($p = 0,0001$) и опытной группами ($p = 0,0006$) (Рисунок 19).

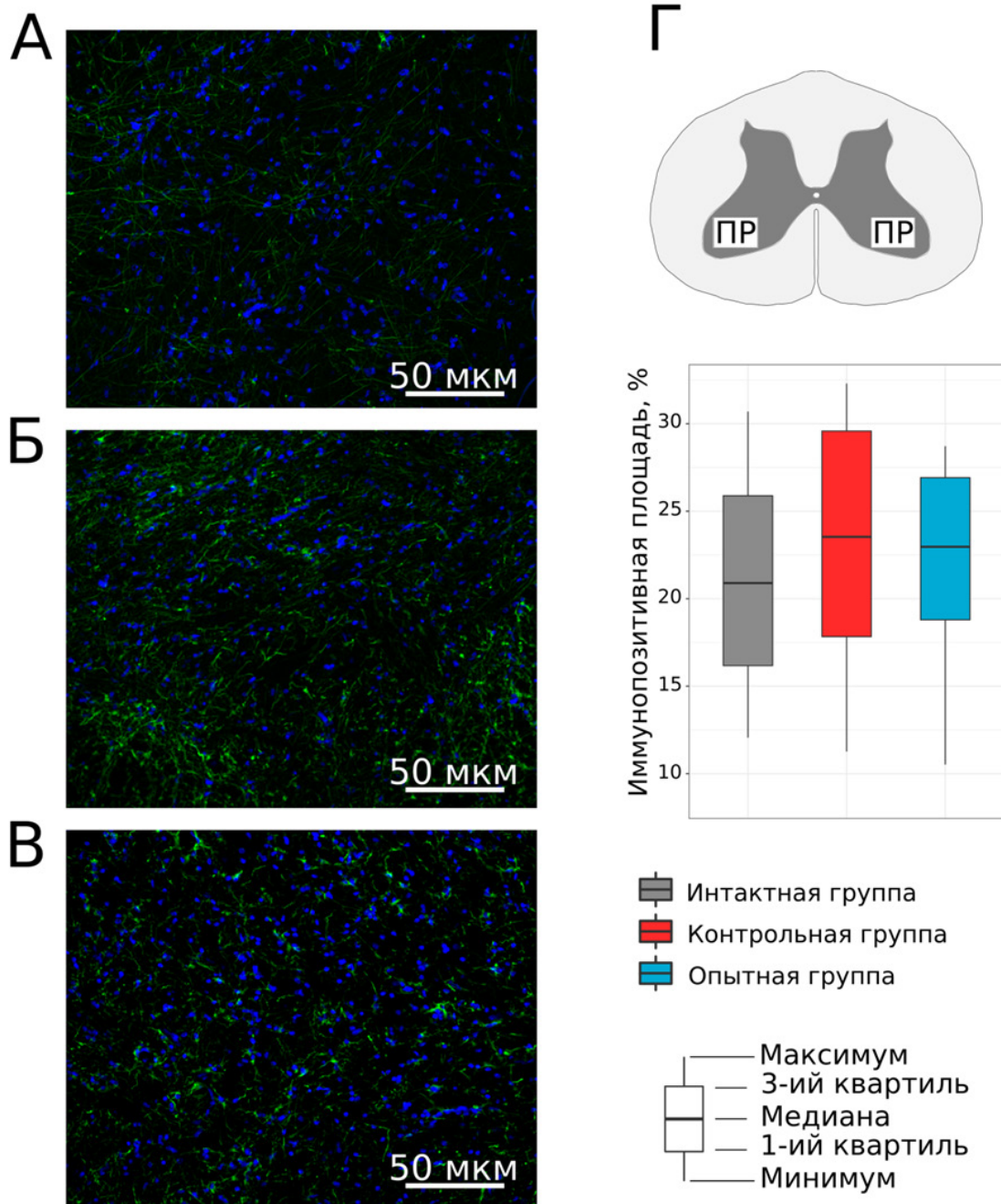
Таблица 7 – Результаты иммунофлуоресцентного анализа клеток нейроглии в поясничном утолщении спинного мозга у свиней экспериментальных групп

Показатель	Область	Группа	Значение
Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP)	Передние рога	Интактная	20,893 (16,178; 25,884) %
		Контрольная	23,535 (17,833; 29,585) %
		Опытная	22,968 (18,793; 26,919) %
	Задние рога	Интактная	10,095 (9,165; 12,101) %
		Контрольная	19,871 (15,676; 23,700) %
		Опытная	12,921 (12,012; 13,023) %
Ионизирующая кальций-связывающая адаптерная молекула 1 (Iba1)	Передние рога	Интактная	9,802 (7,347; 10,611) %
		Контрольная	25,409 (20,503; 26,254) %
		Опытная	14,657 (12,976; 15,744) %
	Задние рога	Интактная	8,118 (7,580; 8,794) %
		Контрольная	22,190 (14,292; 23,533) %
		Опытная	15,368 (13,332; 17,112) %
Транскрипционный фактор олигодендроцитов 2 (Olig2)	Передние рога	Интактная	12 (11; 13)
		Контрольная	5 (4; 6)
		Опытная	7,5 (6; 8)
	Задние рога	Интактная	16,5 (16; 20,75)
		Контрольная	3 (2; 4,25)
		Опытная	13,0 (11; 14,75)



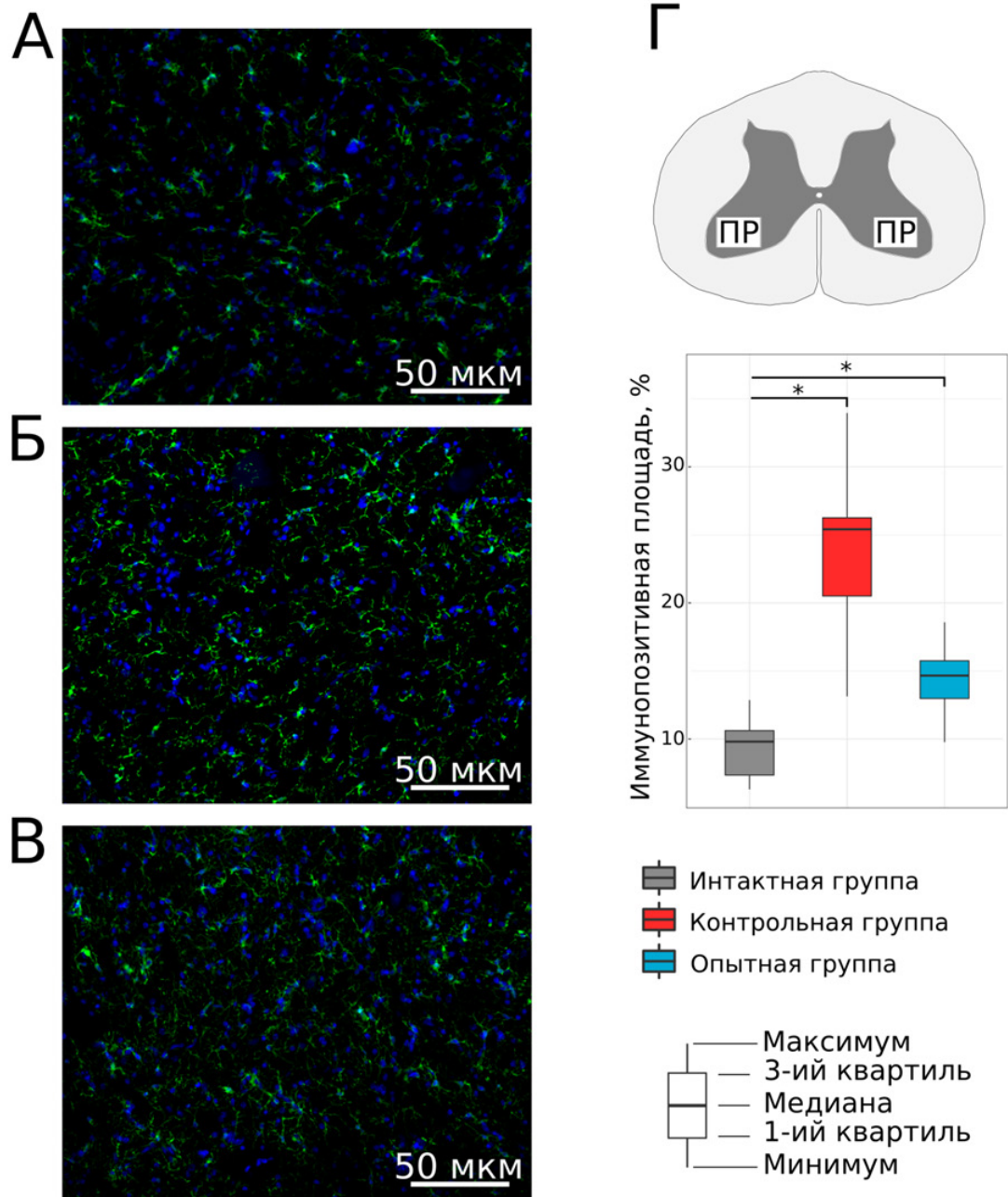
Примечание: * – статистически значимые различия, $p < 0,05$.

Рисунок 14 – Экспрессия глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) в задних рогах спинного мозга свиней из интактной (А), а также контрольной (Б) и опытной групп (В) через 8 недель после моделирования нейротравмы (зеленое свечение). Ядра клеток докрашены DAPI (синее свечение). Морфометрический анализ (Г) GFAP-позитивной площади в задних рогах спинного мозга экспериментальных животных



Примечание: * – статистически значимые различия, $p < 0,05$.

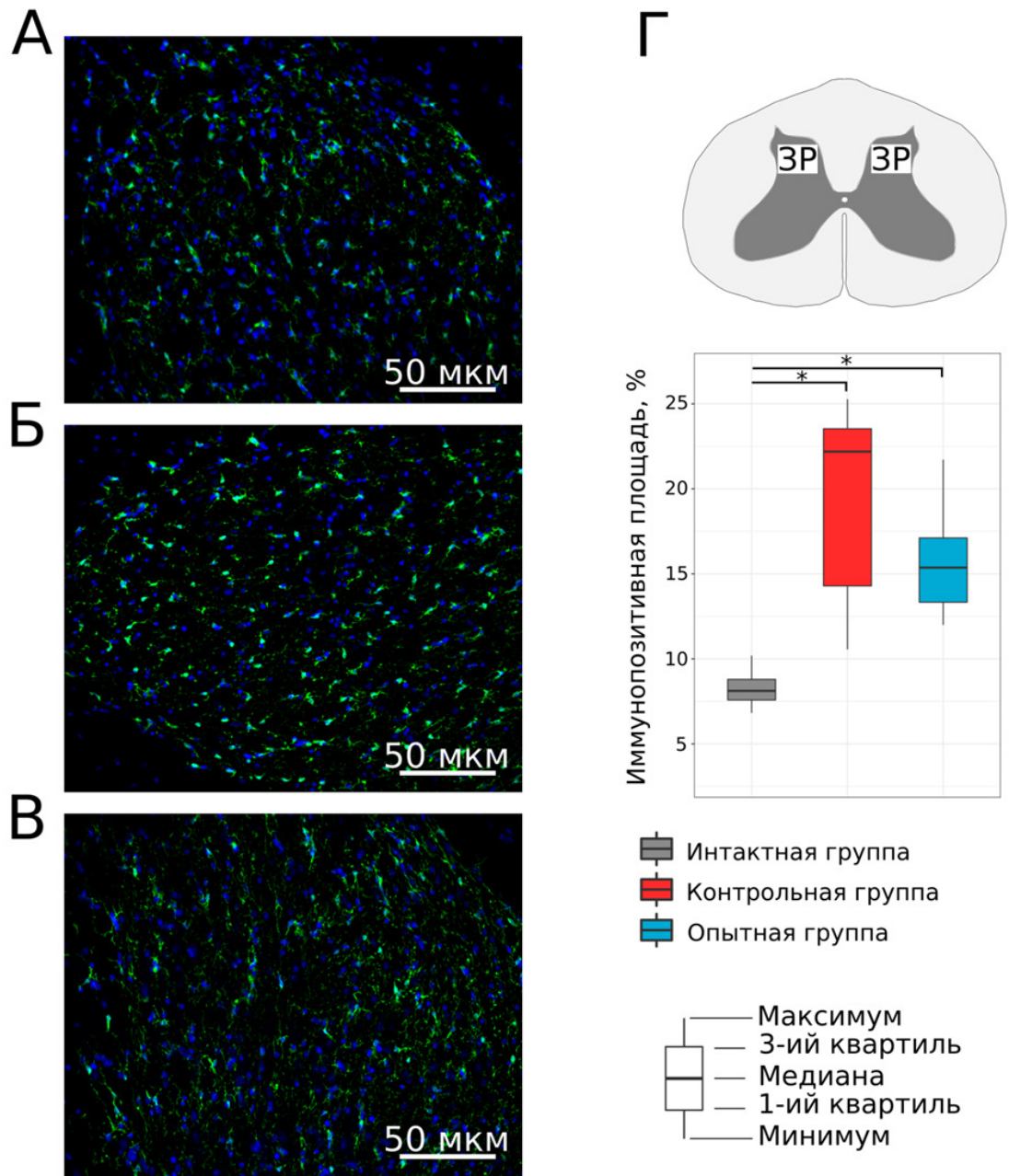
Рисунок 15 – Экспрессия глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) в передних рогах спинного мозга свиней из интактной (А), а также контрольной (Б) и опытной групп (В) через 8 недель после моделирования нейротравмы (зеленое свечение). Ядра клеток докрашены DAPI (синее свечение). Морфометрический анализ (Г) GFAP-позитивной площади в передних рогах спинного мозга экспериментальных животных



Примечание: * – статистически значимые различия, $p < 0,05$.

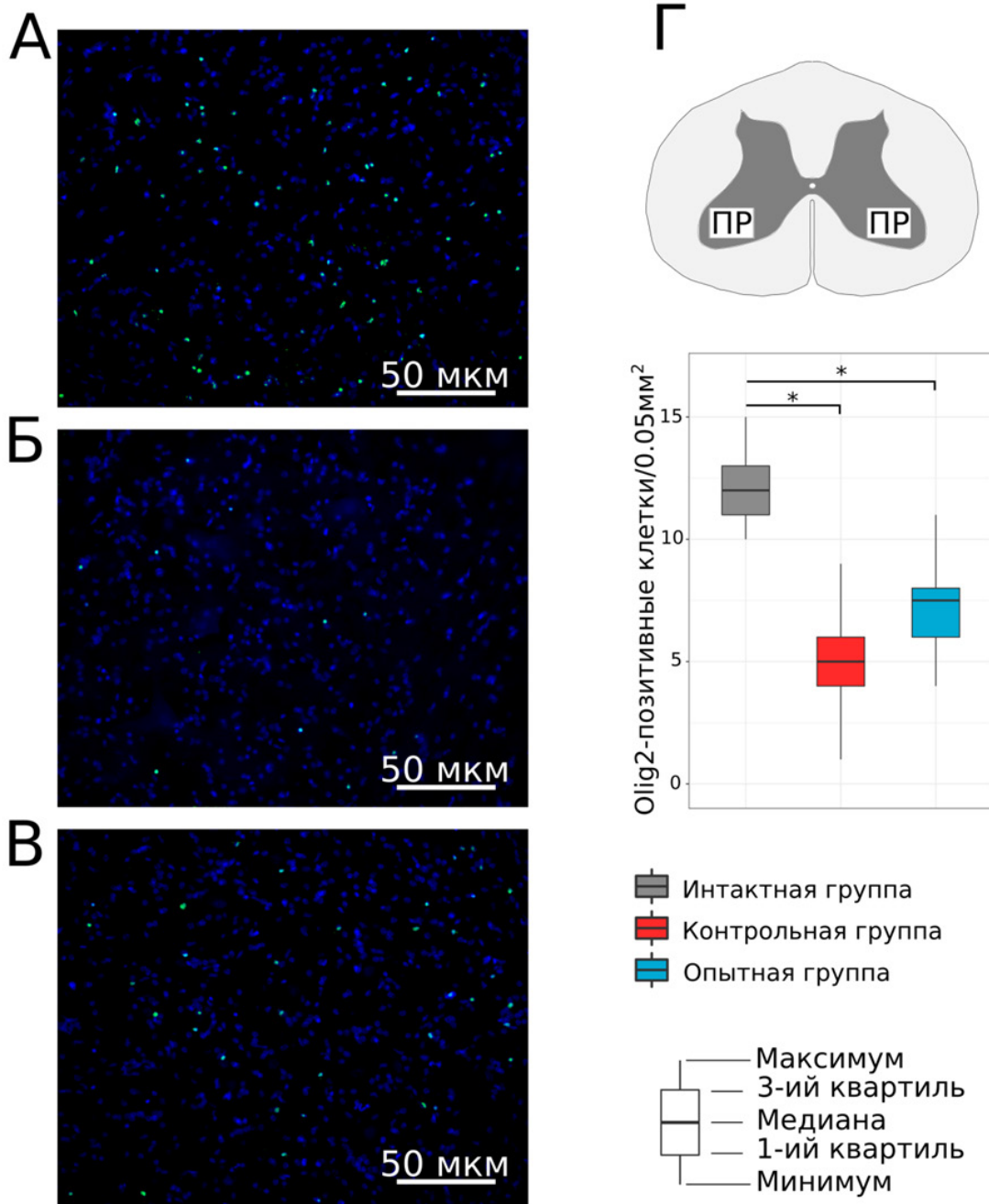
Рисунок 16 – Экспрессия ионизированной кальций-связывающей адаптерной молекулы 1 (Iba1) в передних рогах спинного мозга свиней из интактной (А), а также контрольной (Б) и опытной групп (В) через 8 недель после моделирования нейротравмы (зеленое свечение). Ядра клеток докрашены DAPI (синее свечение).

