

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
Медицинский научно-образовательный центр
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
Факультет фундаментальной медицины

На правах рукописи

Карагяур Максим Николаевич

**ГЕНО-КЛЕТОЧНЫЕ ПОДХОДЫ К СТИМУЛЯЦИИ НЕЙРОПРОТЕКЦИИ И
ВОССТАНОВЛЕНИЯ ФУНКЦИИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ И ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ
НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПОСЛЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ**

1.5.4 - биохимия

3.3.6 – фармакология, клиническая фармакология

Диссертация на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Научные консультанты:

Ткачук Всеволод Арсеньевич

доктор биологических наук, профессор, академик РАН,

Балабаньян Вадим Юрьевич

доктор фармакологических наук, доцент

Москва - 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	23
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	69
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	125
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	282
ВЫВОДЫ.....	285
ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ.....	287
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	289
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	294
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	317

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Обновление клеток, регенерация органов и тканей являются необходимыми условиями существования многоклеточных организмов. Практически все органы и ткани организма человека проявляют способность к обновлению и регенерации, хотя степень выраженности и потенциал этих процессов во многом определяется типом ткани и индивидуальными особенностями организма. В наименьшей степени обновление и регенерация характерны для нервной ткани (как центрального, так и периферического ее отдела), что обусловлено рядом ее морфологических, онтогенетических и функциональных особенностей. При этом нервная система играет критически важную роль в поддержании жизнеспособности и функционировании организма, а ее повреждение приводит к дисфункции организма (в том числе, когнитивных функций) и его гибели. Все это обуславливает необходимость изучения механизмов повреждения и регенерации нервной системы с целью установления их ключевых звеньев, воздействие на которые позволило бы остановить прогрессирование повреждения нервной ткани и стимулировать ее регенерацию. Помимо фундаментальной проблемы ограниченная способность нервной ткани к регенерации представляет собой и значимую медико-социальную проблему, поскольку сопряжена с развитием высокой степени инвалидизации (до 80% при инсультах) и летальности в течение 1 года после повреждения (до 20-50% в зависимости от типа и тяжести повреждения).

Процессы обновления, повреждения и регенерации в нервной ткани пока изучены недостаточно, в частности, в полной мере не установлена роль отдельных клеточных популяций и вклад отдельных молекул (или даже некоторых их семейств) в этих процессах. Впрочем, накопленные данные позволяют утверждать, что и повреждение, и регенерация нервной ткани включают множество сменяющих друг друга этапов, которые регулируются и реализуются благодаря сочетанному действию целого ряда молекул и молекулярных комплексов, обладающих как повреждающей, так и защитной,

прорегенераторной активностью. Высокая значимость не одной, а всей совокупности молекул в процессах регенерации подтверждается множеством исследований, в том числе доклинических и клинических.

Степень разработанности темы исследования. Известно, что трофика и функционирование нервной системы во многом обеспечивается особым семейством белковых молекул, нейротрофическими факторами. Исследования показывают, что эти же молекулы способны стимулировать выживание и регенерацию нервной ткани, как ее периферического, так и центрального отдела, после повреждения. Экспрессия нейротрофических факторов значительно возрастает в короткий момент после повреждения, стимулируя выживание и регенерацию, однако, также быстро (в течение месяца после повреждения) угасает, что делает дальнейшую спонтанную регенерацию нервной ткани невозможной. Введение нейротрофических факторов (либо молекул имитирующих их действие) позволяет обеспечить более длительную нейропротекцию, а также продлить процесс регенерации нервной ткани, что позволяет добиваться более значимых клинических и терапевтических эффектов (по сравнению со спонтанной регенерацией). В то же время, ряд доклинических и клинических исследований демонстрирует относительно невысокую эффективность монотерапии для стимуляции регенеративных процессов, что обусловлено многоэтапностью и многофакторностью процессов регенерации. Так, ранее на модели травмы периферического нерва нами была продемонстрирована способность монокомпонентной генетической конструкции, кодирующей мозговой нейротрофический фактор, стимулировать регенерацию травмированного нерва после травмы, однако эффективность такой терапии значительно уступала таковой при трансплантации МСК, нейропротективная активность которых, в значительной степени, была обусловлена наличием в составе их секрета мозгового нейротрофического фактора (BDNF), одного из основных нейтрофинов с широкой нейропротективной активностью.

Основными природными стимуляторами регенерации нервной ткани считают клетки глии. Ряд данных также указывает на то, что такие функции могут выполнять и мезенхимные стромальные клетки (МСК), причем свой прорегенераторный потенциал они реализуют прежде всего за счет секреции молекул и молекулярных комплексов, обладающих нейропротективной и прорегенераторной активностью. Ранее было установлено, что МСК способны секретировать нейротрофические и проангиогенные факторы, противовоспалительные молекулы и белки матрикса. Однако, способность продуктов секреции МСК (в отрыве от МСК) стимулировать нейропротекцию и нейрорегенерацию, а также функциональное значение отдельных молекул и их сочетаний в составе секрета МСК в реализации этих процессов еще только предстоит установить. Понимание функционального значения таких факторов в составе секрета не только позволит лучше понять механизмы повреждения и регенерации нервной ткани, обозначит потенциальные "точки приложения" для перспективных терапевтических подходов, но и позволит идентифицировать ключевые белковые (или др.) нейропротективные и прорегенераторные факторы в составе секрета МСК, что заложит основы для разработки перспективных биомедицинских препаратов на основе клеточного секрета для стимуляции регенерации. Изучение механизмов повреждения и регенерации нервной ткани, а также идентификация ключевых для этих процессов молекул, являются одними из основных задач нейрофармакологии и регенеративной биомедицины.

Потенциально увеличить эффективность регенерации органов и тканей можно путем комплексного воздействия на различные этапы (или звенья патогенеза) процесса регенерации, например, с помощью белковых композиций (комбинаций) функционально комплиментарных молекул. Для нервной ткани такая комбинация должна состоять из нейротрофического фактора (желательно, обладающего широкой модальностью) и функционально дополняющей его молекулы. В качестве основы для создания нейропротективной комбинации был выбран мозговой нейротрофический

фактор (BDNF), благодаря его способности поддерживать выживание и стимулировать регенерацию моторных, симпатических, дофаминергических и ганглиозных нейронов, а также его экспериментально доказанной роли в процессах регенерации травмированного периферического нерва. В качестве молекулы, функционально комплементарной BDNF, может быть использован проангиогенный фактор, протеаза или молекула, обладающая противовоспалительной активностью (что следует из известных данных о патогенезе острых повреждений нервной ткани). Забегая вперед, скажем, что в процессе анализа литературы и собственных экспериментальных данных в качестве молекулы-партнера для BDNF был выбран урокиназный активатор плазминогена (uPA), плеiotропная молекула, обладающая способностью активировать фибринолиз, стимулировать ангиогенез, созревание факторов роста (в т.ч., BDNF) и расщепление матрикса, рост аксонов, миграцию эндотелиоцитов и шванновских клеток и т.д. Мы предположили, что комбинация BDNF и uPA, воздействуя на различные звенья патогенеза, будет обладать более выраженным нейропротективным и прорегенераторным эффектом при повреждении нервной ткани, чем каждая из этих молекул по отдельности, что и было исследовано на моделях острого повреждения центральной и периферической нервной системы.

