

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования

«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Направление: 06.04.01 (ОКСО 020400.68) – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Магистерская диссертация

ПРИМЕНЕНИЕ АУТОЛОГИЧНЫХ МОНОНУКЛЕАРНЫХ  
КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ПОДОСТРЫЙ ПЕРИОД  
ТРАВМАТИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ СПИННОГО МОЗГА  
СВИНЕЙ

Работа завершена:

"5" июня 2019 г.

Костенников

(А. А. Костенников)

Работа допущена к защите:

Научные руководители

ведущий научный сотрудник, к.м.н.

"5" июня 2019 г.

Мухамедшина

(Я.О. Мухамедшина)

главный научный сотрудник, д.б.н., профессор

"5" июня 2019 г.

Ризванов

(А.А. Ризванов)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

"6" 06 2019 г.

Чернов

(В.М. Чернов)

Казань – 2019

## СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
<b>СОДЕРЖАНИЕ.....</b>	<b>2</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>4</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>5</b>
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>8</b>
1.1 Травматическая болезнь спинного мозга: моделирование на крупных животных.....	8
1.2 Клеточная терапия при травме спинного мозга .....	12
1.2.1 Мезенхимные стволовые клетки .....	12
1.2.2 Нейральные стволовые клетки.....	14
1.2.3 Клетки пуповинной крови.....	17
1.2.4 Стволовые и прогениторные клетки периферической крови.....	20
1.3 Применение биодеградируемых матриксов в сочетании с клеточной терапией для целей нейрорегенерации .....	21
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....</b>	<b>25</b>
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>25</b>
2.1 Выделение мононуклеарных клеток периферической крови.....	25
2.2 Аутотрансплантация мононуклеарных клеток периферической крови свиньям с травматическим повреждением спинного мозга.....	26
2.3 Электрофизиологические исследования.....	28
2.4 Тестирование двигательной функции при помощи поведенческой шкалы «PTIBS».....	29
2.5 Гистологические методы .....	29
2.6 Статистическая обработка результатов .....	29
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....</b>	<b>31</b>
3.1 Тестирование двигательной функции при помощи поведенческой шкалы «PTIBS».....	31
3.2 Электрофизиологические результаты.....	33
3.3 Морфометрия области повреждения спинного мозга.....	36
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>39</b>

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....40**

ТДЛ	Трещиноватый мозг
МПК	Макромолекулярные комплексы
МСК	Макромолекулы с плавкими концами
БПК	Бутылочный краевая полимеры
БМ	Белковый мозг
НК	Нейротрофические факторы
МСК-БМ	Макромолекулы с плавкими концами второго ряда
НСК	Нейротрофические стимуляторы кисточки
РК	Ретикулярные кисточки
СТ-НСК	Стимуляторы кисточек и нейротрофических факторов
ФР	Фактор роста мозга
ГРФ	Глиодифитический глиотрофический фактор
ЭРФ	Эпидермальный фактор роста
РГФ2	Фактор роста макробластов 1
НДИ	Нейротрофический фактор инсулина
НДР	Нейротрофический фактор роста

## ВВЕДЕНИЕ

Травматическая болезнь спинного мозга (ТСМ) представляет собой сложную патологию, которая развивается после первичной острой механической травмы, вызывая дальнейшее повреждение ткани спинного мозга, что усугубляет клинический исход. В большей степени посттравматическая дегенерация ткани вызвана вторичным повреждением, включающим несколько взаимосвязанных процессов: дисфункцию гематоэнцефалического барьера, местное воспаление, гибель нейронов, демиелинизацию и нарушение нервных связей (Vismara *et al.*, 2017). Повреждение спинного мозга может привести к тяжелой двигательной, чувствительной и вегетативной дисфункции. В настоящее время нет эффективного способа восстановления поврежденного спинного мозга, что свидетельствует о высокой актуальности поиска новых подходов к нейрорегенерации (Assinck *et al.*, 2017).