Морфометрический анализ (Г) Iba1-позитивной площади в передних рогах спинного мозга экспериментальных свиней



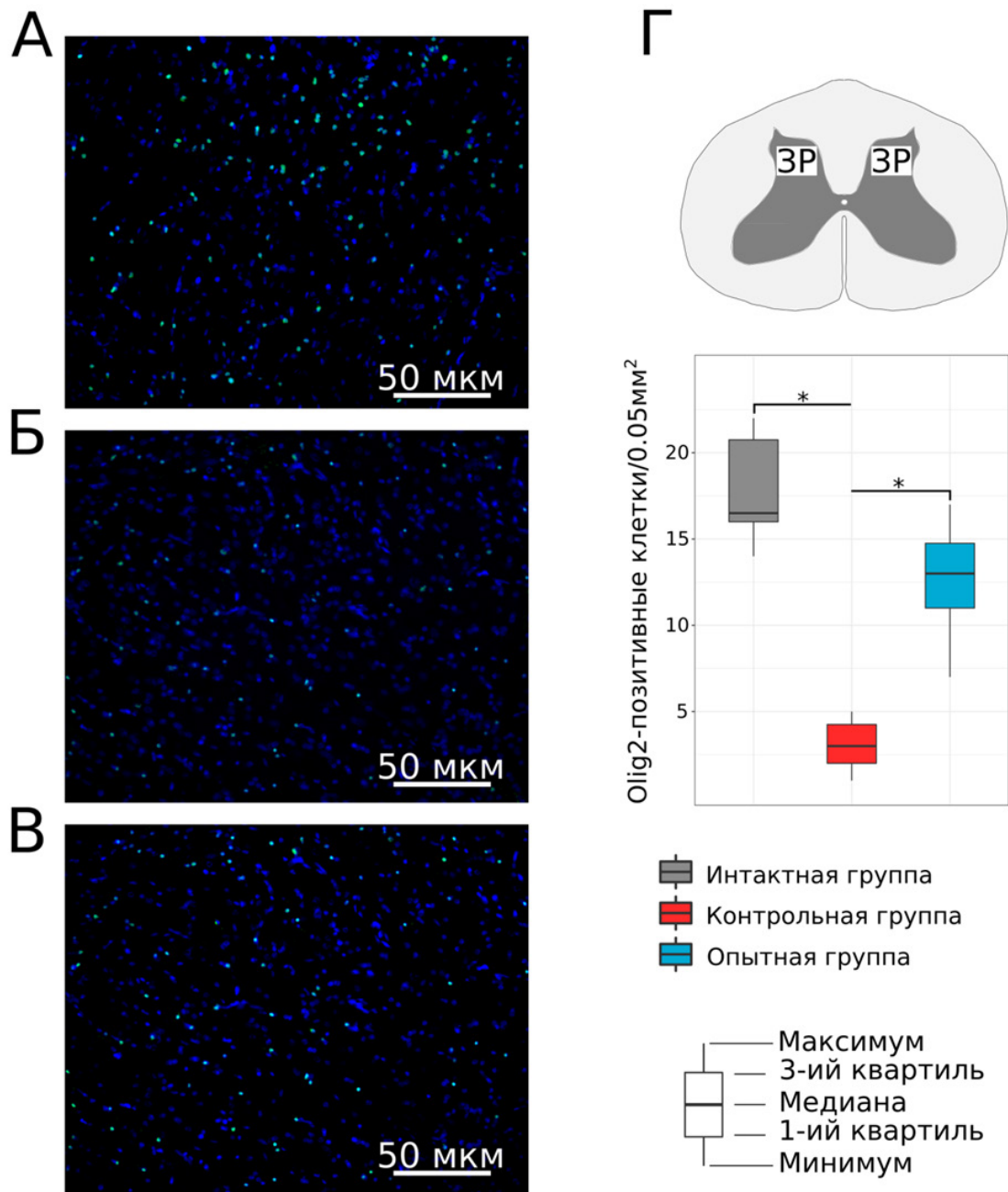
Примечание: * – статистически значимые различия, $p < 0,05$.

Рисунок 17 – Экспрессия ионизированной кальций-связывающей адаптерной молекулы 1 (Iba1) в задних рогах спинного мозга свиней из интактной (А), а также контрольной (Б) и опытной групп (В) через 8 недель после моделирования нейротравмы (зеленое свечение). Ядра клеток докрашены DAPI (синее свечение). Морфометрический анализ (Г) Iba1-позитивной площади в задних рогах спинного мозга экспериментальных животных



Примечание: * – статистически значимые различия, $p < 0,05$.

Рисунок 18 – Экспрессия транскрипционного фактора олигодендроцитов 2 (Olig2) в передних рогах спинного мозга свиней из интактной (А), а также контрольной (Б) и опытной групп (В) через 8 недель после моделирования нейротравмы (зеленое свечение). Ядра клеток докрашены DAPI (синее свечение). Морфометрический анализ (Г) количества Olig2-позитивных ядер в передних рогах спинного мозга экспериментальных животных



Примечание: * – статистически значимые различия, $p < 0,05$.

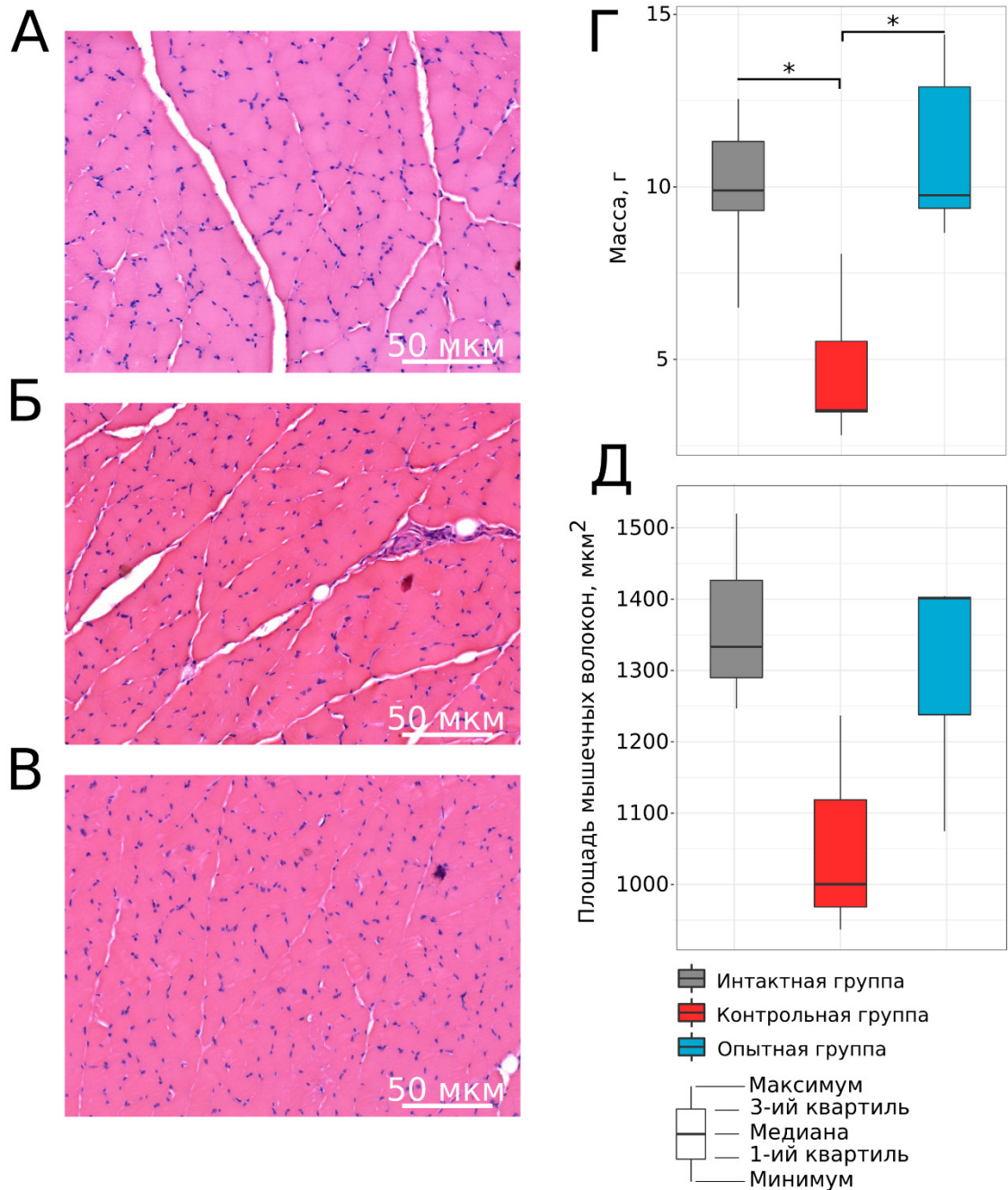
Рисунок 19 – Экспрессия транскрипционного фактора олигодендроцитов 2 (Olig2) в задних рогах спинного мозга свиней из интактной (А), а также контрольной (Б) и опытной групп (В) через 8 недель после моделирования нейротравмы (зеленое свечение). Ядра клеток докрашены DAPI (синее свечение). Морфометрический анализ (Г) количества Olig2-позитивных ядер в задних рогах спинного мозга экспериментальных животных

3.4 Морфометрический анализ скелетных мышц

Через 8 недель после моделирования ТСМ сырая масса (г) *m. soleus* в контрольной группе животных была ниже в сравнении с интактной ($p = 0,0031$) и опытной ($p = 0,0013$) группами, значения которых не отличались друг от друга (Таблица 8, Рисунок 20). Морфометрический анализ площади поперечного сечения МВ (мкм²) в *m. soleus* показал, что средняя площадь МВ в контрольной группе имела тенденцию к снижению в сравнении с интактной. В опытной группе средняя площадь МВ в *m. soleus* не отличалась от интактной группы (Таблица 8, Рисунок 20). Анализ иммунофенотипирования *m. soleus* в контрольной группе обнаружил уменьшение содержание медленных МВ по сравнению с интактной группой ($p = 0,0011736$). В *m. soleus* животных из опытной группы количество медленных МВ не отличалось от значений интактных свиней (Таблица 8, Рисунок 21).

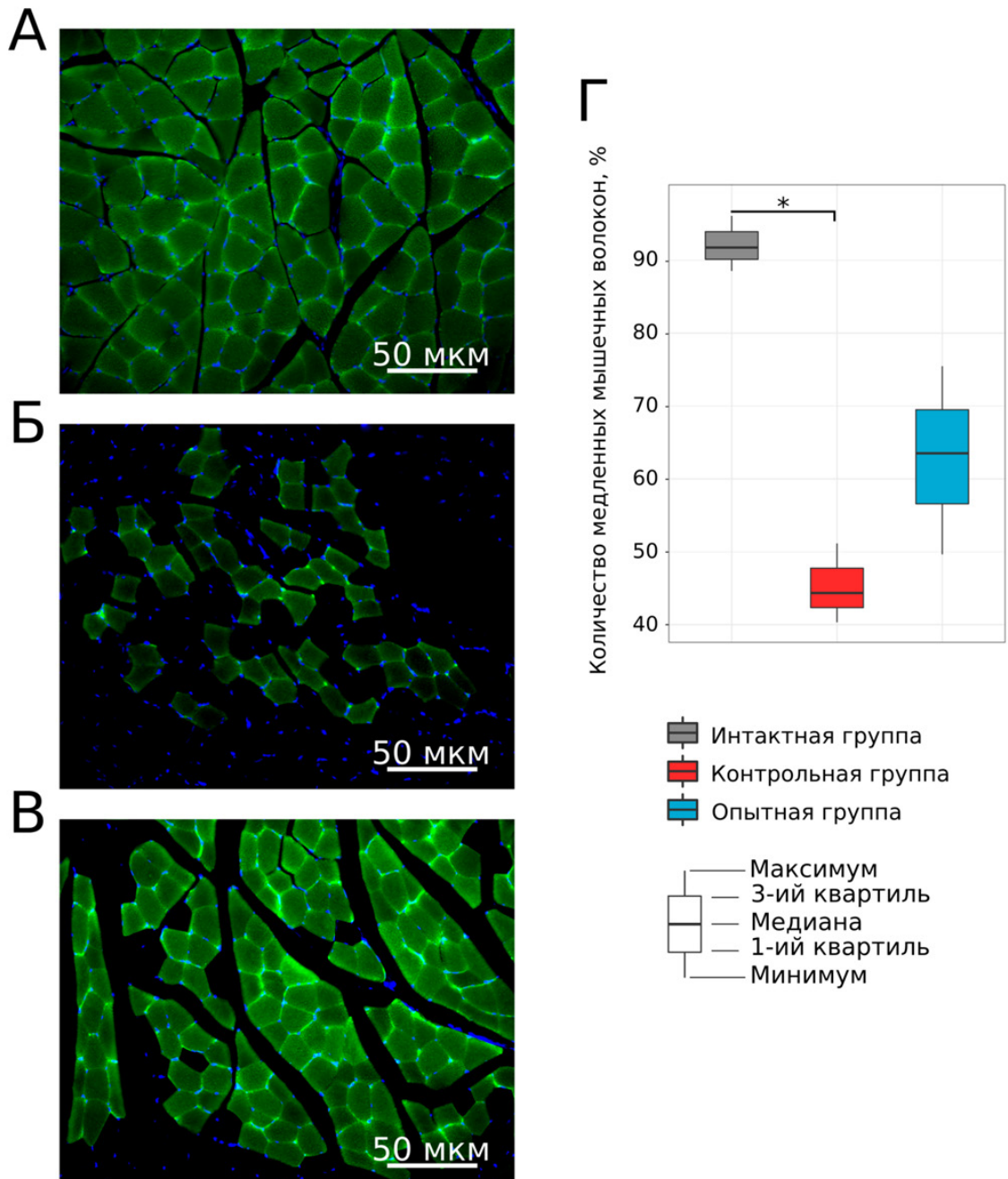
Таблица 8 – Результаты морфометрического анализа *m. soleus* у свиней экспериментальных групп

Показатель	Группа	Значение
Сырая масса (г) <i>m. soleus</i>	Интактная	9,90 (9,32; 11,32)
	Контрольная	3,52 (3,47; 5,52)
	Опытная	9,76 (9,38; 12,90)
Площадь поперечного сечения мышечных волокон (мкм ²)	Интактная	1 333,200 (1 289,87; 1 426,43)
	Контрольная	1 000,41 (968,72; 1 118,7)
	Опытная	1 401,21 (1 237,92; 1 402,64)
Содержание медленных мышечных волокон в <i>m. soleus</i> (%)	Интактная	91,74 (90,13; 93,91)
	Контрольная	44,35 (42,34; 47,75)
	Опытная	63,51 (56,58; 69,49)



Примечание: * – статистически значимые различия, $p < 0,05$.

Рисунок 20 – Морфометрический анализ камбаловидной мышцы (*m. soleus*) экспериментальных животных. Поперечные срезы скелетной мышцы, окрашенные гематоксилином и эозином, свиней из интактной (А), а также контрольной (Б) и опытной (В) групп через 8 недель после моделирования нейротравмы. Анализ сырой массы мышц (Г), анализ площади мышечных волокон (Д)



Примечание: * – статистически значимые различия, $p < 0,05$.

Рисунок 21 – Иммунофенотипирование при помощи антител к тяжелым цепям медленного миозина камбаловидной мышцы (*m. soleus*) свиней из интактной (А), а также контрольной (Б) и опытной (В) групп через 8 недель после моделирования нейротравмы (зеленое свечение). Ядра клеток окрашены DAPI (синее свечение). Анализ количества медленных мышечных волокон в *m. soleus* экспериментальных животных (Г)

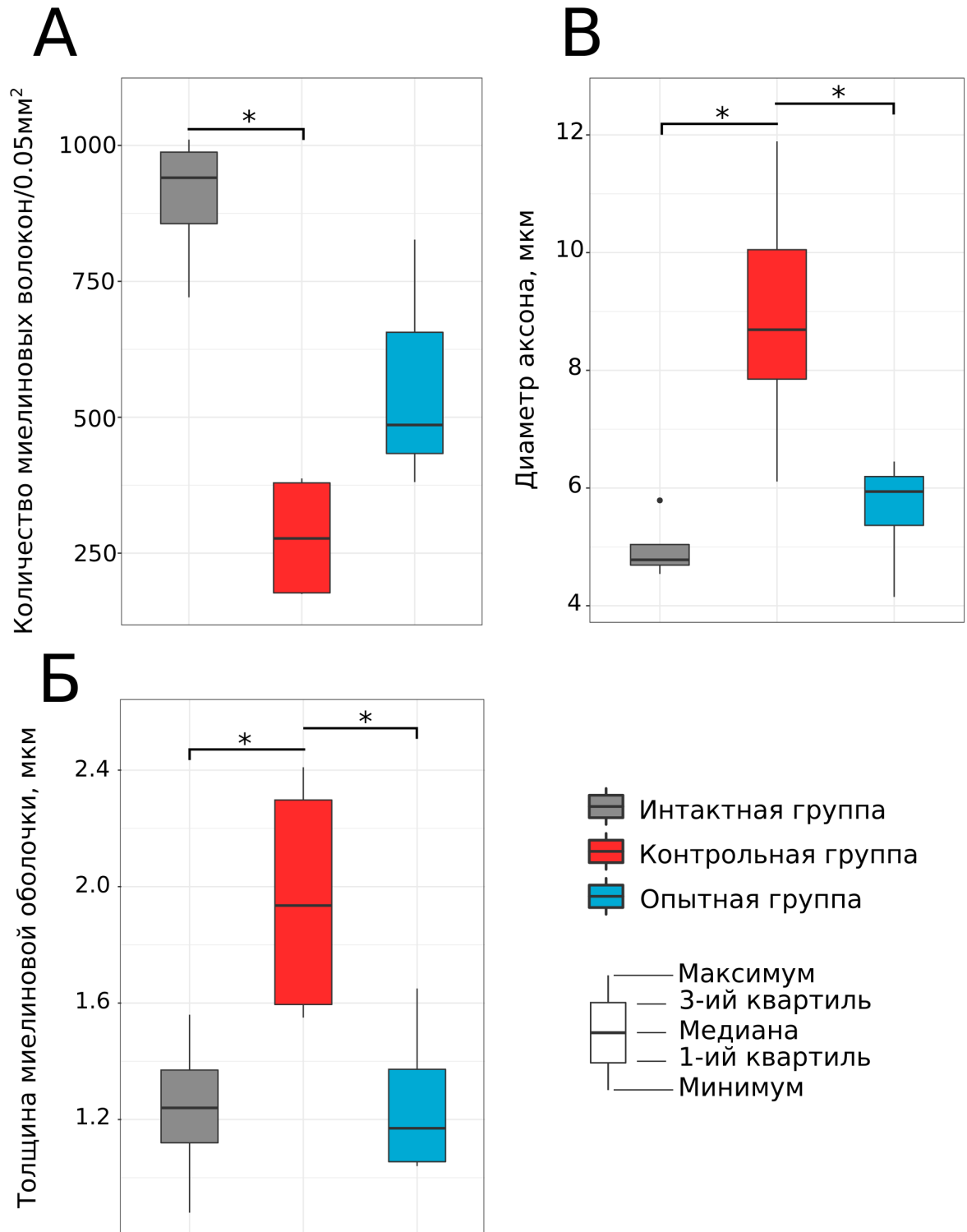
3.5 Оценка состояния большеберцового нерва в условиях травмы спинного мозга

Подсчет количества миелиновых волокон большеберцового нерва выявил снижение количества нервных волокон в контрольной группе в сравнении с интактной ($p = 0,0013749$) группой (Таблица 9, Рисунок 22А). В то же время в опытной группе количество миелиновых волокон не отличалось по сравнению с интактной.