Исходя из вышеизложенного, **целью исследования** является разработка подходов к стимуляции нейропротекции и регенерации центральной и периферической нервной системы после повреждения с использованием генно-клеточных технологий.

Для достижения цели были сформулированы следующие научно-исследовательские **задачи**:

1. Проанализировать ключевые известные механизмы стимуляции нейропротекции и регенерации нервной ткани и обосновать выбор факторов, обладающих нейропротективной активностью при повреждениях центральной и периферической нервной системы.

2. Создать системы экспрессии и доставки, способные обеспечить эффективную продукцию мозгового нейротрофического фактора (BDNF) и урокиназного активатора плазминогена (uPA), и исследовать их нейропротективную и прорегенераторную активность при повреждениях центральной и периферической нервной системы в эксперименте.

3. Предложить прототипы генотерапевтического и клеточного препаратов для стимуляции нейропротекции и восстановления поврежденной нервной ткани.

4. Установить молекулярно-клеточные механизмы, вовлеченные в реализацию нейропротективной активности предложенных генно-клеточных препаратов.

5. Провести доклиническое исследование отдельных аспектов безопасности предложенных прототипов генотерапевтического и клеточного препаратов.

Научная новизна исследования.

В работе впервые экспериментально обоснована перспектива комбинированного применения мозгового нейротрофического фактора (BDNF) и урокиназного активатора плазминогена (uPA) для стимуляции регенеративных процессов в центральной и периферической нервной системе. Показано, что комбинации функционально комплементарных молекул (BDNF и uPA) позволяют достичь более значимого нейропротективного эффекта в сравнении с применением этих факторов по отдельности.

«Впервые создана бицистронная генетическая конструкция, кодирующая мозговой нейротрофический фактор (BDNF) и урокиназный активатор плазминогена (uPA) человека, а также изучена ее фармакологическая активность на модели травмы периферического нерва» [Karagyaur et al, 2020]. Показано, что бицистронная генетическая конструкция, кодирующая сочетание факторов роста, способна длительное время (на протяжении 14-21

дней) поддерживать процесс регенерации поврежденных нервных волокон и стимулировать их функциональное и морфологическое восстановление.

Несомненной новизной данного исследования является выявление нейропротективной и прорегенераторной активности комбинации рекомбинантных белков мозгового нейротрофического фактора (BDNF) и урокиназного активатора плазминогена (uPA) при моделировании геморрагического инсульта. Установлено, что исследуемая комбинация белков способствует повышению выживаемости экспериментальных животных, снижает тяжесть неврологических дефицитов и по данным МРТ уменьшает объем очага повреждения головного мозга.

Впервые была изучена возможность стимуляции нейропротекции и регенерации ткани головного мозга генотерапевтическими конструкциями (плазмидными и вирусными) на модели геморрагического инсульта при интрацеребральном введении. Показано, что введение генотерапевтических конструкций интрацеребрально не способствует нейропротекции, что, по-видимому, обусловлено недостаточным уровнем трансфекции клеток головного мозга в области повреждения.

В работе впервые была показана принципиальная возможность патогенетической терапии геморрагического инсульта в эксперименте с использованием композиции на основе продуктов секреции мезенхимных стволовых клеток (МСК). Установлено, что секретом МСК оказывает нейропротективное действие, что проявляется увеличением выживаемости экспериментальных животных, уменьшением тяжести неврологических дефицитов и уменьшением объема повреждения головного мозга. Существенной новизной обладают результаты применения секрета МСК на модели геморрагического инсульта в зависимости от условий (пути введения, дозы и кратности введения, терапевтического окна), которые позволяют установить терапевтический потенциал и ограничения применения секрета МСК при геморрагическом инсульте. Выявлено, что изучение

нейропротекторной активности секрета МСК необходимо проводить с учетом его видоспецифичности.

К новым результатам можно отнести установление механизмов, вовлеченных в нейропротекцию при сочетанном применении BDNF и uPA: прямая нейропротекция при глутамат-индуцированной нейротоксичности, стимуляция роста нейритов, иммуномодулирующее воздействие на клетки микроглии и клетки моноцитарно-макрофагального звена периферической крови.

Впервые разработаны подходы к генетической модификации культур МСК (иммортализация, экспрессия трансгена и редактирование генома) с целью увеличения их продуктивности и поддержания относительного постоянства качественного и количественного состава секрета. Установлено, что процедура иммортализации клеточной культуры МСК не оказывает значимого влияния на качественный и количественный состав секрета и позволяет стабилизировать его профиль в течение длительного пассирования клеточной культуры (минимум до 24 пассажа). Выявленный феномен имеет существенное значение для последующих трансляционных исследований.

Установлено, что секретом иммортализованных МСК обладает схожим профилем нейропротекторной активности, что и секретом первично выделенных МСК.

К новым результатам можно отнести и результаты изучения нейропротективной активности секрета генетически модифицированных МСК (конститутивная и индуцируемая экспрессия трансгена) с повышенной экспрессией BDNF+uPA и VEGF на модели геморрагического инсульта, согласно которым было показано, что сочетанное (но не отдельное) применение секретов генетически модифицированных МСК с повышенной экспрессией BDNF+uPA и VEGF (без процедуры концентрирования) обладает выраженным нейропротективным и прорегенераторным эффектом при внутривенном введении.

Впервые было показано, что нейропротективная и прорегенераторная активность секрета МСК при интрацеребральном введении на модели геморрагического инсульта в значительной степени обусловлена действием мозгового нейротрофического фактора (BDNF) и урокиназного активатора плазминогена (uPA), входящих в состав секрета.

Выявлено, что бицистронная генетическая конструкция, кодирующая комбинацию факторов роста BDNF и uPA, при многократных внутримышечных инъекциях способна диссеминировать из места введения, но при этом не наблюдается эктопической экспрессии закодированных в генетической конструкции факторов роста.

Установлено, что секретом первично выделенных и иммортализованных МСК не обладает трансформирующей активностью в отношении первично выделенных фибробластов человека.

Ключевым моментом новизны исследования является тот факт, что в ходе выполнения диссертационного исследования разработана концепция стимуляции регенерации центральной и периферической нервной ткани комбинацией мозгового нейротрофического фактора (BDNF) и урокиназного активатора плазминогена (uPA). Примененные методы и подходы могут быть использованы для терапии социально значимых заболеваний человека, в частности, травматических поражений центральной и периферической нервной системы, острых нарушений мозгового кровообращения и пр.