Возможность преодоления последствий ТСМ связывают с применением клеточной терапии. С этой целью используют нейральные стволовые клетки, клетки-предшественники олигодендроцитов, мезенхимные стволовые клетки (МСК), Шванновские клетки, клетки обонятельной выстилки, эмбриональные и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (Zhang & Huang, 2012; Kyu & Jeon, 2016; Assinck *et al.*, 2017). Тем не менее, наибольшие перспективы для клинического применения представляют стволовые и прогениторные клетки, которые могут быть легко и нетравматично изолированы из взрослого организма с целью последующей аутотрансплантации пациенту. Периферическая кровь в этой связи является самым удобным источником, из которого можно получить стволовые и прогениторные клетки пациентов, которые могут быть заморожены и законсервированы для последующего использования. С этой целью исследуют мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), так как они могут дифференцироваться по альтернативным линиям *in vitro* и *in vivo* в зависимости от условий культивирования или места трансплантации (Zhang

& Huang, 2012). Среди МКПК обнаружено несколько различных популяций прогениторных клеток, включая гемопоэтические стволовые клетки, эндотелиальные прогениторные клетки, мезенхимные стволовые клетки, популяции циркулирующих фибробластов, что указывает на то, что МКПК могут обладать потенциалом для дифференцировки во множество типов зрелых функциональных клеток в специфических микросредах (Zhang & Huang, 2012). Несколько популяций прогениторных клеток, выделенных из МКПК, также могут дифференцироваться в нейроны или глию (Xian *et al.*, 2016).

Для доставки стволовых клеток в область повреждения используются матриксы, так же их используют в месте разрыва в области повреждения в качестве проводника для роста аксонов (Shrestha *et al.*, 2014). Как природные, так и синтетические биоматериалы увеличивают выживаемость стволовых клеток *in vivo*, обеспечивая клетки контролируемым микроокружением, в котором облегчается рост и дифференцировка клеток (Shrestha *et al.*, 2014). Результаты, полученные Itosaka и соавторами (2009) предполагают, что фибриновый матрикс может быть перспективным кандидатом для потенциальной, минимально инвазивной структуры (scaffold) для травмированного спинного мозга, и данная стратегия тканевой инженерии может быть надежной опцией в регенеративной терапии для пациентов с ТСМ.

В связи с анатомическими, функциональными и молекулярно-клеточными различиями между грызунами и людьми необходимы надежные модели ТСМ крупных животных, таких как свиньи или приматы для успешной трансляции из лаборатории в клинику (Nardone *et al.*, 2017). Доклинические испытания с применением клеточной терапии, проводимые чаще всего на мелких животных (крысы, мыши), показывают необычайно позитивные и вдохновляющие результаты по восстановлению структуры и функций травмированного спинного мозга. Однако трансляция накопленного опыта в клинику происходит достаточно медленно ввиду опасений с

безопасности и эффективности данной терапии, а также из-за недостаточной успешности данной терапии. Еще одним принципиальным преимуществом исследования процессов нейрорегенерации на крупных животных – возможность трансплантации аутологичных клеток, как наиболее безопасных с точки зрения клинического применения. Использование мелких лабораторных животных позволяет проводить работы только с алло- и ксенотрансплантацией клеток, что может приводить к существенным различиям в запускаемых механизмах нейрорегенерации.

**Цель исследования** – оценить эффективность наложения на область повреждения спинного мозга свиньи мононуклеарных клеток периферической крови, заключенных в фибриновый матрикс.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

- 1) Исследовать динамику восстановления двигательной функции в поведенческом teste «PTIBS»;
- 2) Установить динамику изменений электрофизиологических показателей: М-ответ, двигательные и соматосенсорные вызванные потенциалы;
- 3) Оценить суммарную площадь патологических полостей и площадь сохранной ткани на поперечных срезах спинного мозга в области эпицентра повреждения и на удалении в ростральном и каудальном направлении.

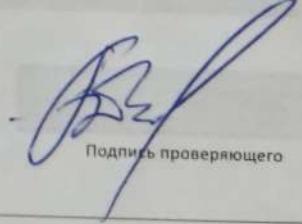


## СПРАВКА о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе  
Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	Костенников Александр
Подразделение	
Тип работы	Не указано
Название работы	Костенников А.А. группа 01-740-1.docx
Название файла	АНТИПЛАГИАТ.docx
Процент заимствования	4,50%
Процент цитирования	0,82%
Процент оригинальности	94,69%
Дата проверки	14:25:17 31 мая 2019г.
Модули поиска	Сводная коллекция ЭБС; Коллекция РГБ; Цитирование; Модуль поиска переводных заимствований; Коллекция eLIBRARY.RU; Коллекция ГАРАНТ; Модуль поиска Интернет; Модуль поиска "КПФУ"; Коллекция Медицина; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Модуль поиска перефразирований Интернет; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Кольцо вузов

Работу проверил	Бабынин Эдуард Викторович
ФИО проверяющего	
Дата подписи	31.05.19

  
Подпись проверяющего

Чтобы убедиться  
в подлинности справки,  
используйте QR-код, который  
содержит ссылку на отчет.



Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование  
корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего.  
Предоставленная информация не подлежит использованию  
в коммерческих целях.