Анализ толщины миелиновой оболочки показал его увеличение в контрольной группе по сравнению с интактной ($p = 0,0209560$) и опытной ($p = 0,0325715$) группами (Рисунок 22Б). Кроме того, в контрольной группе также выявлено увеличение диаметра аксона по сравнению с интактной ($p = 0,0033348$) и опытной ($p = 0,0155929$) группами (Рисунок 22В). В то же время в опытной группе показатели толщины миелиновой оболочки и диаметра аксона не отличались от значений интактной группы.

Таблица 9 – Результаты морфометрического анализа *n. tibialis* у свиней экспериментальных групп

Показатель	Группа	Значение
Количество миелиновых волокон/0,05 мм ²	Интактная	940,625 (856,108; 987,652)
	Контрольная	277,180 (177,037; 379,340)
	Опытная	485,850 (433,360; 656,345)
Толщина миелиновой оболочки (мкм)	Интактная	1,240 (1,120; 1,370)
	Контрольная	1,935 (1,595; 2,298)
	Опытная	1,170 (1,055; 1,372)
Диаметр аксона (мкм)	Интактная	4,78 (4,690; 5,040)
	Контрольная	8,69 (7,850; 10,050)
	Опытная	5,94 (5,365; 6,195)



Примечание: * – статистически значимые различия, $p < 0,05$.

Рисунок 22 – Морфометрический анализ количества миелиновых волокон (А), толщины миелиновой оболочки (Б) и диаметра аксона (В) в большеберцовом нерве (*n. tibialis*) экспериментальных животных

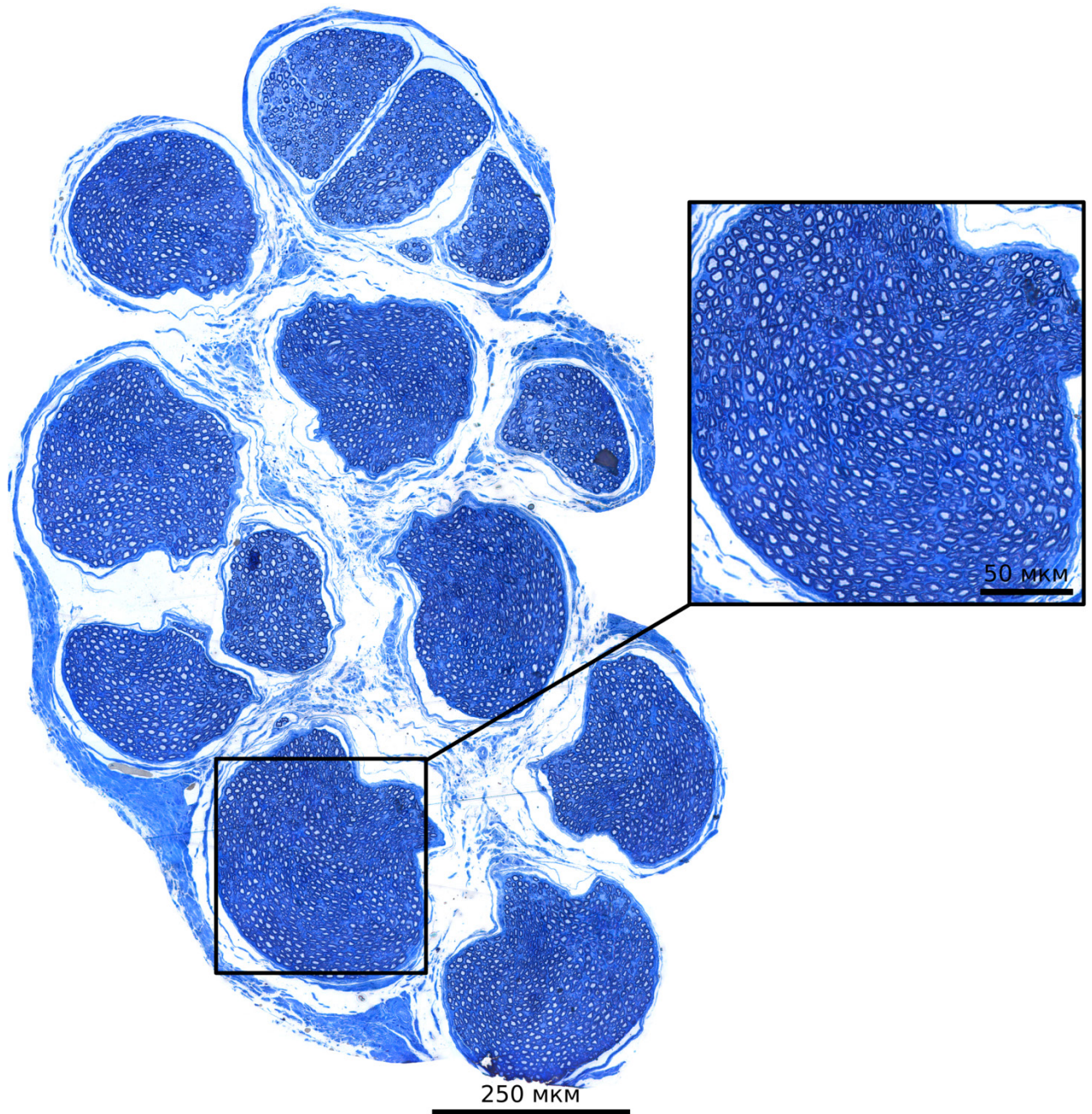


Рисунок 23 – Поперечный срез большеберцового нерва (*n. tibialis*) intactных свиней. Окраска метиленовым синим

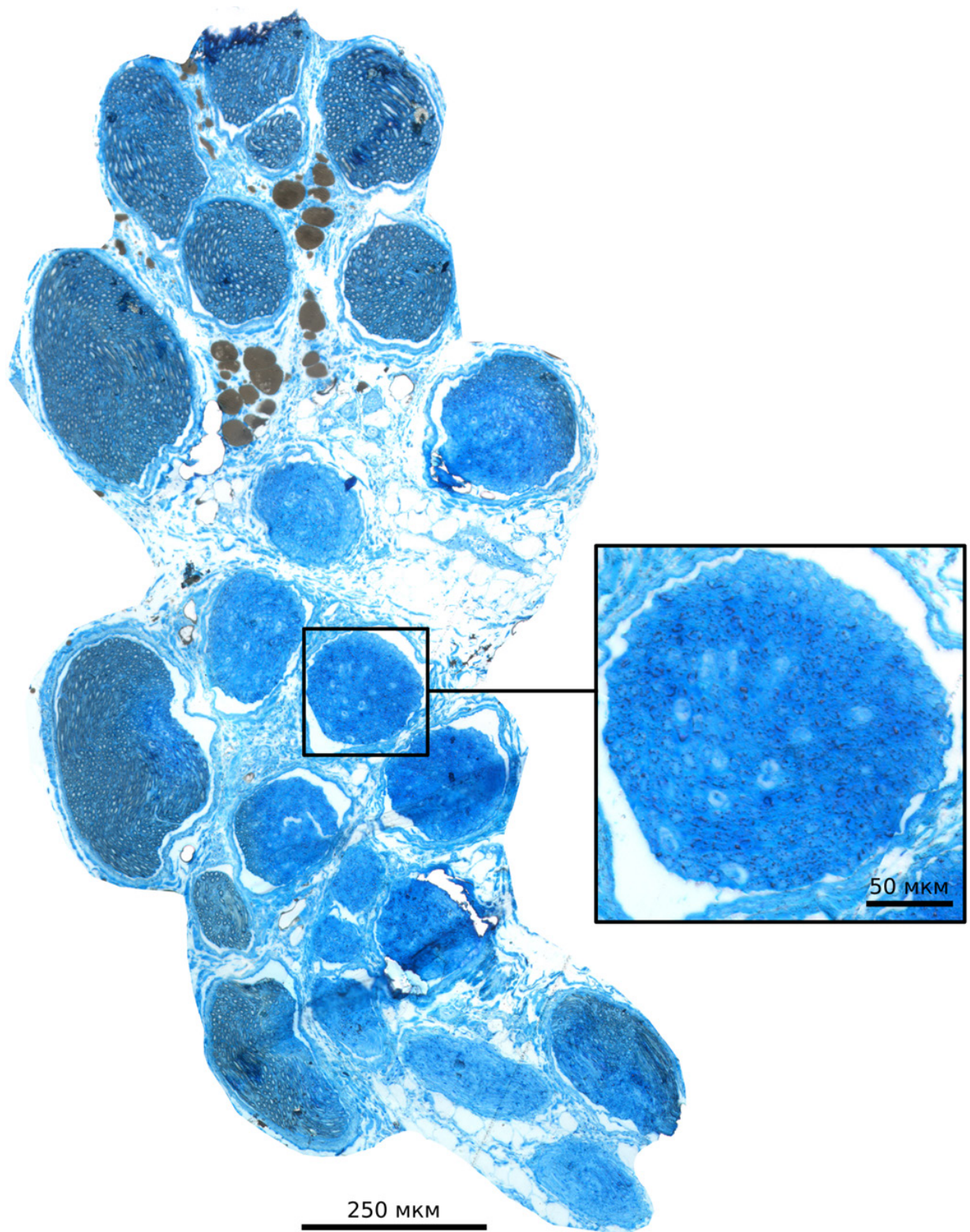


Рисунок 24 – Поперечный срез большеберцового нерва (*n. tibialis*) свиней из контрольной группы через 8 недель после моделирования нейротравмы. Окраска метиленовым синим

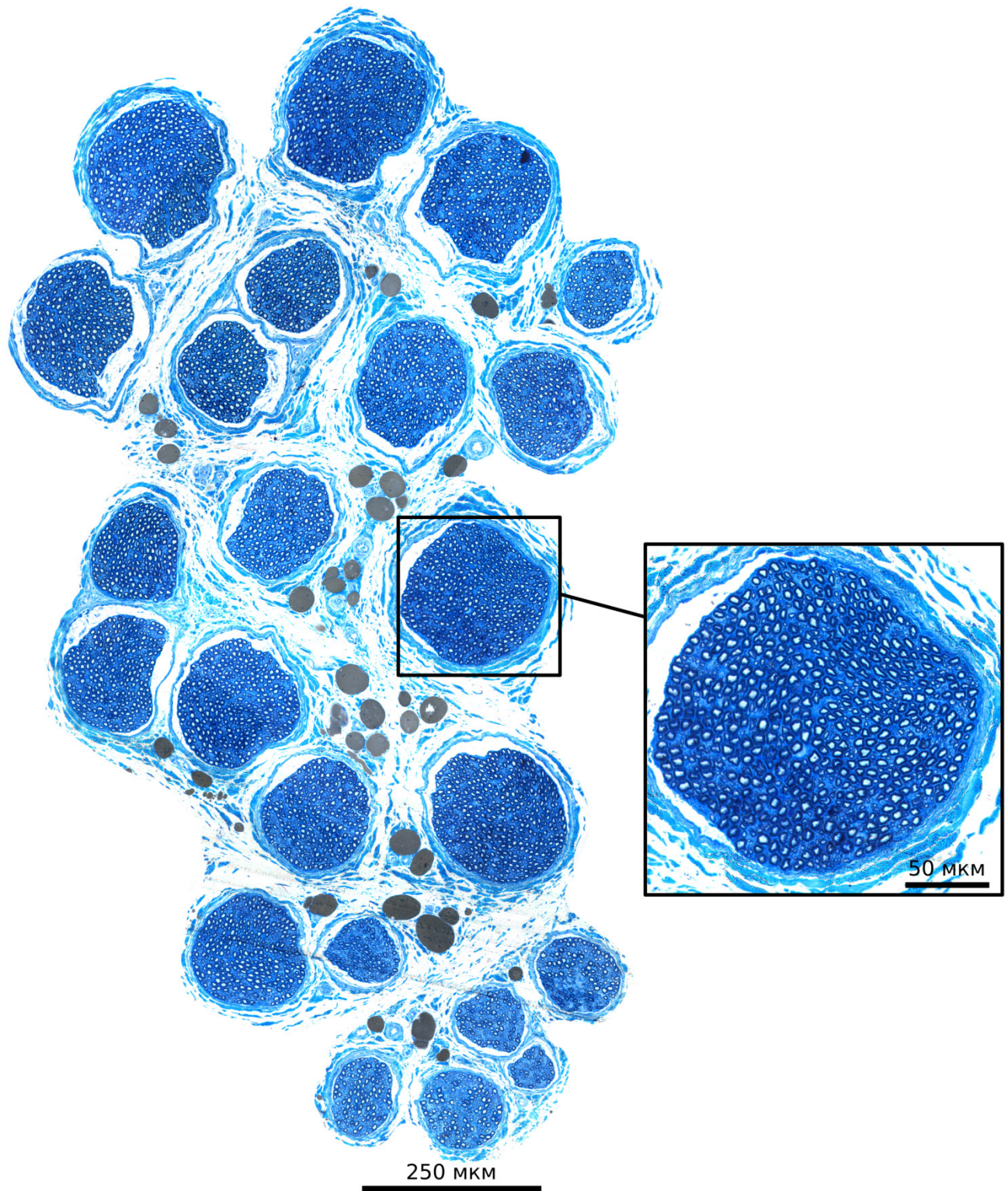


Рисунок 25 – Поперечный срез большеберцового нерва (*n. tibialis*) свиней из опытной группы через 8 недель после моделирования нейротравмы. Окраска метиленовым синим

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Травма спинного мозга у человека приводит к утрате двигательных, чувствительных и вегетативных функций различных органов, что оказывает негативное влияние на повседневную жизнедеятельность таких пациентов. Патологические процессы, развивающиеся после ТСМ, включают массовую гибель клеток СМ, разрывы нервных волокон, кровоизлияния, ишемические и воспалительные повреждения, приводящие впоследствии к образованию кист. Нейровоспаление является ключевым фактором вторичного повреждения, вовлекающим в патологический процесс практически все структуры СМ [21, 159]. Такая реакция со стороны нервных структур обусловлена активацией клеток микроглии и астроцитов, инфильтрацией области первичной травмы лейкоцитами из поврежденных сосудов [135]. В результате, в области нейротравмы происходит высвобождение значительного количества провоспалительных цитокинов, протеолитических ферментов (матриксных металлопротеиназ) и активных форм кислорода, что в свою очередь приводит к увеличению зоны первичной травмы и распространению нейровоспаления в отдаленные от травмы сегменты СМ [148, 162]. Совокупный негативный эффект нейровоспаления в удаленных областях СМ приводит к нарушению гематоспинального барьера, переходу клеток микроглии и астроцитов в реактивное состояние с последующей секрецией ими провоспалительных цитокинов и нейротоксических молекул. Выраженные воспалительные процессы в отдаленных областях СМ могут приводить как к снижению активности двигательных нейронов, так и к апоптозу клеток СМ [41]. Характер нейродегенерации в ростральных и каудальных областях СМ, удаленных от первичного очага травмы, является важным показателем эффективности методов терапии ТСМ [38].