Новизна проведенных исследований подтверждена патентами на изобретение РФ:

1. Калинина Н.И., Карагяур М.Н., Дыйканов Д.Т., Рубина К.А., Семина Е.В., Стамбольский Д.В., Акопян Ж.А., Сысоева В.Ю., Ткачук В.А. Способ стимуляции восстановления иннервации поврежденной ткани: патент на изобретение № RU 2563541 (20.09.2015, Бюл. № 26);

2. Парфенова Е.В., Ткачук В.А., Рубина К.А., Калинина Н.И., Карагяур М.Н., Стамбольский Д.В., Семина Е.В., Сысоева В.Ю. Способ стимулирования восстановления иннервации тканей после травм и ишемии с

помощью векторной конструкции: патент на изобретение № RU 2538621 (10.01.2015 Бюл. № 1);

3. Стамбольский Д.В., Карагяур М.Н., Семина Е.В., Балабаньян В.Ю., Ростовцева А.И., Калинина Н.И., Акопян Ж.А., Ткачук В.А. Генно-инженерная конструкция для стимуляции посттравматической регенерации: патент на изобретение № RU 2719013 (16.04.2020 Бюл. № 11);

4. Ткачук В.А., Акопян Ж.А., Садовничий В.А., Карагяур М.Н., Джауари С.С., Ефименко А.Ю., Басалова Н.А., Попов В.С., Тарасова Е.В., Александрюшкина Н.А., Скрыбина М.Н., Примак А.Л., Григорьева О.А., Калинина Н.И., Сысоева В.Ю. Композиция для нейропротекции и стимуляции нейрорегенерации головного мозга после повреждения, средство на ее основе, способ его получения и применения: патент на изобретение № RU 2803286 (12.09.2023 Бюл. № 26).

Положения, выносимые на защиту:

1. Комбинация функционально комплементарных молекул мозгового нейротрофического фактора (BDNF) и урокиназного активатора плазминогена (uPA) обладает выраженным нейропротективным эффектом при повреждениях центральной и периферической нервной ткани.

2. Бицистронная генетическая конструкция, кодирующая мозговой нейротрофический фактор (BDNF) и урокиназный активатор плазминогена (uPA) человека, стимулирует восстановление травмированного периферического нерва и обладает приемлемым профилем безопасности. Созданная бицистронная генетическая конструкция, кодирующая BDNF и uPA, может быть использована для разработки инновационных генотерапевтических подходов, направленных на стимуляцию регенерации поврежденных структур периферической нервной системы.

3. Урокиназный активатор плазминогена потенцирует нейропротекторную активность мозгового нейротрофического фактора в модели интрацеребральной посттравматической гематомы, что проявляется в снижении тяжести неврологических нарушений у экспериментальных животных и уменьшении размеров очага повреждения.

4. Секретом мезенхимных стромальных клеток (МСК) стимулирует нейропротекцию мозговой ткани в модели интрацеребральной посттравматической гематомы при различных путях и схемах введения.

5. Секретом иммортализованных МСК обладает схожим белково-пептидным профилем, что и секретом первично выделенных МСК, а также не обладает трансформирующей активностью. Секретом МСК и его фракции могут служить основой для разработки технологической платформы для создания инновационных биологических лекарственных препаратов, направленных на стимуляцию нейропротекции и регенерации поврежденной нервной ткани.

6. Нейропротективная активность комбинации факторов BDNF + uPA и секрета МСК обусловлена рядом выявленных механизмов: прямой

нейропротекцией, стимуляцией роста нейритов, подавлением активации клеток моноцитарно-макрофагального звена.

Теоретическая и практическая ценность работы:

Данное исследование вносит значимый вклад в развитие современных представлений о безопасности и эффективности генных и клеточных препаратов, направленных на стимуляцию нейропротекции и регенерации центральной и периферической нервной системы после повреждения. В ходе исследования был разработан и всесторонне оценен ряд генно-клеточных композиций для комплексной нейропротекции и стимуляции регенерации нервной ткани: комбинированная генотерапевтическая конструкция для стимуляции регенерации поврежденного периферического нерва, белковые композиции на основе секрета первично выделенных и геномодифицированных МСК, а также рекомбинантных белков BDNF (мозговой нейротрофический фактор) и uPA (урокиназный активатор плазминогена) человека.

Разработаны подходы иммортализации и генетической модификации первично выделенных МСК с целью стандартизации состава, усиления и/или модификации терапевтической активности их секрета. Изучено влияние процедуры иммортализации на пролиферативный потенциал и иммунофенотип клеточной культуры МСК, стабильность качественного и количественного состава секрета таких МСК в динамике, а также нейропротективный и прорегенераторный потенциал секрета иммортализованных и генетически модифицированных МСК в модели интрацеребральной посттравматической гематомы в сравнении с действием первично выделенных МСК. Показано, что иммортализация клеточной культуры МСК замедляет ее старение, что позволяет на ее основе получать фармакологически значимые количества секрета с относительно постоянным качественным и количественным составом, и делает трансляцию

предложенной технологии в клиническую практику принципиально возможной.

В исследовании произведена оценка вклада отдельных молекулярных (ингибиторный анализ вклада BDNF и uPA) и клеточных механизмов (прямая нейропротективная активность, стимуляция роста нейритов и иммуномодулирующее действие) в нейропротективную и прорегенераторную активность комбинации BDNF + uPA и секрета МСК. Полученные результаты не только способствуют лучшему пониманию процессов нейропротекции и регенерации нервной ткани после повреждения, и пониманию механизмов нейропротективной активности комбинаций факторов роста или мультимолекулярных композиций (секретом МСК), но и позволяют идентифицировать новые молекулярные и клеточные мишени для разработки перспективных подходов к стимуляции нейропротекции и регенерации нервной ткани. Результаты изучения нейропротективной активности секретов генетически модифицированных МСК свидетельствуют о необходимости тщательного изучения каждой новой предлагаемой комбинации молекул для стимуляции процесса регенерации ввиду возможных непрогнозируемых токсических или потенцирующих эффектов, возникающих в биологических системах.

В исследовании проведен комплексный анализ безопасности бицистронной генетической конструкции, кодирующей BDNF и uPA, (субхроническая токсичность, генотоксичность, канцерогенность, мутагенность и способности диссеминировать из места введения при курсовом применении), который показал, что бицистронная плазмидная конструкция, кодирующая BDNF и uPA, является безопасной, не вызывает эктопической экспрессии закодированных в ней факторов роста. В исследовании показано отсутствие трансформирующей способности секрета иммортализованных МСК и фактическое отсутствие теломеразы в составе секрета иммортализованных МСК.