Одним из подходов преодоления негативных последствий ТСМ является доставка в спинной мозг нейротрофических факторов, таких как NT-3, BDNF, VEGF, GDNF, NCAM, способных сдерживать гибель нейронов и стимулировать регенерацию (рост и миелинизацию аксонов, восстановление утраченных нервных

связей) [212]. Использование GDNF обусловлено его выраженным нейропротекторным действием (сдерживание апоптоза клеток, стимулирование роста аксонов и синаптогенеза), что может привести к уменьшению вторичного повреждения [158]. VEGF имеет двойное положительное действие на посттравматический спинной мозг. Во-первых, VEGF стимулирует ангиогенез, что имеет непосредственный эффект на разрешение ишемии и отека нервных структур. Во-вторых, VEGF также является нейротрофическим фактором (защищает нейроны при гипоксии, поддерживает жизнеспособность нейронов), способствующим посттравматической регенерации нервной ткани [258]. Применение NCAM для генной терапии ТСМ обусловлено его ролью в стимулировании регенерации аксонов и синаптогенеза [37].

Ранее мы изучали влияние аутологичного лейкоконцентрата, продуцирующего рекомбинантные молекулы VEGF, GDNF и NCAM, на молекулярные и клеточные сдвиги в прилегающих к эпицентру травмы областях СМ свиней. В этом исследовании было обнаружено положительное действие внутривенной инфузии аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, на морфофункциональное восстановление СМ после контузионной травмы. В ростральных и каудальных сегментах, смежных эпицентру ТСМ, на фоне действия генно-клеточного препарата установлены лучшая сохранность серого вещества СМ, восстановление экспрессии синаптических белков, таких как синаптофизин и PSD95, сдерживание развития астроглиоза и рост регенерирующих аксонов, одновременно сопровождающийся увеличением количества олигодендроцитов [136].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния внутривенной инфузии аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, на морфологическое и функциональное восстановление поясничного отдела СМ, состояние миелиновых волокон спинномозговых нервов и скелетных мышц задних конечностей у свиней после контузионной ТСМ в нижнегрудном отделе (Th8-Th9).

Через 60 суток после моделирования ТСМ у животных из контрольной

группы в поясничном отделе СМ (L6-S1) были выявлены негативные последствия нейротравмы. Сравнительный анализ иммунофлуоресцентного окрашивания с помощью АТ к специфическим белкам клеток нейроглии выявил патологическое распределение нейроглиальных клеток в поясничном отделе спинного мозга, которое было аналогично таковому вблизи эпицентра травмы [136]. Так, анализ экспрессии GFAP показал увеличение иммунопозитивной площади, занятой астроцитами, в задних рогах СМ. Увеличение иммунопозитивной площади Iba1, соответствующей локализации клеток микроглии, было обнаружено не только в задних, но и в передних рогах поясничного утолщения СМ. Вместе с тем происходило снижение количества олигодендроцитов в задних и передних рогах СМ, что было подтверждено характером экспрессии транскрипционного фактора олигодендроцитов 2 (Olig2).

У животных из опытной группы, напротив, внутривенная инфузия аутологичного лейкоконцентрата, продуцирующего рекомбинантные молекулы VEGF, GDNF и NCAM, оказала положительное влияние на ремоделирование клеток нейроглии в поясничном отделе травмированного СМ. Так, анализ GFAP-иммунопозитивной площади в передних и задних рогах поясничного отдела СМ показал отсутствие значимых различий между свиньями из интактной и опытной группами. Вместе с тем подсчет иммунопозитивных областей Iba1 выявил отсутствие статистически значимых различий между опытной и контрольной группами как в передних, так и в задних рогах СМ. Стоит отметить, что значения экспрессии Iba1 в передних рогах у свиней из опытной группы приближались к показателям животных интактной группы. Анализ экспрессии Olig2 показал увеличение количества олигодендроцитов в задних рогах СМ, а их значения были приближены к показателям интактной группы. Однако анализ количества Olig2-позитивных клеток в передних рогах СМ в этих условиях не выявил статистически значимых различий между контрольной и опытной группами.

Функциональное состояние нейронов в передних рогах поясничного утолщения СМ оценивали по характеру экспрессии пресинаптических (Chat, синаптофизин) и постсинаптических (KCC2, PSD95) белков. Ранее было показано,

что вблизи эпицентра нейротравмы происходит уменьшение иммунопозитивной площади синаптофизина и PSD95 [136]. В нашем исследовании у контрольных животных в поясничной области экспрессия синаптофизина и Chat не отличалась по сравнению с таковой у интактных свиней. Однако иммунопозитивная площадь, соответствующая PSD95 в контрольной группе, была все же меньше, чем в интактной. В опытной группе на фоне внутривенной инфузии аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами с нейротрофическим действием, показана тенденция к восстановлению экспрессии PSD95 и увеличению экспрессии Chat в поясничном отделе СМ в сравнении с интактными животными. Вместе с тем уровень экспрессии KCC2 в передних рогах СМ не отличался во всех исследуемых группах.

Таким образом, молекулярные и клеточные изменения в поясничном отделе СМ у свиней с ТСМ в нижнегрудном отделе продемонстрировали эффективность аутологичного лейкоконцентрата, продуцирующего рекомбинантные молекулы VEGF, GDNF и NCAM, для преодоления негативных последствий после ТСМ, о чем свидетельствует восстановление экспрессии синаптических белков в двигательных нейронах и положительное ремоделирование нейроглиальных клеток.

Известно, что после ТСМ серьезные морфологические и функциональные нарушения происходят и в спинномозговых нервах, гибель нейронов СМ *a priori* сопровождается деградацией их отростков в составе периферических нервов. В нашем исследовании морфометрический анализ большеберцового нерва у свиней из контрольной группы обнаружил снижение количества миелиновых волокон, увеличение толщины миелина и диаметра аксона нервного волокна. Такие изменения могут быть связаны с дегенерацией чувствительных и симпатических волокон вследствие прямого повреждения задних и латеральных столбов СМ в нижнегрудном отделе. Однако важно отметить и возможную сохранность аксонов двигательных нейронов у животных из контрольной группы, о чем косвенно свидетельствует равная экспрессия KCC2 в нейронах передних рогов поясничного отдела СМ в сравнении с животными из интактной группы. В опытной группе

животных было установлено положительное влияние аутологичного лейкоконцентрата, продуцирующего рекомбинантные молекулы VEGF, GDNF и NCAM, на сохранность миелиновых волокон периферических нервов. Количество миелиновых волокон в составе периферического нерва у свиней из опытной не отличалось от значений в интактной группе. Кроме того, толщина миелина и диаметр аксонов нервных волокон в опытной группе также свидетельствуют о сохранности спинномозговых нервов.

Общеизвестно, что экстрапирамидная и пирамидная системы координируют произвольные, автоматические и произвольные движения скелетных мышц [2]. Мышцы, ответственные за поддержание позы и выполняющие неосознаваемые движения, контролируются экстрапирамидной системой и состоят преимущественно из медленных МВ (мышцы спины, шеи и нижних конечностей, в том числе камбаловидная мышца) [199]. Тогда как мышцы, осуществляющие произвольные точные двигательные акты, регулируются со стороны пирамидной системы и содержат главным образом быстрые МВ (например, червеобразная, подошвенная, икроножная мышцы) [39, 146, 218]. Прямо или через вставочные нейроны экстрапирамидный тракт и однонейронный пирамидный путь в конечном итоге заканчиваются на двигательных нейронах, иннервирующих МВ. Роль экстрапирамидной и пирамидной систем в регуляции фенотипа мышц очевидна. Нарушение связей между центральными нейронами пирамидной и экстрапирамидной систем и двигательными нейронами СМ при ТСМ напрямую отражается на состоянии скелетных мышц задних конечностей [58, 130, 143].

Показатель поведенческого теста РТІBS у свиней после ТСМ в нижнегрудном отделе из контрольной группы через 2 недели согласно 10-бальной оценочной шкале был равен 1 баллу, а через 8 недель – достиг лишь 2,0 баллов. Результаты поведенческого теста свиней из контрольной группы согласуются с данными электрофизиологического и гистологического изучения скелетных мышц задних конечностей. Так, методом игольчатой миографии в камбаловидной мышце был обнаружен полифазный М-ответ с увеличенной длительностью и амплитудой. В этой же мышце, на фоне снижения мышечной массы, морфометрический анализ выявил уменьшение средней площади поперечного сечения скелетных МВ, а

иммунофлуоресцентный метод позволил обнаружить снижение количества медленных МВ. Таким образом, результаты поведенческого теста PTIBS и данные электрофизиологического и морфологического исследования скелетных мышц свидетельствуют о развитии денервационного синдрома у контрольных животных.

В отличие от контрольных животных, у свиней из опытной группы были документированы признаки функционального восстановления локомоторного аппарата после ТСМ. Так, у животных на фоне генной терапии поведенческий тест оценивался в 3 балла, а результаты исследования камбаловидной мышцы показали сохранность как сырой массы мышцы, так и площади МВ и фенотипических характеристик. Предотвращение атрофии камбаловидной мышцы и трансформации медленных МВ в быстрые в этих условиях свидетельствует об эффективности нейротрофического контроля скелетных МВ через аксоны двигательных нейронов поясничного отдела СМ.

Наблюдаемое восстановление локомоторного аппарата у свиней из опытной группы однозначно является результатом влияния рекомбинантных VEGF, GDNF и NCAM, продуцируемых генетически модифицированными лейкоцитами, на сохранность серого вещества, восстановление экспрессии PSD95 и Chat в двигательных нейронах СМ, а также положительное ремоделирование нейроглиальных клеток в области локализации мотонейронов, напрямую иннервирующих скелетные мышцы задних конечностей. Очевидно, что сохранность двигательных нейронов поясничного отдела СМ распространяется и на их аксоны в составе спинномозговых нервов, обеспечивающих нейротрофический контроль скелетных мышц, а это в целом приводит к улучшению движений в задних конечностях животных после ТСМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лечение последствий спинальной травмы имеет важное социально-экономическое значение как для пациентов, так и для системы здравоохранения в целом [21]. Неврологические дисфункции у таких пациентов, как правило, связаны с временными или необратимыми нарушениями функций СМ, что может привести к их инвалидизации и невозможности продолжения профессиональной деятельности, а это негативно сказывается на психосоциальном состоянии всех членов семьи. Как правило примерно у 50% пациентов с ТСМ (класс В по шкале ASIA) существенного восстановления функций СМ не происходит, во-первых, ввиду изначально ограниченной регенераторной способности ЦНС, а во-вторых, ввиду отсутствия эффективных методов терапии, что в настоящее время является актуальной медицинской проблемой [40, 89, 129, 202, 256].

На сегодняшний день методы терапии ТСМ являются ограниченными ввиду их малой эффективности и прежде всего направлены на диагностику и хирургическое вмешательство. Наиболее широко применяемым методом минимизации последствий ТСМ является хирургическая декомпрессия СМ с одновременным поддержанием артериального давления. Однако эти методы лечения эффективны лишь на ранних этапах развития посттравматических повреждений СМ [9, 114, 201].

Вместе с тем негативные проявления последствий первичной травмы сопровождаются развитием вторичной травмы, характеризующейся массовой гибелью клеток СМ, демиелинизацией аксонов, образованием астроглиального рубца и кистозных полостей [21]. Для предотвращения развития процессов вторичной травмы и стимулирования посттравматической нейрорегенерации необходим поиск принципиально новых методов терапии последствий ТСМ. Перспективными направлениями решения этой проблемы являются генная и клеточная терапии. Несмотря на убедительные доказательства эффективности генной терапии при ТСМ, к сожалению, существуют факторы, ограничивающие ее применение в практической медицине. Например, при использовании вирусных

векторов в качестве систем доставки терапевтических генов к негативным факторам стоит отнести ограниченную емкость вектора, продолжительность экспрессии терапевтических генов, их возможную цитотоксичность и иммуногенность, а также очень высокую стоимость препаратов на их основе [43, 259]. Еще одним возможным подходом является использование стволовых или соматических клеток различного происхождения, применяемых не только для замещения утраченных клеток СМ после его травмы, но и для продукции ростовых и нейротрофических факторов, стимулирующих посттравматическую регенерацию [131]. К тому же проведенные клинические испытания лишь подтверждают безопасность клеточной терапии.

Ранее нами было показано, что внутривенное введение аутологичных лейкоцитов, трансдуцированных аденовирусными векторами и содержащих по отдельности терапевтические гены сосудистого эндотелиального фактора роста (*vegfl65*), глиального нейротрофического фактора (*gdnf*) и нейрональной молекулы клеточной адгезии (*ncam1*), свиньям с ТСМ способствовало положительному ремоделированию нейроглии и большей сохранности нервных структур СМ в сегментах смежных эпицентру травмы [136]. Вместе с тем функциональные и структурные изменения, происходящие в отдаленных от эпицентра травмы областях, развивающиеся при вторичном повреждении, также являются предметом активных исследований [41]. Известно, что вторичная травма после повреждения СМ сопровождается не только нейровоспалением с последующей нейродегенерацией в эпицентре повреждения, но также вызывает морфофункциональные изменения в отдаленных от травмы областях [88, 142]. Переход нейроглиальных клеток в реактивное состояние с дальнейшей интенсивной секрецией провоспалительных и нейротоксических молекул способствует распространению вторичных повреждений в отдаленных от эпицентра травмы областях, а следовательно, неврологическому ухудшению [41]. Вместе с тем гибель двигательных нейронов с последующей дегенерацией их аксонов заканчивается распадом нервно-мышечных синапсов, что приводит к атрофии иннервируемых ими скелетных мышц и развитию в них денервационного

синдрома [130]. Отсутствие электрической стимуляции мышечных волокон со стороны двигательных нейронов, безусловно, лишает их возможности к сокращению и, как следствие, выполнению двигательной функции [145].

Поэтому целью настоящего исследования явилось установление эффективности использования аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами сосудистого эндотелиального фактора роста (*vegfl65*), глиального нейротрофического фактора (*gdnf*) и нейрональной молекулы клеточной адгезии (*ncam1*), на морфофункциональное восстановление поясничного отдела спинного мозга у свиней после контузионной травмы в нижнегрудном отделе.

В соответствии с поставленной целью в работе были изучены последствия развития вторичной травмы после ТСМ в нижнегрудном отделе свиньи на морфофункциональное состояние поясничного утолщения СМ и влияние аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами с нейротрофическим действием (*vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*), на нервную ткань СМ на уровне L6-S1, большеберцовый нерв и иннервируемую им камбаловидную мышцу задней конечности через 2 месяца после нейротравмы.

Аутологичный лейкоконцентрат, обогащенный искусственным генетическим материалом, готовили из периферической крови свиней и химерных аденовирусных векторов (Ad5/F35), несущих по отдельности рекомбинантные гены *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, по оригинальному протоколу [82, 152]. Животным из опытной группы через 4 часа после моделирования контузионной ТСМ в нижнегрудном отделе внутривенно вводили аутологичный лейкоконцентрат, обогащенный терапевтическими генами. Контрольным животным после операции вводили нативный аутологичный лейкоконцентрат. Через 2 месяца после моделирования нейротравмы в нижнегрудном отделе (Th8-Th9) морфологическое и функциональное восстановление поясничного отдела СМ (L6-S1), состояние миелиновых волокон большеберцового нерва и камбаловидной мышцы задних конечностей у свиней оценивали с помощью поведенческих тестов, гистологических и электрофизиологических методов исследования.

Результаты исследования поясничного отдела СМ у свиней из контрольной

группы с контузионной ТСМ в нижнегрудном отделе подтвердили наличие негативных изменений, развивающихся в результате вторичной травмы. Морфометрический анализ поясничного отдела СМ у таких животных выявил увеличение площади, занимаемой реактивными астроцитами и клетками микроглии, со снижением содержания миелинообразующих олигодендроцитов, что сопровождалось обнаруженным нами снижением экспрессии белка постсинаптической плотности молекулярной массой 95 кДа (PSD95) нейронами передних рогов СМ. Эти данные согласуются с обнаруженным уменьшением количества миелиновых волокон в составе большеберцового нерва, увеличением их диаметра и толщины миелиновой оболочки при ТСМ. Атрофия камбаловидной мышцы, снижение в ней площади поперечного сечения МВ и трансформация медленных МВ в быстрые свидетельствуют о нарушении нейтрофического контроля со стороны двигательных нейронов, утративших связь с центральными нейронами ЦНС в этих условиях.

Внутривенное введение аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного терапевтическими генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, свиньям через 4 часа после моделирования контузионной ТСМ в нижнегрудном отделе продемонстрировало положительное влияние генной терапии на экспрессию синаптических белков (холинацетилтрансферазы и PSD95) в нейронах и ремоделирование клеток нейроглии (сдерживание астроглиоза и увеличение числа олигодендроцитов) в поясничном отделе СМ. О сохранности двигательных нейронов в условиях внутривенного введения аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного терапевтическими генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, косвенно свидетельствуют положительные данные морфометрического анализа нервных волокон большеберцового нерва (количество миелиновых волокон, диаметр аксонов и толщина миелиновой оболочки). Более полное восстановление двигательной активности у животных из опытной группы подтверждается предотвращением атрофии камбаловидной мышцы и сохранностью площади поперечного сечения МВ и «медленного» фенотипа мышцы, что, возможно, обусловлено большей эффективностью нейротрофического контроля скелетных мышц со стороны

двигательных нейронов поясничного отдела СМ (Рисунок 26).

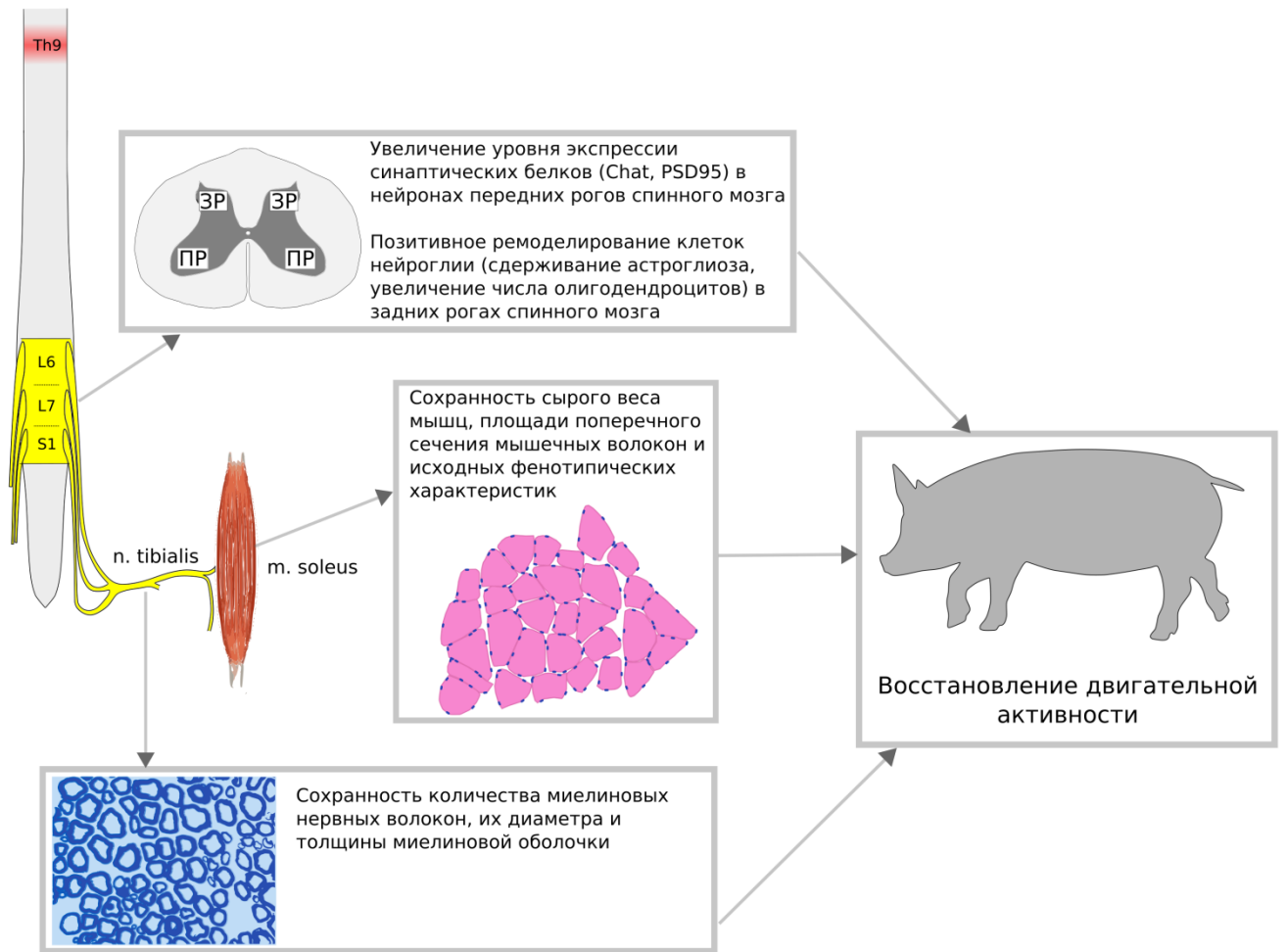


Рисунок 26 – Влияние однократного внутривенного введения аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного терапевтическими генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, свиньям через 4 часа после моделирования контузионной травмы спинного мозга в нижнегрудном отделе на характеристики поясничного утолщения спинного мозга, большеберцового нерва и камбаловидной мышцы

Положительное влияние внутривенного введения аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, на морфофункциональное восстановление СМ свиньи после ТСМ в нижнегрудном отделе, по-видимому, обусловлено действием привнесенных клетками аутологичного лейкоконцентрата факторов VEGF165, GDNF и NCAM1

(эффективная экспрессия *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1* доказана в исследованиях *in vitro*) как в эпицентре травмы СМ (выживаемость нейронов, рост аксонов и сдерживание астроглиоза, установленные ранее), так и в удаленном от эпицентра поясничном утолщении СМ (обнаружена сохранность двигательных нейронов и их аксонов и, как следствие, эффективный нейротрофический контроль скелетных мышц).

Таким образом, полученные в представленном исследовании результаты дают основание заключить, что внутривенная инфузия аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, является потенциально успешным многообещающим подходом для преодоления последствий ТСМ.

ВЫВОДЫ

1. Разработан способ получения генно-клеточного препарата на основе лейкоконцентрата, выделенного из периферической крови свиньи, и химерных аденовирусных векторов, несущих по отдельности гены сосудистого эндотелиального фактора роста (Ad5/35F-VEGF165), глиального нейротрофического фактора (Ad5/35F-GDNF) и нейрональной молекулы клеточной адгезии (Ad5/35F-NCAM1) в равном соотношении, с подтвержденной продукцией рекомбинантных белков.

2. У свиней с контузионной травмой спинного мозга в нижнегрудном отделе (Th8–Th9) через 60 суток после операции в удаленном от эпицентра нейротравмы поясничном отделе (L6-S1) выявлены:

1) снижение экспрессии в нейронах передних рогов спинного мозга белка постсинаптической плотности 95 кДа (PSD95);

2) увеличение экспрессии глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) астроцитами и ионизированной кальций-связывающей адаптерной молекулы 1 (Iba1) клетками микроглии в передних и задних рогах спинного мозга;

3) снижение количества миелинообразующих клеток, экспрессирующих транскрипционный фактор олигодендроцитов 2 (Olig2) в передних и задних рогах спинного мозга.

3. У свиней через 60 суток после моделирования контузионной травмы спинного мозга в нижнегрудном отделе (Th8–Th9) в камбаловидной мышце на фоне нарушения двигательной активности (2 балла по шкале PTIBS), а также снижения мышечной массы выявлен полифазный М-ответ с увеличенной длительностью и амплитудой, сопровождающийся уменьшением средней площади поперечного сечения мышечных волокон и количества медленных мышечных волокон; в составе большеберцового нерва обнаружены снижение количества миелиновых волокон, увеличение толщины миелина и диаметра аксона нервного волокна.

4. Положительные морфофункциональные изменения спинного мозга у свиней с контузионной травмой в нижнегрудном отделе после однократного

внутривенного введения аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, обусловлено:

1) увеличением экспрессии синаптических белков (Chat, PSD95) в нейронах передних рогов, а также позитивным ремоделированием клеток нейроглии (снижение астроглиоза и увеличение числа олигодендроцитов) в задних рогах поясничного утолщения спинного мозга;

2) восстановлением двигательной активности (3 балла по шкале RTIBS) на фоне сохранности веса камбаловидной мышцы, площади поперечного сечения мышечных волокон и их основных фенотипических характеристик;

3) сохранностью количества миелиновых нервных волокон, их диаметра и толщины миелиновой оболочки большеберцового нерва.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Впервые на основе аутологичных лейкоцитов свиньи и аденовируса человека 5 серотипа (Ad5), экспрессирующего фиберы аденовируса 35 серотипа (Ad5/F35) и несущего по отдельности гены *vegfl65*, *gdnf*, *ncam1*, получен инновационный генно-клеточный препарат с нейропротекторным действием. Результаты исследования установили эффективность и механизм действия аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генетическим материалом, при его использовании для преодоления последствий ТСМ. Полученные данные о способе приготовления и использовании аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами *vegfl65*, *gdnf*, *ncam1*, у свиньи с ТСМ для сдерживания вторичного повреждения СМ могут стать основой для разработки персонализированного генно-клеточного препарата на основе лейкоцитов пациента и терапевтических генов с нейротрофическим действием для стимулирования посттравматической регенерации СМ. Результаты исследования открывают также перспективы использования данной биотехнологической платформы в терапии сосудистых и дегенеративных заболеваний ЦНС.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

КТСМ	контузионная травма спинного мозга
ЛВ	лентивирусы
МВ	мышечные волокна
МКПК	моноклеарные клетки пуповинной крови
МСК	мезенхимальные стволовые клетки
НСК	нейральные стволовые клетки
ОНК	обкладочные нейроэпителиальные клетки
СМ	спинной мозг
ТСМ	травма спинного мозга
ЦНС	центральная нервная система
ШК	шванновские клетки
AAV	адено-ассоциированные вирусы
Ad	аденовирусы
Ad5/F35	аденовирусы 5 серотипа, экспрессирующие фибры аденовирусов 35 серотипа
ANG1	ангиопоэтин-1
ASIA	импактная шкала американской ассоциации спинальной травмы
BDNF	мозговой нейротрофический фактор
Chat	холинацетилтрансфераза
CNTF	цилиарный нейротрофический фактор
DAPI	4',6-диамидино-2-фенилиндол
FGF	фактор роста фибробластов
FGF2	фактор роста фибробластов-2
GDNF	глиальный нейротрофический фактор
GFAP	глиальный фибриллярный кислый белок
Iba1	ионизированная кальций-связывающая адаптерная молекула 1
IL-1	интерлейкин-1
IL-10	интерлейкин-10
IL-12	интерлейкин-12

IL-13	интерлекин-13
IL-18	интерлейкин-18
IL-2	интерлейкин-2
IL-4	интерлекин-4
IL-6	интерлейкин-6
KCC2	калий-хлорный котранспортер 2
NCAM	молекула клеточной адгезии нейронов
NGF	фактор роста нервов
NT-3	нейротрофин-3
Olig2	транскрипционный фактор олигодендроцитов 2
PDGF	фактор роста тромбоцитов
PSD95	белок постсинаптической плотности молекулярной массой 95 кДа
PTIBS	шкала поведения свиньи при травме грудного отдела спинного мозга
TGF- β	трансформирующий фактор роста-бета
TNF- α	фактор некроза опухоли- α
TrkB	рецептор тирозин киназы B
TrkC	рецептор тирозин киназы C
VEGF	сосудистый эндотелиальный фактора роста

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Влияние клеточно-опосредованной доставки комбинации генов VEGF165, GDNF и NCAM1 на молекулярные и клеточные реакции в спинном мозге свиней с контузионной травмой / М. А. Давлеева, Ф. В. Баширов, А. А. Измайлов [и др.] // Гены и Клетки. – 2020. – Т. 15. – № 3. – С. 85–91.
2. Исламов, Р. Р. Нейротрофический контроль пластичности скелетной мышцы млекопитающих / Р. Р. Исламов, В. В. Валиуллин // Неврологический вестник. – 2014. – Т. XLVI. – № 3. – С. 56–64.
3. Кубрак, Н. В. Морфологические изменения седалищного нерва при экспериментальном моделировании контузионного повреждения спинного мозга у крыс / Н. В. Кубрак, Т. Н. Варсегова, С. О. Рябых // Хирургия позвоночника. – 2021. – Т. 18. – № 3. – С. 36–42.
4. Морозов, И. Н. Эпидемиология позвоночно-спинномозговой травмы (обзор) / И. Н. Морозов, С. Г. Млявых // Медицинский Альманах. – 2011. – № 4 (17). – С. 157–159.
5. Новосёлова, И. Н. Этиология и клиническая эпидемиология позвоночно-спинномозговой травмы. Литературный обзор / И. Н. Новосёлова // Российский нейрохирургический журнал имени профессора А. Л. Поленова. – 2019. – Т. 11. – № 4. – С. 84–92.
6. Транстравматическая эпидуральная электростимуляция способствует сохранности спинного мозга и скелетных мышц у свиней / Р. В. Шевченко, Р. Р. Гарифулин, В. В. Валиуллин [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2024. – Т. 178. – № 10. – С. 516–520.
7. Эпидемиология травм позвоночника и спинного мозга / В. С. Толкачев, С. П. Бажанов, В. Ю. Ульянов [и др.] // Саратовский Научно-Медицинский Журнал. – 2018. – Т. 14. – № 3. – С. 592–595.
8. A biosafety study of human umbilical cord blood mononuclear cells transduced with adenoviral vector carrying human vascular endothelial growth factor cDNA in vitro / I. I. Salafutdinov, D. Z. Gatina, M. I. Markelova [et al.] // Biomedicines.

– 2023. – Vol. 11. – № 7. – P. 2020.

9. A clinical practice guideline on the timing of surgical decompression and hemodynamic management of acute spinal cord injury and the prevention, diagnosis, and management of intraoperative spinal cord injury: introduction, rationale, and scope / L. A. Tetreault, B. K. Kwon, N. Evaniew [et al.] // *Global Spine Journal*. – 2024. – Vol. 14. – № 3. – P. 10–24.

10. A comparative study of different stem cell transplantation for spinal cord injury: a systematic review and network meta-analysis / S. Liu, H. Zhang, H. Wang [et al.] // *World Neurosurgery*. – 2022. – Vol. 159. – A Comparative Study of Different Stem Cell Transplantation for Spinal Cord Injury. – P. 232–243.

11. A novel porcine model of traumatic thoracic spinal cord injury / J. H. T. Lee, C. F. Jones, E. B. Okon [et al.] // *Journal of Neurotrauma*. – 2013. – Vol. 30. – № 3. – P. 142–159.

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

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

14. AAV-mediated VEGFA overexpression promotes angiogenesis and recovery of locomotor function following spinal cord injury via PI3K/Akt signaling / X. Miao, J. Lin, A. Li [et al.] // *Experimental Neurology*. – 2024. – Vol. 375. – P. 114739.

15. Activation of neuroprotective microglia and astrocytes at the lesion site and in the adjacent segments is crucial for spontaneous locomotor recovery after spinal cord injury / A. Kisucká, K. Bimbová, M. Bačová [et al.] // *Cells*. – 2021. – Vol. 10. – № 8. – P. 1943.

16. Adeno-associated virus engineering and load strategy for tropism modification, immune evasion and enhanced transgene expression / X. Zhou, J. Liu, S. Xiao [et al.] // *International Journal of Nanomedicine*. – 2024. – Vol. 19. – P. 7691–7708.

17. Adenovirus biology, recombinant adenovirus, and adenovirus usage in gene therapy / M. Watanabe, Y. Nishikawaji, H. Kawakami, K.-I. Kosai // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13. – № 12. – P. 2502.
18. Adenovirus-mediated delivery of GDNF ameliorates corticospinal neuronal atrophy and motor function deficits in rats with spinal cord injury / X.-Q. Tang, Y. Wang, Z.-H. Huang [et al.] // *Neuroreport*. – 2004. – Vol. 15. – № 3. – P. 425–429.
19. Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine / C. S. Lee, E. S. Bishop, R. Zhang [et al.] // *Genes & Diseases*. – 2017. – Vol. 4. – № 2. – P. 43–63.
20. Advances and challenges in spinal cord injury treatments / M. A. Alvi, K. M. Pedro, A. I. Quddusi, M. G. Fehlings // *Journal of Clinical Medicine*. – 2024. – Vol. 13. – № 14. – P. 4101.
21. Alizadeh, A. Traumatic spinal cord injury: an overview of pathophysiology, models and acute injury mechanisms / A. Alizadeh, S. M. Dyck, S. Karimi-Abdolrezaee // *Frontiers in Neurology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 282.
22. Andoh, M. Comparative review of microglia and monocytes in CNS phagocytosis / M. Andoh, R. Koyama // *Cells*. – 2021. – Vol. 10. – № 10. – P. 2555.
23. Angiogenesis in spinal cord injury: progress and treatment / K. Tsivelekas, D. S. Evangelopoulos, D. Pallis [et al.] // *Cureus*. – 2022. – Vol. 14. – Angiogenesis in Spinal Cord Injury. – № 5. – P. e25475.
24. Angiogenic microspheres promote neural regeneration and motor function recovery after spinal cord injury in rats / S. Yu, S. Yao, Y. Wen [et al.] // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – P. 33428.
25. Application and challenges of olfactory ensheathing cells in clinical trials of spinal cord injury / H.-Y. Huang, M.-J. Xiong, F.-Q. Pu [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2024. – Vol. 963. – P. 176238.
26. Arabi, F. Gene therapy clinical trials, where do we go? An overview / F. Arabi, V. Mansouri, N. Ahmadbeigi // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2022. – Vol. 153. – P. 113324.
27. Astrocytes in spinal cord injury: current opportunities and prospects for

directional polarization / A. Bilalova, O. Tutova, Y. Mukhamedshina, A. Rizvanov // *Frontiers in Bioscience-Landmark*. – 2024. – Vol. 29. – № 3. – P. 94.

28. Autophagy inhibition favors survival of rubrospinal neurons after spinal cord hemisection / E. Bisicchia, L. Latini, V. Cavallucci [et al.] // *Molecular Neurobiology*. – 2017. – Vol. 54. – № 7. – P. 4896–4907.

29. Axonal regeneration after spinal cord injury: molecular mechanisms, regulatory pathways, and novel strategies / M. I. Elmalky, G. Alvarez-Bolado, A. Younsi, T. Skutella // *Biology*. – 2024. – Vol. 13. – № 9. – P. 703.

30. Bilchak, J. N. Exercise-induced plasticity in signaling pathways involved in motor recovery after spinal cord injury / J. N. Bilchak, G. Caron, M.-P. Côté // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 9. – P. 4858.

31. Biomaterial-based gene therapy / Y. Yu, Y. Gao, L. He [et al.] // *MedComm*. – 2023. – Vol. 4. – № 3. – P. e259.

32. Bone marrow-derived monocytes drive the inflammatory microenvironment in local and remote regions after thoracic spinal cord injury / D. M. Norden, T. D. Faw, D. B. McKim [et al.] // *Journal of Neurotrauma*. – 2019. – Vol. 36. – № 6. – P. 937–949.

33. Bonfanti, L. The PSA-NCAM-positive “immature” neurons: an old discovery providing new vistas on brain structural plasticity / L. Bonfanti, T. Seki // *Cells*. – 2021. – Vol. 10. – № 10. – P. 2542.