Результаты, полученные, в ходе исследования демонстрируют, что разработанные генно-клеточные препараты (бицистронная плазмидная конструкция, кодирующая BDNF и uPA; секретом первично выделенных и иммортализованных МСК) безопасны, обладают выраженной нейропротективной активностью и стимулируют восстановление структуры и функции поврежденной центральной и периферической нервной ткани и после завершения доклинических испытаний «могут быть рекомендованы для разработки подходов к генно-клеточной терапии социально значимых заболеваний человека: травматическое повреждение периферических нервных стволов и головного мозга, острые нарушения мозгового кровообращения по геморрагическому и ишемическому типу» [Dzhauari et al, 2023].

Используемые в работе экспериментальные и методические подходы расширяют потенциал регенеративной медицины и открывают перспективу для разработки и создания эффективных и безопасных генно-клеточных препаратов для стимуляции регенерации и обновления клеток и тканей и терапии патологий без существующего эффективного патогенетического лечения.

Связь работы с базовыми научными программами и финансовая поддержка

Исследования по теме работы проведены в период с 2013 по 2023 гг. в соответствии с НИР Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Работа финансировалась в рамках государственного контракта «Молекулярные и клеточные механизмы регуляции регенеративных процессов» (2016-2026 гг, ЦИТИС №01201455019), государственного контракта «Поиск терапевтических мишеней, разработка инновационных препаратов и тканеинженерных конструкций» (2023-2025 гг, ЦИТИС №123040300034-6), государственного контракта «Поиск мишеней, создание инновационных препаратов и тканеинженерных конструкций для регенеративной медицины» (2021-2022 гг, ЦИТИС №121061800164-2),

государственного контракта «Разработка, валидация и внедрение методов контроля качества и безопасности биофармацевтических лекарственных средств и биомедицинских клеточных продуктов» (Медицинский научно образовательный центр Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, №0908.1 за 2019-2020 гг), государственного контракта МНОЦ-2018-ГЗН-0908-02 «Разработка, валидация и внедрение методов контроля качества и безопасности биофармацевтических лекарственных средств и биомедицинских клеточных продуктов» (2019-2020 гг, ЦИТИС №АААА-А18-118122090076-5), государственного контракта 14.N08.11.0134 «Доклинические исследования лекарственного средства на основе генно-инженерной конструкции, содержащей последовательности кДНК мозгового нейротрофического фактора и активатора плазминогена урокиназного типа, для лечения травм периферических нервов» в рамках Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (2017-2019 гг), государственного контракта 12411.1008799.13.105 «Доклинические исследования препарата на основе плазмидной генетической конструкции, несущей ген урокиназы, для восстановления иннервации в тканях» в рамках Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (2012-2014 гг), гранта РФФ 19-75-30007 и 19-75-30007-П «Фундаментальные проблемы регенеративной медицины: регуляция обновления и репарации тканей человека» (2019-2025 гг), гранта РФФ 19-29-04172 «Участие некодирующих регуляторных РНК, секретлируемых мезенхимными стромальными клетками, в процессах регенерации и репарации тканей» (2019-2022 гг), гранта РФФИ 18-015-00535 «Изучение нейропротекторных свойств сочетанного воздействия мозгового нейротрофического фактора и урокиназного активатора плазминогена при экспериментальном моделировании острого нарушения мозгового кровообращения по геморрагическому типу» (2018-2020 гг), гранта

РФФИ 17-04-00386 «Выяснение молекулярных механизмов влияния урокиназной системы на дифференцировку и выживаемость нейронов» (2016-2019 гг).

Методология и методы исследования.

Генетические конструкции собирали с помощью стандартных молекулярно-биологических методов с использованием синтетических олигонуклеотидов или кДНК, полученных методом обратной транскрипции специфических РНК.

Культивирование клеточных линий и их генетическую модификацию осуществляли с помощью стандартных методов культивирования.

Для количественной оценки продукции изучаемых факторов роста в первично выделенных, иммортализованных и линейных клеточных культурах (в т.ч. и в динамике) использовали коммерческие наборы для иммуноферментного анализа, а для анализа уровня экспрессии целевых мРНК использовали метод обратной транскрипции в сочетании с ПЦР в реальном времени.

Изучение нейропротективной и прорегенераторной активности бицистронной генетической конструкции, кодирующей мозговой нейротрофический фактор (BDNF) и урокиназный активатор плазминогена (uPA) человека, в периферическом отделе нервной системы оценивали в модели роста нейритов клеточной культуры нейробластомы мыши Neuro2a и в модели травматической денервации задней конечности мыши, разработанной на Кафедре физиологии человека и животных Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, с модификациями.

Изучение нейропротективной и прорегенераторной активности комбинации BDNF и uPA, генов их кодирующих, а также секретома МСК в центральном отделе нервной системы осуществляли на модели интрацеребральной посттравматической гематомы крыс, налаженной

совместно с сотрудниками Лаборатории психофармакологии ФГБНУ "НИИ фармакологии имени В.В. Закусова".

Для оценки объема повреждения головного мозга в модели интрацеребральной посттравматической гематомы использовали МРТ исследование, которое проводили в Центре коллективного пользования ФГАОУ ВО "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" МЗ РФ. Для оценки объема повреждения головного мозга в модели интрацеребральной посттравматической гематомы, а также возможных механизмов нейропротективной активности применяемых композиций проводили окрашивание парафиновых срезов головного мозга гематоксилином-эозином, по Перлсу, по Нисслию, а также с использованием иммуногистохимических методов окрашивания (CD68, CD163).

Для оценки влияния процедуры иммортализации на спектр белковых молекул в составе секрета МСК проводили его протеомный анализ; хромато-масс-спектрометрический анализ пептидов в рамках протеомного анализа секрета первично выделенных и иммортализованных МСК проводили на базе ЦКП ГНЦ ФГБУН Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН на приборах Ultimate 3000nano UPLC и TIMS-TOF-PRO.

Для оценки трансформирующей активности секрета иммортализованных МСК использовали метод колонеиобразования первично выделенных фибробластов в агарозном геле (soft agar colony assay), а также транскриптомный анализ лизатов фибробластов, подвергнутых воздействию секрета первично выделенных и иммортализованных МСК. Транскриптомный анализ был выполнен в.н.с. Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО "Казанский (Приволжский) федеральный университет", к.б.н. Е.И. Шагимардановой.

Для анализа субхронической токсичности бицистронной генетической конструкции, кодирующей BDNF и uPA, проводили исследование на 60 крысах (30 самок и 30 самцов) с ежедневной внутримышечной инъекцией

указанной генетической конструкции в течение 30 суток и последующим анализом выживаемости экспериментальных животных, динамикой набора веса, потребления пищи и воды, клиническим и биохимическим анализом крови, анализом параметров ЭКГ, изучением поведения и гистологического исследования полученных от них образцов органов и тканей. Для анализа потенциальной генотоксичности бицистронной генетической конструкции, кодирующей BDNF и uPA, проводили исследование на стандартной модели спонтанной соматической рекомбинации у самок дрозофил. Для анализа потенциальной мутагенности (с прогнозом канцерогенности) бицистронной генетической конструкции, кодирующей BDNF и uPA, проводили с помощью анализа ДНК-комет *in vivo* с анализом ядер клеток костного мозга, печени, мышечной ткани и головного мозга экспериментальных животных. Для анализа способности бицистронной генетической конструкции, кодирующей BDNF и uPA, диссеминировать из места введения осуществляли курсовые внутримышечные инъекции данной генетической конструкции и в дальнейшем оценивали ее содержание в органах и тканях мышцы методом ПЦР в реальном времени.