34. Bradbury, E. J. Moving beyond the glial scar for spinal cord repair / E. J. Bradbury, E. R. Burnside // *Nature Communications*. – 2019. – Vol. 10. – № 1. – P. 3879.

35. Braun, T. Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis / T. Braun, M. Gautel // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2011. – Vol. 12. – № 6. – P. 349–361.

36. Budd, M. A. Psychosocial consequences of spinal cord injury: a narrative review / M. A. Budd, D. R. Gater, I. Channell // *Journal of Personalized Medicine*. – 2022. – Vol. 12. – № 7. – P. 1178.

37. Cell adhesion molecules and protein synthesis regulation in neurons / I. Kozlova, S. Sah, R. Keable [et al.]. – Text : electronic // *Frontiers in Molecular*

Neuroscience. – 2020. – Vol. 13. – URL: <https://www.frontiersin.org/journals/molecular-neuroscience/articles/10.3389/fnmol.2020.592126/full> (date accessed: 03.02.2025).

38. Cellular and molecular gradients in the ventral horns with increasing distance from the injury site after spinal cord contusion / I. M. Kabdesh, Y. O. Mukhamedshina, S. S. Arkhipova [et al.] // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2022. – Vol. 16. – P. 817752.

39. Characterization of fiber types in different muscles of the hindlimb in female weanling and adult wistar rats / A. S. Cornachione, P. C. O. Benedini-Elias, J. C. Polizello [et al.] // *Acta Histochemica et Cytochemica*. – 2011. – Vol. 44. – № 2. – P. 43–50.

40. Characterizing natural recovery after traumatic spinal cord injury / S. Kirshblum, B. Snider, F. Eren, J. Guest // *Journal of Neurotrauma*. – 2021. – Vol. 38. – № 9. – P. 1267–1284.

41. Chelyshev, Y. More attention on segments remote from the primary spinal cord lesion site / Y. Chelyshev // *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*. – 2022. – Vol. 27. – № 8. – P. 235.

42. Clemastine in remyelination and protection of neurons and skeletal muscle after spinal cord injury / A. Myatich, A. Haque, C. Sole, N. L. Banik // *Neural Regeneration Research*. – 2023. – Vol. 18. – № 5. – P. 940–946.

43. Clinical and translational landscape of viral gene therapies / A. Yudaeva, A. Kostyusheva, A. Kachanov [et al.] // *Cells*. – 2024. – Vol. 13. – № 22. – P. 1916.

44. Clinical electrodiagnostic evaluation for nerve transfer surgery in spinal cord injury: a new indication and clinical pearls / M. J. Berger, A. A. Adewuyi, I. K. Fox, C. K. Franz // *Journal of Neurophysiology*. – 2022. – Vol. 128. – № 4. – P. 847–853.

45. Clinical trials of stem cell treatment for spinal cord injury / K. Yamazaki, M. Kawabori, T. Seki, K. Houkin // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 11. – P. 3994.

46. Clinical trials targeting secondary damage after traumatic spinal cord injury / Z. Z. Khaing, J. Y. Chen, G. Safarians [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – № 4. – P. 3824.

47. Colucci-D'Amato, L. Neurotrophic factor BDNF, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer / L. Colucci-D'Amato, L. Speranza, F. Volpicelli // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 20. – P. 7777.
48. Combination of epidural electrical stimulation with ex vivo triple gene therapy for spinal cord injury: a proof of principle study / F. O. Fadeev, F. V. Bashirov, V. A. Markosyan [et al.] // *Neural Regeneration Research*. – 2021. – Vol. 16. – № 3. – P. 550–560.
49. Combined VEGF and PDGF treatment reduces secondary degeneration after spinal cord injury / C. Lutton, Y. W. Young, R. Williams [et al.] // *Journal of Neurotrauma*. – 2012. – Vol. 29. – № 5. – P. 957–970.
50. Comparison of morphological changes of muscle fibers in response to dynamic electrical muscle contraction and dynamic hydraulic stimulation in a rat hindlimb disuse model / M. Hu, H. Lam, R. Yeh [et al.] // *Physiological research*. – 2017. – Vol. 66. – № 3. – P. 519–530.
51. Comparison of the efficiency of systemic and local cell therapy with human umbilical cord blood mononuclear cells in rats with severe spinal cord injury / S. I. Ryabov, M. A. Zvyagintseva, M. Y. Yadgarov [et al.] // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2020. – Vol. 168. – № 4. – P. 552–555.
52. Construction and application of adenoviral vectors / H. Zhang, H. Wang, Y. An, Z. Chen // *Molecular Therapy. Nucleic Acids*. – 2023. – Vol. 34. – P. 102027.
53. Construction of recombinant adenovirus-5 vector to prevent replication-competent adenovirus occurrence / W. Xie, Y. Yuan, B. Liu, M. Liang // *Acta Virologica*. – 2023. – Vol. 67. – P. 11642.
54. Control of skeletal muscle atrophy in response to disuse: clinical/preclinical contentions and fallacies of evidence / P. J. Atherton, P. L. Greenhaff, S. M. Phillips [et al.] // *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. – 2016. – Vol. 311. – № 3. – P. E594–604.
55. Cotrim, A. P. Gene therapy: some history, applications, problems, and prospects / A. P. Cotrim, B. J. Baum // *Toxicologic Pathology*. – 2008. – Vol. 36. – Gene

therapy. – № 1. – P. 97–103.

56. Current advancements in spinal cord injury research-glia scar formation and neural regeneration / T. Clifford, Z. Finkel, B. Rodriguez [et al.] // *Cells*. – 2023. – Vol. 12. – № 6. – P. 853.

57. Current knowledge and challenges associated with targeted delivery of neurotrophic factors into the central nervous system: focus on available approaches / G. Bahlakeh, R. Rahbarghazi, D. Mohammadnejad [et al.] // *Cell & Bioscience*. – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 181.

58. Debenham, M. I. B. Neuromuscular consequences of spinal cord injury: New mechanistic insights and clinical considerations / M. I. B. Debenham, C. K. Franz, M. J. Berger // *Muscle & Nerve*. – 2024. – Vol. 70. – № 1. – P. 12-27.

59. Development of a model of sacrocaudal spinal cord injury in cloned Yucatan minipigs for cellular transplantation research / J.-H. Lim, J. A. Piedrahita, L. Jackson [et al.] // *Cellular Reprogramming*. – 2010. – Vol. 12. – № 6. – P. 689–697.

60. Deznabi, N. Neurotrophic factors-based therapeutic strategies in the spinal cord injury: an overview of recent preclinical studies in rodent models / N. Deznabi, S. Hosseini, M. Rajabi // *The Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery*. – 2023. – Vol. 59. – № 1. – P. 63.

61. Differentiation of human mesenchymal stem cells towards neuronal lineage: clinical trials in nervous system disorders / R. Hernández, C. Jiménez-Luna, J. Perales-Adán [et al.] // *Biomolecules & Therapeutics*. – 2020. – Vol. 28. – № 1. – P. 34–44.

62. Dissecting the dual role of the glial scar and scar-forming astrocytes in spinal cord injury / T. Yang, Y. Dai, G. Chen, S. Cui // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2020. – Vol. 14. – P. 78.

63. Doucet, B. M. Neuromuscular electrical stimulation for skeletal muscle function / B. M. Doucet, A. Lam, L. Griffin // *The Yale Journal of Biology and Medicine*. – 2012. – Vol. 85. – № 2. – P. 201.

64. Duncan, B. W. Molecular mechanisms of L1 and NCAM adhesion molecules in synaptic pruning, plasticity, and stabilization / B. W. Duncan, K. E. Murphy, P. F. Maness. – Text : electronic // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021.

– Vol. 9. – URL: <https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2021.625340/full> (date accessed: 03.02.2025).

65. Early versus delayed surgery for acute traumatic cervical/thoracic spinal cord injury in Beijing, China: the results of a prospective, multicenter nonrandomized controlled trial / F. Xue, S.-Z. Zhan, D.-Y. Zhang, B.-G. Jiang // *Orthopaedic Surgery*. – 2021. – Vol. 13. – № 8. – P. 2246–2254.

66. Effect of VEGF on inflammatory regulation, neural survival, and functional improvement in rats following a complete spinal cord transection / J. Li, S. Chen, Z. Zhao [et al.] // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2017. – Vol. 11. – P. 381.

67. Elevated MMP-9 in the lumbar cord early after thoracic spinal cord injury impedes motor relearning in mice / C. N. Hansen, L. C. Fisher, R. J. Deibert [et al.] // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. – 2013. – Vol. 33. – № 32. – P. 13101–13111.

68. Eli, I. Acute traumatic spinal cord injury / I. Eli, D. P. Lerner, Z. Ghogawala // *Neurologic Clinics*. – 2021. – Vol. 39. – № 2. – P. 471–488.

69. El-Kadiry, A. E.-H. Cell Therapy: Types, Regulation, and Clinical Benefits / A. E.-H. El-Kadiry, M. Rafei, R. Shammaa // *Frontiers in Medicine*. – 2021. – Vol. 8. – P. 756029.

70. Emerging roles of microglia depletion in the treatment of spinal cord injury / J. Deng, F. Meng, K. Zhang [et al.] // *Cells*. – 2022. – Vol. 11. – № 12. – P. 1871.

71. Enhancement of motor function recovery after spinal cord injury in mice by delivery of brain-derived neurotrophic factor mRNA / S. T. Crowley, Y. Fukushima, S. Uchida [et al.] // *Molecular Therapy. Nucleic Acids*. – 2019. – Vol. 17. – P. 465–476.

72. Epidural stimulation combined with triple gene therapy for spinal cord injury treatment / R. Islamov, F. Bashirov, F. Fadeev [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 23. – P. 8896.

73. Evaluating the state of the science for adeno-associated virus integration: An integrated perspective / D. E. Sabatino, F. D. Bushman, R. J. Chandler [et al.] // *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. – 2022. – Vol. 30. – № 8. – P. 2646–2663.

74. Evaluation for late nerve transfer surgery in spinal cord injury: predicting the degree of lower motor neuron injury / N. S. Jain, E. J. R. Hill, C. M. Zaidman [et al.] // *The Journal of Hand Surgery*. – 2020. – Vol. 45. – № 2. – P. 95–103.
75. Evolutionary conserved role of neural cell adhesion molecule-1 in memory / V. Vukojevic, P. Mastrandreas, A. Arnold [et al.] // *Translational Psychiatry*. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 1–13.
76. Evolving AAV-delivered therapeutics towards ultimate cures / X. He, B. A. Urip, Z. Zhang [et al.] // *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*. – 2021. – Vol. 99. – № 5. – P. 593–617.
77. Fibroblast growth factor signaling in axons: from development to disease / D. Tomé, M. S. Dias, J. Correia, R. D. Almeida // *Cell communication and signaling: CCS*. – 2023. – Vol. 21. – № 1. – P. 290.
78. Galea, M. P. Peripheral nerve dysfunction after spinal cord injury / M. P. Galea, N. van Zyl, A. Messina // *OBM Neurobiology*. – 2020. – Vol. 4. – № 4. – P. 1–17.
79. Gene therapy for inherited retinal diseases: progress and possibilities / M. L. Hu, T. L. Edwards, F. O'Hare [et al.] // *Clinical & Experimental Optometry*. – 2021. – Vol. 104. – № 4. – P. 444–454.
80. Gene therapy for regenerative medicine / H. Hosseinkhani, A. J. Domb, G. Sharifzadeh, V. Nahum // *Pharmaceutics*. – 2023. – Vol. 15. – № 3. – P. 856.
81. Gene therapy strategies for the treatment of spinal cord injury / K. Uchida, H. Nakajima, A. R. Guerrero [et al.] // *Therapeutic Delivery*. – 2014. – Vol. 5. – № 5. – P. 591–607.
82. Gene-modified leucoconcentrate for personalized ex vivo gene therapy in a mini pig model of moderate spinal cord injury / R. R. Islamov, F. V. Bashirov, M. E. Sokolov [et al.] // *Neural Regeneration Research*. – 2021. – Vol. 16. – № 2. – P. 357–361.
83. Glial-neuronal interactions in pathogenesis and treatment of spinal cord injury / N. Lukacova, A. Kisucka, K. Kiss Bimbova [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 24. – P. 13577.

84. Glia-neurotrophic factor relationships: possible role in pathobiology of neuroinflammation-related brain disorders / E. Palasz, A. Wilkaniec, L. Stanaszek [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – № 7. – P. 6321.

85. Gowing, G. Ex vivo gene therapy for the treatment of neurological disorders / G. Gowing, S. Svendsen, C. N. Svendsen // *Progress in Brain Research*. – 2017. – Vol. 230. – P. 99–132.

86. Grigor'ev, A. I. The role of support afferents in organisation of the tonic muscle system / A. I. Grigor'ev, I. B. Kozlovskaja, B. S. Shenkman // *Rossiiskii Fiziologicheskii Zhurnal Imeni I.M. Sechenova*. – 2004. – Vol. 90. – № 5. – P. 508–521.

87. Gutierrez-Guerrero, A. Lentiviral vector pseudotypes: precious tools to improve gene modification of hematopoietic cells for research and gene therapy / A. Gutierrez-Guerrero, F.-L. Cosset, E. Verhoeyen // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12. – Lentiviral Vector Pseudotypes. – № 9. – P. 1016.

88. Hachem, L. D. Pathophysiology of spinal cord injury / L. D. Hachem, M. G. Fehlings // *Neurosurgery Clinics of North America*. – 2021. – Vol. 32. – № 3. – P. 305–313.

89. Hayta, E. Acute spinal cord injury: A review of pathophysiology and potential of non-steroidal anti-inflammatory drugs for pharmacological intervention / E. Hayta, H. Elden // *Journal of Chemical Neuroanatomy*. – 2018. – Vol. 87. – Acute spinal cord injury. – P. 25–31.

90. Hemophilia gene therapy: the end of the beginning? / D. De Wolf, K. Singh, M. K. Chuah, T. VandenDriessche // *Human Gene Therapy*. – 2023. – Vol. 34. – № 17-18. – P. 782–792.

91. Hernández-Echeagaray, E. Neurotrophin-3 modulates synaptic transmission / E. Hernández-Echeagaray // *Vitamins and Hormones*. – 2020. – Vol. 114. – P. 71–89.

92. Herrera, J. J. Reduced vascular endothelial growth factor expression in contusive spinal cord injury / J. J. Herrera, O. Nestic, P. A. Narayana // *Journal of Neurotrauma*. – 2009. – Vol. 26. – № 7. – P. 995–1003.

93. High, K. A. Gene therapy / K. A. High, M. G. Roncarolo // *The New*

England Journal of Medicine. – 2019. – Vol. 381. – № 5. – P. 455–464.

94. High mobility group box 1 promotes the differentiation of spinal ependymal cells into astrocytes rather than neurons / H. Zhang, J. Liu, C. Ling [et al.] // *Neuroreport*. – 2021. – Vol. 32. – № 5. – P. 399–406.

95. High-dose methylprednisolone for acute traumatic spinal cord injury: A meta-analysis / Z. Liu, Y. Yang, L. He [et al.] // *Neurology*. – 2019. – Vol. 93. – № 9. – P. e841–e850.

96. Hunt, A. Acute management of cervical spinal cord injuries / A. Hunt, K. A. McQuillan // *Critical Care Nursing Clinics of North America*. – 2023. – Vol. 35. – № 2. – P. 119–128.

97. Identification of a discrete subpopulation of spinal cord ependymal cells with neural stem cell properties / M. Stenudd, H. Sabelström, E. Llorens-Bobadilla [et al.] // *Cell Reports*. – 2022. – Vol. 38. – № 9. – P. 110440.

98. Immune responses to viral gene therapy vectors / J. L. Shirley, Y. P. de Jong, C. Terhorst, R. W. Herzog // *Molecular Therapy*. – 2020. – Vol. 28. – № 3. – P. 709–722.

99. Impact of neural cell adhesion molecule deletion on regeneration after mouse spinal cord injury / V. Saini, G. Loers, G. Kaur [et al.]. – Text: electronic. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ejn.13271> (date accessed: 26.03.2025).

100. In vivo and ex vivo gene therapy for neurodegenerative diseases: a promise for disease modification / P. Ebrahimi, E. Davoudi, R. Sadeghian [et al.] // *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. – 2024. – Vol. 397. – № 10. – P. 7501–7530.

101. Inflammation: a target for treatment in spinal cord injury / X. Freyermuth-Trujillo, J. J. Segura-Uribe, H. Salgado-Ceballos [et al.] // *Cells*. – 2022. – Vol. 11. – № 17. – P. 2692.

102. Inflammation after spinal cord injury: a review of the critical timeline of signaling cues and cellular infiltration / D. J. Hellenbrand, C. M. Quinn, Z. J. Piper [et al.] // *Journal of Neuroinflammation*. – 2021. – Vol. 18. – № 1. – P. 284.

103. Inflammation: roles in skeletal muscle atrophy / Y. Ji, M. Li, M. Chang [et al.] // *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. – 2022. – Vol. 11. – № 9. – P. 1686.

104. Initial blood pressure is important for long-term outcome after traumatic

spinal cord injury / M. Haldrup, S. Dyrskog, M. M. Thygesen [et al.] // *Journal of Neurosurgery. Spine.* – 2020. – Vol. 33. – № 2. – P. 256–260.

105. Interaction of microglia and astrocytes in the neurovascular unit / L. Liu, J. Liu, J. Bao [et al.] // *Frontiers in Immunology.* – 2020. – Vol. 11. – P. 1024.

106. Interleukin-17A regulates ependymal cell proliferation and functional recovery after spinal cord injury in mice / H. Miyajima, T. Itokazu, S. Tanabe, T. Yamashita // *Cell Death & Disease.* – 2021. – Vol. 12. – № 8. – P. 1–11.