Степень достоверности и апробации результатов. Для получения результатов использовали современные и адекватные поставленным задачам методики, в том числе биохимические, иммунохимические, молекулярно-биологические и молекулярно-биологические методы исследования культур, а также животные модели повреждения центральной и периферической нервной ткани. Достоверность полученных результатов и сформулированных выводов обеспечивается достаточным количеством независимых экспериментов, проведенных как на клеточных, так и на животных моделях. Обработку полученных данных проводили с использованием современных и адекватных статистических методов.

Результаты исследования были доложены на следующих всероссийских и международных конференциях: Школа по регенеративной медицине — 2023 (Москва, 2023), "Генная терапия: настоящее и будущее" (Москва, 2022), III Зимняя школа-конференция молодых ученых «Редактирование генома» (Томск, 2022), V Национальный конгресс по регенеративной медицине (Москва, 2022), VIII Молодёжная Школа-Конференция по молекулярной биологии и генетическим технологиям Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2022), TERMIS-AP 2022 (Чеджу, Ю. Корея, 2022), IX Всероссийская научная молодежная школа-конференция "Химия, физика, биология: пути интеграции" (Москва, 2022), "Генная терапия: настоящее и будущее" (Москва, 2021), Школа "Редактирование генома" - 2021 (Томск, 2021), Школа по регенеративной медицине — 2021 (Москва, 2021), Школа молодого ученого РФ - 2021 (Москва, 2021), TERMIS 6th World congress, (Maastricht, Нидерланды, 2021), IX Съезд Российского Общества Медицинских генетиков (Москва, 2021), Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2020» (Москва, 2020), VII Молодёжная школа-конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2020), VI ежегодная национальная выставка Вузпромэкспо 2019 (Москва, 2019), IV Национальный конгресс по регенеративной медицине (Москва, 2019), The 27th ESGCT Annual Congress 2019 (Барселона, Испания, 2019), 23 Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пущино, 2019), Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019» (Москва, 2019), Biochemistry, Molecular Biology and Allergy (Амстердам, Нидерланды, 2018), CRISPR 2018, (Новосибирск, 2018), III Национальный конгресс по регенеративной медицине (Москва, 2017), CRISPR: From Biology to Technology and Novel Therapeutics (Ситжес, Испания, 2017), Fourth biennial German-Russian symposium Joint meeting of the Berlin-Brandenburg Academy of Sciences and Humanities and Russian Academy of

Sciences (Москва, 2017), Биомедицина-2016 (Новосибирск, 2016), Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016» (Москва, 2016), ASGCT 17th Annual Meeting (Вашингтон, США, 2014).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 32 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, из них 28 представлены в библиографических базах Scopus или Web of Science, 8 глав в сборниках, 4 патента, а также 23 работы в сборниках трудов конференций.

Личный вклад соискателя. Соискателем были проведены: анализ литературы по проблеме, постановка цели и задач исследования, планирование экспериментов, обработка и анализ данных. Статьи и заявки на Патенты были написаны самим автором, либо при активном его участии; имена соавторов указаны в соответствующих публикациях. Автором лично проведен полный спектр биохимических, иммунохимических, молекулярно-биологических и культуральных исследований: дизайн и сборка генетических конструкций, пассирование клеточных культур, сборка лентивирусных частиц, генетическая модификация и селекция модифицированных клеточных культур, получение кондиционированных сред, иммуноферментный анализ, выделение ДНК, РНК, иммуноблоттинг (Вестерн-блот), обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени, soft agar colony assay, а также исследований на животных моделях: модель травмы периферического нерва на мышцах (нанесение повреждения с проведением функциональных тестов, электрофизиологического и иммуногистохимического исследования) и модель интрацеребральной посттравматической гематомы (нанесение повреждения, оценка выживаемости и неврологического статуса, подготовка образцов мозга к гистологическому и иммуногистохимическому исследованию, анализ и обработка полученных данных), изучение

диссеминации бицистронной генотерапевтической конструкции при ее курсовом применении в организме мыши.

Соответствие международным этическим нормам проведения медико-биологических исследований. Все процедуры с образцами тканей пациентов были выполнены в соответствии Хельсинкской декларацией и были одобрены Комитетом по этике МГУ имени М.В. Ломоносова (IRB00010587), протокол №4 (2018 г.). Содержание экспериментальных животных и процедуры с ними проводили в полном соответствии с Директивой 2010/63/ЕС и рекомендациями Комитета по биоэтике МГУ имени М.В. Ломоносова (разрешения №3.4 от 21 марта 2021 г. и №3.5 от 17 марта 2022 г.).

Структура диссертации. Диссертация содержит разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений», «Список литературы», включающий 30 отечественных и 346 иностранных источников, и «Приложение». Диссертация изложена на 326 страницах, содержит 15 таблиц и 78 рисунков.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Особенности процессов повреждения и регенерации в центральной и периферической нервной системе. Их ключевые участники.

Нервная система представляет собой совокупность морфологически и функционально связанных центральных и периферических структур, обеспечивающих восприятие, обработку и хранение чувственной информации, регуляцию работы систем организма, реализацию когнитивных функций, двигательной активности и поведения, а также интеграцию и координацию всех перечисленных видов нервной активности [Noback et al, 2005]. Нормальное, физиологическое функционирование нервной системы является неотъемлемой частью развития, поддержания и полноценной работоспособности органов, тканей и организма в целом, а нарушение работы нервной системы с высокой долей вероятности может привести к их дисфункции.

Для поддержания и восстановления своих функций органы и ткани обновляются в течение жизни или регенерируют в ответ на повреждение. В то же время эффективность процессов обновления и регенерации в нервной системе довольно ограничена, что обусловлено рядом морфологических, онтогенетических и функциональных особенностей центральной и периферической нервной системы, которые будут рассмотрены далее. Критическая важность нервной системы для функционирования организма, ограниченность ее регенеративного потенциала и отсутствие действенных терапевтических подходов к его стимуляции подталкивают к изучению механизмов повреждения и регенерации нервной системы, а также выявлению потенциальных (перспективных) мишеней для возможного терапевтического воздействия.

В нервной системе условно выделяют центральный и периферический отделы. К центральному отделу нервной системы относят головной и спинной мозг, а к периферическому - нервные структуры (черепно-мозговые,

спинальные и вегетативные нервы, сплетения вегетативной нервной системы), расположенные за пределами головного и спинного мозга, не защищенные костными структурами и гематоэнцефалическим барьером.

Основу нервной системы составляют нервные клетки (нейроны), обеспечивающие восприятие, обработку и передачу информации. Тела нейронов преимущественно лежат в центральной нервной системе, ядрах и ганглиях, а их отростки обеспечивают межнейрональные взаимодействия (в т.ч. между нейронами различных отделов нервной системы) и взаимодействие с органами и тканями-мишенями, достигая при этом длины до 1 метра и более. Эти межнейрональные связи и связи с органами-мишенями формируются еще на ранних этапах эмбриогенеза, когда расстояния между телами нейронов и клетками-мишенями малы (составляют единичные миллиметры-сантиметры), матрикс является более рыхлым и присутствуют необходимые аттрактивные и репульсивные навигационные сигналы [Stiles et al, 2010].

Трофику нервной ткани, поддержание клеточного и тканевого гомеостаза во многом обеспечивают клетки глии: шванновские клетки - в периферическом отделе нервной системы, олигодендроциты, астроциты и клетки микроглии - в центральном ее отделе. Они же поддерживают стабильность архитектоники нервной системы в физиологических условиях и способны стимулировать ее регенерацию после повреждения [Jäkel et al, 2017]. Периферические отделы нервной системы способны к ограниченной регенерации [Шевелев, 2005; Gordon et al, 2020], а ряд отделов центральной нервной системы (обонятельная луковица, субгранулярная и субвентрикулярная зоны) способен к частичному обновлению своего клеточного состава в течение жизни (в т.ч. и у людей) [Lim et al, 2016]. Это свидетельствует о том, что регенерация нервной системы принципиально возможна, необходимо лишь идентифицировать ключевые механизмы ее повреждения и регенерации, как и действенные подходы к управлению этими процессами. Прежде чем перейти к рассмотрению особенностей механизмов повреждения и регенерации в каждом из отделов нервной системы логичным

будет указать несколько моментов, являющихся общими, как для центральной (ЦНС), так и периферической нервной системы (ПНС).

Прежде всего необходимо подчеркнуть, что процессы повреждения и регенерации, как в ЦНС, так и в ПНС, состоят из множества протекающих параллельно и сменяющих друг друга процессов (т.е. многоэтапны), а также вовлекают широкий спектр биологически активных молекул и молекулярных комплексов (т.е. многофакторны), среди которых встречаются молекулы с антагонистичной, плейотропной и/или синергичной активностью [Uyeda et al, 2020]. На основании этой информации можно предположить, что комбинированное воздействие на отдельные этапы и звенья процессов повреждения и регенерации будет более эффективно, чем однонаправленное и монокомпонентное. Данное предположение подтверждается результатами ряда доклинических и клинических исследований (в т.ч. и наших собственных), в которых было установлено, что монокомпонентная терапия регенеративных процессов обладает ограниченной эффективностью, кратковременностью и обратимостью терапевтического эффекта [Gupta et al, 2009; Makarevich et al, 2015].

Другой особенностью нервной ткани является ее сложная архитектура и наличие колоссального количества уникальных связей между нейронами, нейронами и клетками-мишенями, а также большая протяженность нервных волокон, их соединяющих [Noback et al, 2005]. Вкупе с ограниченным регенеративным потенциалом нервной ткани, все это делает спонтанное восстановление утраченных нервных волокон практически невозможным. В то же время для острых повреждений нервной ткани (если они не носят несовместимый с жизнью характер) характерно наличие достаточного протяженного временного терапевтического окна (дни), когда прогрессирование повреждения может быть остановлено введением нейропротективных молекул [Colucci-D'Amato et al, 2020; Atkinson et al, 2023]. Повышение устойчивости нейрональных клеток к повреждению и нейтрализация/ослабление негативного действия отдельных звеньев

патогенеза в активной фазе острого повреждения (что и составляет нейропротекцию) позволяют сохранить поврежденные структуры нервной системы и увеличить клиническую эффективность такой терапии. К таким нейропротективным молекулам можно отнести нейротрофические факторы, играющие критически важную роль в развитии, поддержании, функционировании и регенерации центрального и периферического отделов нервной системы (НС), причем наблюдается тропность отдельных нейротрофических факторов к конкретным отделам и структурам НС [Гомазков, 2006; Gordon et al, 2009]. Повреждение нервной ткани вызывает повышение экспрессии нейротрофических факторов и их рецепторов в ПНС и ЦНС, однако, такая спонтанная экспрессия носит отсроченный и непродолжительный характер, что значительно ограничивает ее терапевтический потенциал. Поиск таких молекул, изучение их нейропротективной активности самих по себе и в комбинациях, установление оптимальных способов их доставки и времени применения для обеспечения эффективной нейропротекции и регенерации нервной ткани при острых ее повреждениях и представляет собой одну из важнейших задач нейрофармакологии и регенеративной биомедицины.

1.1.1 Особенности патогенеза острого повреждения и регенерации периферического отдела нервной системы

«Острые повреждения нервных стволов и сплетений являются одной наиболее частых причин развития как временной, так и стойкой утраты трудоспособности [Шевелев, 2005; Одинак и др., 2009], что обусловлено важностью функций ПНС и ее ограниченным потенциалом к регенерации [Шевелев, 2005]. Существующие подходы к лечению повреждений нервных стволов, как одной из основных структур периферической нервной системы, позволяют добиться их выздоровления лишь после легкой травмы, однако при тяжелой (особенно с высоким уровнем повреждения), хронической» [Карагяур и др., 2017] или сочетанной травме существующие подходы бессильны, что

подталкивает к необходимости поиска новых способов стимуляции и поддержания регенерации нервных волокон в течение необходимого промежутка времени.

Для лучшего понимания механизмов повреждения и регенерации ПНС вкратце напомним принципы ее функциональной организации. В «физиологических условиях нейроны ПНС находятся во взаимных трофических отношениях с поддерживающими их сателлитными клетками (шванновскими клетками или леммоцитами) и органами-мишенями. Контакт нервного волокна со шванновскими клетками и иннервируемым органом обеспечивает их нервную трофику и поддерживает последние в дифференцированном и функциональном состоянии. При этом шванновские клетки и клетки органа-мишени сами продуцируют биологически активные молекулы, обеспечивающие трофику и поддержку нейронов (в том числе нейротрофические факторы), а за счет контактного взаимодействия (Nogo-66, MAG, Omp, T-кадгерин [Fredette et al, 1994], нейрегулины-erbB2/erbB3 [Barres et al, 1999], NgR-p75 [Kwon et al, 2002]) сохраняют их покоящийся, нерегенерирующий фенотип, препятствующий росту и ветвлению нервных волокон.