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

108. Kablar, B. Presence of neurotrophic factors in skeletal muscle correlates with survival of spinal cord motor neurons / B. Kablar, A. C. Belliveau // *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists.* – 2005. – Vol. 234. – № 3. – P. 659–669.

109. Kaplan, B. The role of biomaterials in peripheral nerve and spinal cord injury: a review / B. Kaplan, S. Levenberg // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2022. – Vol. 23. – № 3. – P. 1244.

110. Karsy, M. Modern medical management of spinal cord injury / M. Karsy, G. Hawryluk // *Current Neurology and Neuroscience Reports.* – 2019. – Vol. 19. – № 9. – P. 65.

111. Khan, F. I. Experimental treatments for spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis / F. I. Khan, Z. Ahmed // *Cells.* – 2022. – Vol. 11. – № 21. – P. 3409.

112. Kotliarova, A. Glial cell line-derived neurotrophic factor family ligands, players at the interface of neuroinflammation and neuroprotection: focus onto the glia / A. Kotliarova, Y. A. Sidorova. – Text : electronic // *Frontiers in Cellular Neuroscience.* – 2021. – Vol. 15. – URL: <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-neuroscience/articles/10.3389/fncel.2021.679034/full> (date accessed: 03.02.2025).

113. Kotulska, K. Recombinant adeno-associated virus serotype 9 gene therapy in spinal muscular atrophy / K. Kotulska, A. Fattal-Valevski, J. Haberlova // *Frontiers in Neurology.* – 2021. – Vol. 12. – P. 726468.

114. Lee, B.-J. Early decompression in acute spinal cord injury: review and update / B.-J. Lee, J. H. Jeong // Journal of Korean Neurosurgical Society. – 2023. – Vol. 66. – № 1. – P. 6–11.

115. Lee, Y.-S. Hemodynamic management of acute spinal cord injury: a literature review / Y.-S. Lee, K.-T. Kim, B. K. Kwon // Neurospine. – 2021. – Vol. 18. – № 1. – P. 7–14.

116. Leikas, A. J. Adenoviral gene therapy vectors in clinical use-basic aspects with a special reference to replication-competent adenovirus formation and its impact on clinical safety / A. J. Leikas, S. Ylä-Herttuala, J. E. K. Hartikainen // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24. – № 22. – P. 16519.

117. Lentiviral interleukin-10 gene therapy preserves fine motor circuitry and function after a cervical spinal cord injury in male and female mice / J. Y. Chen, E. J. Fu, P. R. Patel [et al.] // Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics. – 2021. – Vol. 18. – № 1. – P. 503–514.

118. Lentivirally administered glial cell line-derived neurotrophic factor promotes post-ischemic neurological recovery, brain remodeling and contralesional pyramidal tract plasticity by regulating axonal growth inhibitors and guidance proteins / M. Beker, A. B. Caglayan, M. C. Beker [et al.] // Experimental Neurology. – 2020. – Vol. 331. – P. 113364.

119. Li, C. The roles of neural stem cells in myelin regeneration and repair therapy after spinal cord injury / C. Li, Y. Luo, S. Li // Stem Cell Research & Therapy. – 2024. – Vol. 15. – № 1. – P. 204.

120. Locomotor training with adjuvant testosterone preserves cancellous bone and promotes muscle plasticity in male rats after severe spinal cord injury / J. F. Yarrow, H. J. Kok, E. G. Phillips [et al.] // Journal of Neuroscience Research. – 2020. – Vol. 98. – № 5. – P. 843–868.

121. Longitudinal impact of acute spinal cord injury on clinical pharmacokinetics of riluzole, a potential neuroprotective agent / A. Nguyen, D. S.-L. Chow, L. Wu [et al.] // Journal of Clinical Pharmacology. – 2021. – Vol. 61. – № 9. – P. 1232–1242.

122. Luis, A. The old and the new: prospects for non-integrating lentiviral vector

technology / A. Luis // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12. – № 10. – P. 1103.

123. Lumbar myeloid cell trafficking into locomotor networks after thoracic spinal cord injury / C. N. Hansen, D. M. Norden, T. D. Faw [et al.] // *Experimental Neurology*. – 2016. – Vol. 282. – P. 86–98.

124. Management of hypotension and bradycardia caused by spinal cord injury. The usefulness of midodrine and methylxanthines / M. Mojtahedzadeh, H. Taghvaye-Masoumi, A. Najafi [et al.] // *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*. – 2019. – Vol. 18. – № 4. – P. 2131–2135.

125. Marquez-Chin, C. Functional electrical stimulation therapy for restoration of motor function after spinal cord injury and stroke: a review / C. Marquez-Chin, M. R. Popovic // *Biomedical Engineering Online*. – 2020. – Vol. 19. – № 1. – P. 34.

126. Matsunaga, W. Adenovirus as a vector and oncolytic virus / W. Matsunaga, A. Gotoh // *Current Issues in Molecular Biology*. – 2023. – Vol. 45. – № 6. – P. 4826–4840.

127. Matsuzaka, Y. Therapeutic application and structural features of adeno-associated virus vector / Y. Matsuzaka, R. Yashiro // *Current Issues in Molecular Biology*. – 2024. – Vol. 46. – № 8. – P. 8464–8498.

128. Maximizing lentiviral vector gene transfer in the CNS / M. Humbel, M. Ramosaj, V. Zimmer [et al.] // *Gene Therapy*. – 2021. – Vol. 28. – № 1-2. – P. 75–88.

129. Mazwi, N. L. Traumatic spinal cord injury: recovery, rehabilitation, and prognosis / N. L. Mazwi, K. Adeletti, R. E. Hirschberg // *Current Trauma Reports*. – 2015. – Vol. 1. – № 3. – P. 182–192.

130. Mechanism of skeletal muscle atrophy after spinal cord injury: A narrative review / X. Xu, Z. Talifu, C.-J. Zhang [et al.] // *Frontiers in Nutrition*. – 2023. – Vol. 10. – P. 1099143.

131. Mechanisms of stem cell therapy in spinal cord injuries / M. Shinozaki, N. Nagoshi, M. Nakamura, H. Okano // *Cells*. – 2021. – Vol. 10. – № 10. – P. 2676.

132. Mesenchymal stem cell therapy in traumatic spinal cord injury: a systematic review / R. Montoto-Meijide, R. Meijide-Faílde, S. M. Díaz-Prado, A. Montoto-Marqués // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – № 14. – P. 11719.

133. Mesenchymal stem cells in the treatment of spinal cord injury: Mechanisms, current advances and future challenges / Y. Xia, J. Zhu, R. Yang [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1141601.

134. Methylprednisolone induces neuro-protective effects via the inhibition of A1 astrocyte activation in traumatic spinal cord injury mouse models / H.-J. Zou, S.-W. Guo, L. Zhu [et al.] // *Frontiers in Neuroscience*. – 2021. – Vol. 15. – P. 628917.

135. Microenvironment imbalance of spinal cord injury / B. Fan, Z. Wei, X. Yao [et al.] // *Cell Transplantation*. – 2018. – Vol. 27. – № 6. – P. 853–866.

136. Molecular and cellular changes in the post-traumatic spinal cord remodeling after autoinfusion of a genetically-enriched leucoconcentrate in a mini-pig model / M. A. Davleeva, R. R. Garifulin, F. V. Bashirov [et al.] // *Neural Regeneration Research*. – 2023. – Vol. 18. – № 7. – P. 1505–1511.

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

138. Molecular mechanisms and clinical application of multipotent stem cells for spinal cord injury / M. Szymoniuk, J. Litak, L. Sakwa [et al.] // *Cells*. – 2022. – Vol. 12. – № 1. – P. 120.

139. Molecular mechanisms in the vascular and nervous systems following traumatic spinal cord injury / S. Li, H. T. P. Dinh, Y. Matsuyama [et al.] // *Life (Basel, Switzerland)*. – 2022. – Vol. 13. – № 1. – P. 9.

140. Monje, P. V. Human schwann cell transplantation for spinal cord injury: prospects and challenges in translational medicine / P. V. Monje, L. Deng, X.-M. Xu // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2021. – Vol. 15. – P. 690894.

141. Mukhamedshina, Y. O. Genetically modified human umbilical cord blood cells as a promising strategy for treatment of spinal cord injury / Y. O. Mukhamedshina, A. A. Rizvanov // *Neural Regeneration Research*. – 2016. – Vol. 11. – № 9. – P. 1420–1421.

142. Multifaceted pathophysiology and secondary complications of chronic spinal cord injury: focus on pressure injury / M. Martínez-Torija, P. F. Esteban, A. Santos-

- De-La-Mata [et al.] // *Journal of Clinical Medicine*. – 2025. – Vol. 14. – № 5. – P. 1556.
143. Muscle after spinal cord injury / B. Biering-Sørensen, I. B. Kristensen, M. Kjaer, F. Biering-Sørensen // *Muscle & Nerve*. – 2009. – Vol. 40. – № 4. – P. 499–519.
144. NCAM-mediated locomotor recovery from spinal cord contusion injury involves neuroprotection, axon regeneration, and synaptogenesis / S. Zhang, Y. Y. Xia, H. C. Lim [et al.] // *Neurochemistry International*. – 2010. – Vol. 56. – № 8. – P. 919–929.
145. Nemeth, C. Disruption of neuromuscular junction following spinal cord injury and motor neuron diseases / C. Nemeth, N. L. Banik, A. Haque // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – Vol. 25. – № 6. – P. 3520.
146. Neural contributions to muscle fatigue: from the brain to the muscle and back again / J. L. Taylor, M. Amann, J. Duchateau [et al.] // *Medicine and science in sports and exercise*. – 2016. – Vol. 48. – Neural Contributions to Muscle Fatigue. – № 11. – P. 2294–2306.
147. Neural stem cell grafts form extensive synaptic networks that integrate with host circuits after spinal cord injury / S. Ceto, K. J. Sekiguchi, Y. Takashima [et al.] // *Cell Stem Cell*. – 2020. – Vol. 27. – № 3. – P. 430–440.e5.
148. Neuroinflammation and scarring after spinal cord injury: therapeutic roles of MSCs on inflammation and glial scar / Q.-M. Pang, S.-Y. Chen, Q.-J. Xu [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – Neuroinflammation and Scarring After Spinal Cord Injury. – P. 751021.
149. Neuroprotective effects of minocycline on focal cerebral ischemia injury: a systematic review / Y. Naderi, Y. Panahi, G. E. Barreto, A. Sahebkar // *Neural Regeneration Research*. – 2020. – Vol. 15. – № 5. – P. 773–782.
150. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia / S. A. Liddelow, K. A. Guttenplan, L. E. Clarke [et al.] // *Nature*. – 2017. – Vol. 541. – № 7638. – P. 481–487.
151. Neurotrophic factors as regenerative therapy for neurodegenerative diseases: current status, challenges and future perspectives / Y. El Ouaamari, J. Van den Bos,

B. Willekens [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24. – № 4. – P. 3866.

152. New therapy for spinal cord injury: autologous genetically-enriched leucoconcentrate integrated with epidural electrical stimulation / R. Islamov, F. Bashirov, A. Izmailov [et al.] // Cells. – 2022. – Vol. 11. – New Therapy for Spinal Cord Injury. – № 1. – P. 144.

153. Non-integrating lentiviral vectors in clinical applications: a glance through / N. Gurumoorthy, F. Nordin, G. J. Tye [et al.] // Biomedicines. – 2022. – Vol. 10. – № 1. – P. 107.

154. Novel innovations in cell and gene therapies for spinal cord injury / M.-M. Zavvarian, A. Toossi, M. Khazaei [et al.] // F1000Research. – 2020. – Vol. 9. – P. F1000 Faculty Rev-279.

155. Novel strategies for spinal cord regeneration / B. Costăchescu, A.-G. Niculescu, M. G. Dabija [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23. – № 9. – P. 4552.

156. NT-3 promotes oligodendrocyte proliferation and nerve function recovery after spinal cord injury by inhibiting autophagy pathway / Y. Cong, C. Wang, J. Wang [et al.] // The Journal of Surgical Research. – 2020. – Vol. 247. – P. 128–135.

157. Oieni, F. Olfactory ensheathing cells for spinal cord injury: the cellular superpowers for nerve repair / F Oieni, R Reshamwala, J. St John // Neuroglia. – 2022. – Vol. 3. – № 4. – P. 139–143.

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

159. O’Shea, T. M. Cell biology of spinal cord injury and repair / T. M. O’Shea, J. E. Burda, M. V. Sofroniew // The Journal of Clinical Investigation. – 2017. – Vol. 127. – № 9. – P. 3259–3270.

160. Oyinbo, C. A. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade / C. A. Oyinbo // Acta Neurobiologiae Experimentalis. – 2011. – Vol. 71. – № 2. – P. 281–299.

161. Pathological changes of distal motor neurons after complete spinal cord injury / K. Yokota, K. Kubota, K. Kobayakawa [et al.] // *Molecular Brain*. – 2019. – Vol. 12. – № 1. – P. 4.

162. Pathophysiology and therapeutic approaches for spinal cord injury / R. Lima, A. Monteiro, A. J. Salgado [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – № 22. – P. 13833.

163. Pathophysiology, biomarkers, and therapeutic modalities associated with skeletal muscle loss following spinal cord injury / K. P Drasites, R. Shams, V. Zaman [et al.] // *Brain Sciences*. – 2020. – Vol. 10. – № 12. – P. 933.

164. Perez-Gianmarco, L. Understanding the role of the glial scar through the depletion of glial cells after spinal cord injury / L. Perez-Gianmarco, M. Kukley // *Cells*. – 2023. – Vol. 12. – № 14. – P. 1842.

165. Pharmacologic and regenerative cell therapy for spinal cord injury: WFNS spine committee recommendations / T. Takami, N. Shimokawa, J. Parthiban [et al.] // *Neurospine*. – 2020. – Vol. 17. – № 4. – P. 785–796.

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

167. Phrenic motor neuron survival below cervical spinal cord hemisection / L. L. Allen, N. L. Nichols, Z. A. Asa [et al.] // *Experimental Neurology*. – 2021. – Vol. 346. – P. 113832.

168. Post-spinal cord injury astrocyte-mediated functional recovery in rats after intraspinal injection of the recombinant adenoviral vectors Ad5-VEGF and Ad5-ANG / T. Povysheva, M. Shmarov, D. Logunov [et al.] // *Journal of Neurosurgery. Spine*. – 2017. – Vol. 27. – № 1. – P. 105–115.

169. Preclinical studies of immunogenicity, protectivity, and safety of the combined vector vaccine for prevention of the middle east respiratory syndrome / I. V. Dolzhikova, D. M. Grousova, O. V. Zubkova [et al.] // *Acta Naturae*. – 2020. – Vol. 12. – № 3. – P. 114–123.

170. Preventive triple gene therapy reduces the negative consequences of

ischemia-induced brain injury after modelling stroke in a rat / V. Markosyan, Z. Safiullo, A. Izmailov [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 18. – P. 6858.

171. Progress in stem cell therapy for spinal cord injury / L. Gao, Y. Peng, W. Xu [et al.] // *Stem Cells International*. – 2020. – Vol. 2020. – P. 2853650.

172. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions / C. Escartin, E. Galea, A. Lakatos [et al.] // *Nature Neuroscience*. – 2021. – Vol. 24. – № 3. – P. 312–325.

173. Reactive astrogliosis: implications in spinal cord injury progression and therapy / X. Li, M. Li, L. Tian [et al.] // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2020. – Vol. 2020. – Reactive Astrogliosis. – P. 9494352.

174. Recent advances in lentiviral vectors for gene therapy / X. Wang, C. Ma, R. Rodríguez Labrada [et al.] // *Science China. Life Sciences*. – 2021. – Vol. 64. – № 11. – P. 1842–1857.

175. Recent advances in the treatment of spinal cord injury / D. Yari, A. Saberi, Z. Salmasi [et al.] // *Archives of Bone and Joint Surgery*. – 2024. – Vol. 12. – № 6. – P. 380–399.

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

177. Recombinant adenoviruses for delivery of therapeutics following spinal cord injury / A. O. Sosnovtseva, O. V. Stepanova, A. A. Stepanenko [et al.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 777628.

178. Regulatory role of mesenchymal stem cells on secondary inflammation in spinal cord injury / Q.-M. Pang, S.-Y. Chen, S.-P. Fu [et al.] // *Journal of Inflammation Research*. – 2022. – Vol. 15. – P. 573–593.

179. Rehabilitation of spinal cord injuries / K. Nas, L. Yazmalar, V. Şah [et al.] // *World Journal of Orthopedics*. – 2015. – Vol. 6. – № 1. – P. 8–16.

180. Remyelination after spinal cord injury: is it a target for repair? / J. R. Plemel, M. B. Keough, G. J. Duncan [et al.] // *Progress in Neurobiology*. – 2014. – Vol. 117. –

P. 54–72.

181. Repair of the injured spinal cord by schwann cell transplantation / H. Fu, D. Hu, J. Chen [et al.] // *Frontiers in Neuroscience*. – 2022. – Vol. 16. – P. 800513.

182. Repeated subarachnoid administrations of allogeneic human umbilical cord mesenchymal stem cells for spinal cord injury: a phase 1/2 pilot study / Y. Yang, M. Pang, C. Du [et al.] // *Cytotherapy*. – 2021. – Vol. 23. – № 1. – P. 57–64.

183. Review of COVID-19 viral vector-based vaccines and COVID-19 variants / R. Vanaparthi, G. Mohan, D. Vasireddy, P. Atluri // *Le Infezioni in Medicina*. – 2021. – Vol. 29. – № 3. – P. 328–338.