Секретируемые нейротрофические факторы связываются с рецепторами на поверхности нейритов и образовавшийся комплекс рецептор-нейротрофин эндоцитозуется с образованием сигнасомы (сигнализирующей эндосомы), которая ретроградным аксональным транспортом доставляется в тело нейрона. Активация рецепторов класса trk (tropomyosin receptor kinase) запускает сигнальные каскады, поддерживающие выживание и функционирование нейронов. Разрыв нервных волокон нарушает поступление трофических сигналов как к денервированным органам и тканям, так и к самим нейронам, что служит основным сигналом к запуску программы регенерации. В поврежденных нейронах и денервированных тканях активируется экспрессия «генов репарации» [Goldberg, 2003; Gordon et al, 2020], среди которых следует особо выделить гены факторов роста и их рецепторы. На

кончике аксона регенерирующего нейрона образуется конус роста - специфическая структура, несущая на своей поверхности рецепторы к широкому спектру лигандов, определяющих рост и навигацию аксона. К таким лигандам можно отнести факторы роста (в т.ч. нейротрофические и проангиогенные), белки внеклеточного матрикса и навигационные молекулы» [Карагяур и др., 2017].

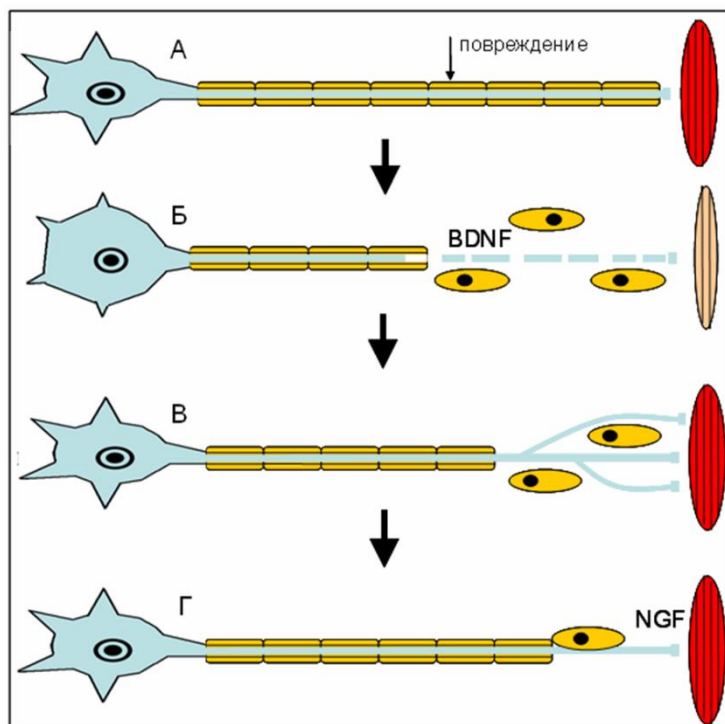


Рисунок 1.1 - Принципиальная схема регенерации периферического нерва после повреждения: А - повреждение интактного нерва; Б - Валлеровская дегенерация нервного волокна, переход шванновских клеток в пролиферирующий фенотип, продукция ими нейротрофических факторов; В - спрутинг и рост нервного волокна, восстановление контакта с органом-мишенью, Г - ремиелинизация нервного волокна, удаление избыточных коллатералей, завершение регенерации.

Посредством выбрасывания филоподий и «ламеллиподий» конус роста обследует окружающее пространство в поиске аттрактивных и репульсивных сигналов. В случае преобладания интенсивности аттрактивного сигнала над репульсивным происходит удлинение регенерирующего нервного волокна [Goldberg, 2003; Hoke et al, 2006; Gordon et al, 2020]. Шванновские клетки,

утратившие контакт с нервным волокном, совершают мезенхимальный переход в премиелинизирующий (пролиферирующий) фенотип и пролиферируют [Hoke et al, 2006; Gordon et al, 2020] (Рисунок 1.1). Они мигрируют в область повреждения и фагоцитируют продукты деградации миелина, а затем выстраиваются вдоль соединительнотканых чехлов разрушенного нерва и, экспрессируя трофические факторы (NGF, BDNF, VEGF, HGF, IGF-I, GDNF и др.) [Goldberg, 2003; Гомазков, 2006; Gordon et al, 2020], стимулируют прорастание сохранившихся нервных волокон из проксимального участка нерва через область повреждения.

Вступая в контакт с проросшим нейритом, шванновские клетки переходят в миелинизирующий фенотип и обволакивают нейрит дубликатурой мембраны, запуская процесс образования миелина и формирования перехватов Ранвье - основных функциональных доменов в миелинизированных аксонах» [Карагяур и др., 2017; Simons et al, 2006].

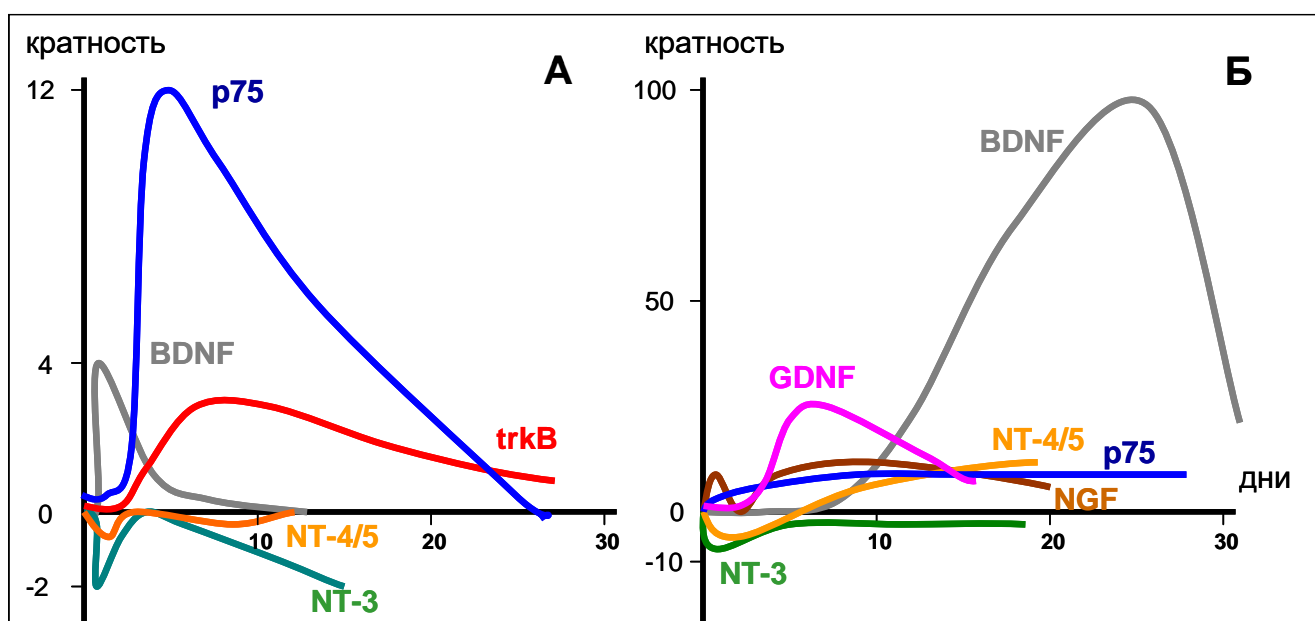


Рисунок 1.2 - Динамика экспрессии нейротрофических факторов и их рецепторов в проксимальном (А) и дистальном (Б) конце поврежденного нерва [Boyd et al, 2003].