184. RNA profiling of mouse ependymal cells after spinal cord injury identifies the oncostatin pathway as a potential key regulator of spinal cord stem cell fate / R. Chevreau, H. Ghazale, C. Ripoll [et al.] // *Cells*. – 2021. – Vol. 10. – № 12. – P. 3332.

185. RNA-seq data of soleus muscle tissue after spinal cord injury under conditions of inactivity and applied exercise / J. H. Chariker, M. Sharp, S. S. Ohri [et al.] // *Data in Brief*. – 2020. – Vol. 28. – P. 105056.

186. Roberts, T. T. Classifications in brief: American spinal injury association (ASIA) impairment scale / T. T. Roberts, G. R. Leonard, D. J. Cepela // *Clinical Orthopaedics and Related Research*. – 2017. – Vol. 475. – № 5. – P. 1499–1504.

187. Role of skeletal muscle in motor neuron development / M. Baguma-Nibasheka, A. Fracassi, W. J. Costain [et al.] // *Histology and Histopathology*. – 2016. – Vol. 31. – № 7. – P. 699–719.

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

189. Roles of ependymal cells in the physiology and pathology of the central nervous system / S. Deng, L. Gan, C. Liu [et al.] // *Aging and Disease*. – 2023. – Vol. 14. – № 2. – P. 468–483.

190. Rostro-caudal different energy metabolism leading to differences in degeneration in spinal cord injury / Y. Ohnishi, M. Yamamoto, Y. Sugiura [et al.] // *Brain*

Communications. – 2021. – Vol. 3. – № 2. – P. fcab058.

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

192. Safety and efficacy of riluzole in acute spinal cord injury study (RISCIS): a multi-center, randomized, placebo-controlled, double-blinded trial / M. G. Fehlings, A. Moghaddamjou, J. S. Harrop [et al.] // *Journal of Neurotrauma*. – 2023. – Vol. 40. – № 17-18. – P. 1878–1888.

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

194. Sámano, C. Mechanism of neuroprotection against experimental spinal cord injury by riluzole or methylprednisolone / C. Sámano, A. Nistri // *Neurochemical Research*. – 2019. – Vol. 44. – № 1. – P. 200–213.

195. Sant’Anna, T. B. Adeno-associated virus infection and its impact in human health: an overview / T. B. Sant’Anna, N. M. Araujo // *Virology Journal*. – 2022. – Vol. 19. – Adeno-associated virus infection and its impact in human health. – № 1. – P. 173.

196. SARM1 promotes neuroinflammation and inhibits neural regeneration after spinal cord injury through NF- κ B signaling / H. Liu, J. Zhang, X. Xu [et al.] // *Theranostics*. – 2021. – Vol. 11. – № 9. – P. 4187–4206.

197. Schiaffino, S. Fiber types in mammalian skeletal muscles / S. Schiaffino, C. Reggiani // *Physiological Reviews*. – 2011. – Vol. 91. – № 4. – P. 1447–1531.

198. Secondary sarcopenia and spinal cord injury: clinical associations and health outcomes / A. Gherle, C. D. Nistor-Cseppento, D.-C. Iovanovici [et al.] // *Journal of Clinical Medicine*. – 2024. – Vol. 13. – № 3. – P. 885.

199. Seven skeletal muscles rich in slow muscle fibers may function to sustain neutral position in the rodent hindlimb / Y. Hitomi, T. Kizaki, S. Watanabe [et al.] //

Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology. – 2005. – Vol. 140. – № 1. – P. 45–50.

200. Skeletal muscle atrophy: from mechanisms to treatments / L. Yin, N. Li, W. Jia [et al.] // Pharmacological Research. – 2021. – Vol. 172. – P. 105807.

201. Spinal cord injury: Current trends in acute management / C. Y. Adegeest, N. Moayeri, S. P. J. Muijs, P. V. Ter Wengel // Brain & Spine. – 2024. – Vol. 4. – P. 102803.

202. Spinal cord injury: molecular mechanisms and therapeutic interventions / X. Hu, W. Xu, Y. Ren [et al.] // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2023. – Vol. 8. – № 1. – P. 245.

203. Spinal cord injury: Olfactory ensheathing cell-based therapeutic strategies / X. Chen, Y. Liu, P. Stavrinou [et al.] // Journal of Neuroscience Research. – 2024. – Vol. 102. – № 1. – P. e25283.

204. Spinal cord injury: pathophysiology, multimolecular interactions, and underlying recovery mechanisms / A. Anjum, M. D. Yazid, M. Fauzi Daud [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21. – № 20. – P. 7533.

205. Spinal cord injury: pathophysiology, treatment strategies, associated challenges, and future implications / K. Venkatesh, S. K. Ghosh, M. Mullick [et al.] // Cell and Tissue Research. – 2019. – Vol. 377. – № 2. – P. 125–151.

206. Spinal cord molecular and cellular changes induced by adenoviral vector- and cell-mediated triple gene therapy after severe contusion / A. A. Izmailov, T. V. Povysheva, F. V. Bashirov [et al.] // Frontiers in Pharmacology. – 2017. – Vol. 8. – P. 813.

207. Stem cell therapeutics and gene therapy for neurologic disorders / K. S. Chen, E. J. Koubek, S. A. Sakowski, E. L. Feldman // Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics. – 2024. – Vol. 21. – № 4. – P. e00427.

208. Stem cells therapy for spinal cord injury: an overview of clinical trials / S. Silvestro, P. Bramanti, O. Trubiani, E. Mazzon // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21. – № 2. – P. 659.

209. Stepankova, K. Planet of the AAVs: the spinal cord injury episode / K. Stepankova, P. Jendelova, L. MachovaUrdzikova // *Biomedicines*. – 2021. – Vol. 9. – № 6. – P. 613.

210. Sterner, R. C. Immune response following traumatic spinal cord injury: Pathophysiology and therapies / R. C. Sterner, R. M. Sterner // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 1084101.

211. Strategies for oligodendrocyte and myelin repair in traumatic CNS injury / A. Huntmer-Silveira, N. Patil, M. A. Brickner, A. M. Parr. – Text : electronic // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2021. – Vol. 14. – URL: <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-neuroscience/articles/10.3389/fncel.2020.619707/full> (date accessed: 02.02.2025).

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

213. Sustained expression of vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 improves blood–spinal cord barrier integrity and functional recovery after spinal cord injury / J. J. Herrera, L. M. Sundberg, L. Zentilin [et al.] // *Journal of Neurotrauma*. – 2010. – Vol. 27. – № 11. – P. 2067–2076.

214. Sykova, E. Mesenchymal stem cells in treatment of spinal cord injury and amyotrophic lateral sclerosis / E. Sykova, D. Cizkova, S. Kubinova // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – Vol. 9. – P. 695900.

215. Systemic administration of allogeneic cord blood mononuclear cells in adults with severe acute contusion spinal cord injury: phase 1/2a pilot clinical study-safety and primary efficacy evaluation / V. A. Smirnov, S. M. Radaev, Y. V. Morozova [et al.] // *World Neurosurgery*. – 2022. – Vol. 161. – P. e319–e338.

216. Taghdiri, M. Viral and non-viral systems to deliver gene therapeutics to clinical targets / M. Taghdiri, C. Mussolino // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – Vol. 25. – № 13. – P. 7333.

217. Tahmasebi, F. Effects of mesenchymal stem cell transplantation on spinal cord injury patients / F. Tahmasebi, S. Barati // *Cell and Tissue Research*. – 2022. –

Vol. 389. – № 3. – P. 373–384.

218. Talbot, J. Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease / J. Talbot, L. Maves // Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology. – 2016. – Vol. 5. – Skeletal muscle fiber type. – № 4. – P. 518–534.

219. Tandem delivery of multiple therapeutic genes using umbilical cord blood cells improves symptomatic outcomes in ALS / R. R. Islamov, A. A. Rizvanov, V. Y. Fedotova [et al.] // Molecular Neurobiology. – 2017. – Vol. 54. – № 6. – P. 4756–4763.

220. Targeted-delivery of nanomedicine-enabled methylprednisolone to injured spinal cord promotes neuroprotection and functional recovery after acute spinal cord injury in rats / W. Zhao, Z. Jia, W. A. Bauman [et al.] // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. – 2024. – Vol. 60. – P. 102761.

221. The anti-inflammation property of olfactory ensheathing cells in neural regeneration after spinal cord injury / C. Jiang, X. Wang, Y. Jiang [et al.] // Molecular Neurobiology. – 2022. – Vol. 59. – № 10. – P. 6447–6459.

222. The effects of glial cell line-derived neurotrophic factor after spinal cord injury / K. Rosich, B. F. Hanna, R. K. Ibrahim [et al.]. – Text : electronic // Journal of neurotrauma. – 2017. – Vol. 34. – № 24. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28795616/> (date accessed: 11.02.2025).

223. The fate and function of oligodendrocyte progenitor cells after traumatic spinal cord injury / G. J. Duncan, S. B. Manesh, B. J. Hilton [et al.] // Glia. – 2020. – Vol. 68. – № 2. – P. 227–245.

224. The glial cells respond to spinal cord injury / R. Wang, R. Zhou, Z. Chen [et al.] // Frontiers in Neurology. – 2022. – Vol. 13. – P. 844497.

225. The immunological roles of olfactory ensheathing cells in the treatment of spinal cord injury / Y. Jiang, J. Guo, X. Tang [et al.] // Frontiers in Immunology. – 2022. – Vol. 13. – P. 881162.

226. The influence of timing of surgical decompression for acute spinal cord injury: a pooled analysis of individual patient data / J. H. Badhiwala, J. R. Wilson,

C. D. Witiw [et al.] // *The Lancet. Neurology*. – 2021. – Vol. 20. – № 2. – P. 117–126.

227. The leading edge: Emerging neuroprotective and neuroregenerative cell-based therapies for spinal cord injury / C. S. Ahuja, A. Mothe, M. Khazaei [и др.] // *Stem Cells Translational Medicine*. – 2020. – Т. 9. – № 12. – С. 1509–1530.

228. The overexpression of insulin-like growth factor-1 and neurotrophin-3 promote functional recovery and alleviate spasticity after spinal cord injury / Z. Talifu, C. Qin, Z. Xin [et al.] // *Frontiers in Neuroscience*. – 2022. – Vol. 16. – P. 863793.

229. The potential of cord blood stem cells for use in regenerative medicine / D. T. Harris, M. Badowski, N. Ahmad, M. A. Gaballa // *Expert Opinion on Biological Therapy*. – 2007. – Vol. 7. – № 9. – P. 1311–1322.

230. The potential of gene therapies for spinal cord injury repair: a systematic review and meta-analysis of pre-clinical studies / C. J. Cunningham, M. Viskontas, K. Janowicz [et al.] // *Neural Regeneration Research*. – 2023. – Vol. 18. – № 2. – P. 299–305.

231. The potential therapeutic effects of agmatine, methylprednisolone, and rapamycin on experimental spinal cord injury / T. Firat, A. Kukner, N. Ayturk [et al.] // *Cell Journal*. – 2021. – Vol. 23. – № 6. – P. 701–707.

232. The quality of life in patients with spinal cord injury: assessment and rehabilitation / D. Cardile, A. Calderone, R. De Luca [et al.] // *Journal of Clinical Medicine*. – 2024. – Vol. 13. – № 6. – P. 1820.

233. The role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in diagnosis and treatment of epilepsy, depression, schizophrenia, anorexia nervosa and alzheimer's disease as highly drug-resistant diseases: a narrative review / A. Gliwińska, J. Czubilińska-Łada, G. Więckiewicz [et al.] // *Brain Sciences*. – 2023. – Vol. 13. – № 2. – P. 163.

234. The role of neural stem cells in regulating glial scar formation and repair / A. M. Nicaise, A. D'Angelo, R.-B. Ionescu [et al.] // *Cell and Tissue Research*. – 2022. – Vol. 387. – № 3. – P. 399–414.

235. The Role of the VEGF Family in Coronary Heart Disease / Y. Zhou, X. Zhu, H. Cui [et al.]. – Text : electronic // *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. – 2021. –

Vol. 8. – URL: <https://www.frontiersin.org/journals/cardiovascular-medicine/articles/10.3389/fcvm.2021.738325/full> (date accessed: 03.02.2025).

236. Therapeutic approaches of trophic factors in animal models and in patients with spinal cord injury / M. D. C. Díaz-Galindo, D. Calderón-Vallejo, C. Olvera-Sandoval, J. L. Quintanar // *Growth Factors* (Chur, Switzerland). – 2020. – Vol. 38. – № 1. – P. 1–15.

237. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells (MSCs) and MSC-derived extracellular vesicles for the treatment of spinal cord injury / G.-U. Kim, S.-E. Sung, K.-K. Kang [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 24. – P. 13672.

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

239. Tosolini, A. P. Intramuscular delivery of gene therapy for targeting the nervous system / A. P. Tosolini, J. N. Sleight // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. – 2020. – Vol. 13. – P. 129.

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

241. Transplantation of adult monkey neural stem cells into a contusion spinal cord injury model in rhesus macaque monkeys / S. N. Nemati, R. Jabbari, M. Hajinasrollah [et al.] // *Cell Journal (Yakhteh)*. – 2014. – Vol. 16. – № 2. – P. 117–130.

242. Transplantation of skin precursor-derived schwann cells yields better locomotor outcomes and reduces bladder pathology in rats with chronic spinal cord injury / P. Assinck, J. S. Sparling, S. Dworski [et al.] // *Stem Cell Reports*. – 2020. – Vol. 15. – № 1. – P. 140–155.

243. Traumatic spinal cord injury / C. S. Ahuja, J. R. Wilson, S. Nori [et al.] // *Nature Reviews. Disease Primers*. – 2017. – Vol. 3. – P. 17018.

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

245. Umbilical cord blood derived cell expansion: a potential neuroprotective

therapy / T. R. Penny, G. Jenkin, S. L. Miller, C. A McDonald // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2024. – Vol. 15. – № 1. – P. 234.

246. Updated review: the steroid controversy for management of spinal cord injury / J. A. Canseco, B. A. Karamian, D. R. Bowles [et al.] // *World Neurosurgery*. – 2021. – Vol. 150. – P. 1–8.

247. Ursavas, S. Olfactory ensheathing cells: Unique glial cells promising for treatments of spinal cord injury / S. Ursavas, H. Darici, E. Karaoz // *Journal of Neuroscience Research*. – 2021. – Vol. 99. – № 6. – P. 1579–1597.

248. Validation study of neurotrophin-3-releasing chitosan facilitation of neural tissue generation in the severely injured adult rat spinal cord / M. Oudega, P. Hao, J. Shang [et al.] // *Experimental Neurology*. – 2019. – Vol. 312. – P. 51–62.

249. Various AAV serotypes and their applications in gene therapy: an overview / S. S. Issa, A. A. Shaimardanova, V. V. Solovyeva, A. A. Rizvanov // *Cells*. – 2023. – Vol. 12. – № 5. – P. 785.

250. VEGF inhibits the inflammation in spinal cord injury through activation of autophagy / H. Wang, Y. Wang, D. Li [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2015. – Vol. 464. – № 2. – P. 453–458.

251. Viral vector systems for gene therapy: a comprehensive literature review of progress and biosafety challenges / S. Ghosh, A. M. Brown, C. Jenkins, K. Campbell // *Applied Biosafety: Journal of the American Biological Safety Association*. – 2020. – Vol. 25. – № 1. – P. 7–18.

252. Viral vector-based gene therapy / X. Li, Y. Le, Z. Zhang [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – № 9. – P. 7736.

253. Viral vectors and extracellular vesicles: innate delivery systems utilized in CRISPR/Cas-mediated cancer therapy / S. E. Ahmadi, M. Soleymani, F. Shahriyary [et al.] // *Cancer Gene Therapy*. – 2023. – Vol. 30. – № 7. – P. 936–954.

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

255. Wang, J. Umbilical cord blood derived cellular therapy: advances in clinical

development / J. Wang, L. Metheny // *Frontiers in Oncology*. – 2023. – Vol. 13. – P. 1167266.

256. Who is going to walk? A review of the factors influencing walking recovery after spinal cord injury / G. Scivoletto, F. Tamburella, L. Laurenza [et al.]. – Text : electronic // *Frontiers in Human Neuroscience*. – 2014. – Vol. 8. – URL: <https://www.frontiersin.org/journals/human-neuroscience/articles/10.3389/fnhum.2014.00141/full> (date accessed: 22.03.2025).

257. Wolff, J. H. Delivering genes with human immunodeficiency virus-derived vehicles: still state-of-the-art after 25 years / J. H. Wolff, J. G. Mikkelsen // *Journal of Biomedical Science*. – 2022. – Vol. 29. – № 1. – P. 79.

258. Yao, C. Revascularization after traumatic spinal cord injury / C. Yao, X. Cao, B. Yu // *Frontiers in Physiology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 631500.

259. Yıldırım, S. Gene Therapy Products Reached to Market by 2021 / S. Yıldırım. – Text : electronic // *Gene Editing*. – 2021. – URL: https://www.academia.edu/76944188/Gene_Therapy_Products_Reached_to_Market_by_2021 (date accessed: 22.10.2024).

260. Yu, G. Reactive astrocytes in central nervous system injury: subgroup and potential therapy / G. Yu, Y. Zhang, B. Ning // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2021. – Vol. 15. – P. 792764.

261. Zhao, Z. Viral vector-based gene therapies in the clinic / Z. Zhao, A. C. Anselmo, S. Mitragotri // *Bioengineering & Translational Medicine*. – 2021. – Vol. 7. – № 1. – P. e10258.

262. Zheng, B. Regulation of axonal regeneration after mammalian spinal cord injury / B. Zheng, M. H. Tuszynski // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. – 2023. – Vol. 24. – № 6. – P. 396–413.