При достижении органа-мишени рост нейрита прекращается и запускается синаптогенез [Sanes et al, 1999; Gordon et al, 2020]. Данный процесс спонтанной регенерации нервных волокон стимулируется эндогенными нейротрофическими факторами, однако, поскольку их продукция является кратковременной (менее 4 недель от момента повреждения) (Рисунок 1.2), спонтанная регенерация периферических нервных волокон также ограничена этим временным интервалом [Gordon et al, 2020].

При «средней скорости роста нейрита в 0.5-1.0 мм в сутки (в благоприятных условиях) за 4 недели нейриту удастся преодолеть дистанцию, не превышающую нескольких сантиметров. Если в течение этого срока нервные волокна не успеют установить контакты со своими мишенями, то на фоне снижения продукции нейротрофических факторов прекращается рост нейритов, а нейроны атрофируются или погибают» [Карагяур и др., 2017]. Ряд исследований последних лет (в т.ч. и наших собственных) демонстрируют, что для поддержания регенерации периферических нервных волокон недостающие трофические стимулы можно компенсировать их экзогенным введением, как в виде белковых форм отдельных факторов роста (или их композиций), так и в виде генов (или их комбинаций), кодирующих такие факторы.

Поскольку каждый из факторов роста/цитокинов характеризуется своими предпочтительными клеточными и молекулярными мишенями, а также динамикой экспрессии, то изучение вклада каждого из них требует проведения тщательного анализа с экспериментальным определением их нейропротективного потенциала в *in vitro* и *in vivo* моделях. Более того, поскольку согласно концепции современной регенеративной биомедицины, эффективной регенерации можно добиться лишь сочетанным действием на ее ключевых участников и ее основные этапы, особого внимания заслуживают комбинации таких факторов, предпочтительно обладающих плеiotропной активностью и функционально дополняющих друг друга.

В разделе 1.1.3 будут рассмотрены основные классы биологически активных молекул, играющих ключевую роль в процессах восстановления периферической нервной ткани.

1.1.2 Особенности патогенеза острого повреждения и регенерации центрального отдела нервной системы

«Острые повреждения мозговой ткани несмотря на относительно невысокую распространенность (в среднем 11 случаев на 1000 человек в год) характеризуются высокой степенью инвалидизации (до 80% при инсультах) и летальности в течение 1 года после повреждения (до 20-50% в зависимости от типа и тяжести повреждения) [Клочихина и др., 2020; WHO, 2023]. К острым повреждениям мозговой ткани можно отнести инсульты (ишемический и геморрагический), черепно-мозговые травмы (ЧМТ) различного генеза, бактериальные и вирусные энцефалиты, токсические и метаболические энцефалопатии и др. Несмотря на различия в этиологии, течение и патогенез таких повреждений головного мозга во многом схожи: они запускаются гибелью нейронных клеток и нарушением целостности гемато-энцефалического барьера (ГЭБ), зачастую сопровождаются кровоизлияниями, нейровоспалением и вторичным повреждением мозговой ткани [Hoffman et al, 2009; Ng et al, 2019; Kuriakose et al, 2020].

В первые минуты после действия повреждающего фактора (к примеру, ишемии, излившейся крови, травматической деструкции и т.п.) развивается первичное повреждение головного мозга [Hoffman et al, 2009; Ng et al, 2019; Kuriakose et al, 2020; Wijeratne et al, 2021]. Вовлеченность и степень выраженности отдельных звеньев патогенеза может варьировать в зависимости от этиологии заболевания, его тяжести, локализации повреждения, своевременности и эффективности применяемой терапии. В целом, формируется очаг непосредственного первичного повреждения и перифокальная зона (зона пенумбры) - область еще живых, но высоко чувствительных к малейшим изменениям ближайшего микроокружения

нейронов и клеток микроглии [Hoffman et al, 2009; Ng et al, 2019; Kuriakose et al, 2020; Wijeratne et al, 2021].

Под действием повреждающего фактора в первичном очаге нарушается целостность нейронов и клеток глии, происходит их гибель, что приводит к разрушению межнейронных связей [Hoffman et al, 2009; Ng et al, 2019; Kuriakose et al, 2020; Wijeratne et al, 2021]. Практически всегда гибель значимого количества нейральных клеток сопровождается очаговыми или диффузными нарушениями ГЭБ и нарушениями микроциркуляции. Вне зависимости от этиологии повреждения гибель большого количества нейральных клеток приводит к массовому выбросу метаболитов арахидоновой кислоты (лейкотриены, тромбоксаны), обладающих мощной вазоконстрикторной активностью, что приводит к локальной ишемии мозговой ткани [Saloheimo et al, 2005]. Ишемическое повреждение может усугубляться тромбозом микроциркуляторного русла (в случае ишемического инсульта, вирусных энцефалитов) или отеком мозговой ткани в результате нарушения целостности ГЭБ и лизиса эритроцитов излившейся крови (при геморрагическом инсульте, токсических энцефалопатиях, травматических и инфекционных повреждениях мозговой ткани) [Yang et al, 2011].

Нарушение оксигенации мозговой ткани приводит к быстрому истощению запасов АТФ (уменьшению соотношения АТФ/АДФ), что напрямую или через активацию АМПК- $\alpha 1$ (АМФ-активируемая протекиназа $\alpha 1$) приводит к блокированию активности нейрональной Na^+/K^+ -АТФазы [Латышева и др, 2011; Gusarova et al, 2011], снижению мембранного потенциала нейронов и их деполяризации с массовым выбросом нейромедиаторов [Crowley et al, 2017], в том числе и глутамата. Глутамат-опосредованная активация NMDA (N-methyl-D-aspartate) рецепторов приводит к повышению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , что на фоне дисфункции ионных транспортеров ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -транспортера) запускает образование свободных радикалов ($\text{NO}\cdot$ и ONOO^-), активирует целый ряд Ca^{2+} -зависимых белков - фосфолипаз, протеаз, нуклеаз и вызывает каспаза-

зависимый апоптоз нейронов [Bernardo-Castro et al, 2020]. Помимо этого, недостаток кислорода в мозговой ткани приводит к дисфункции митохондрий, накоплению лактата и ацидозу, что усиливает отек ткани, нарушает ГЭБ и сдавливает окружающие участки мозга (зона пенумбры), приводя к их ишемии и гибели на последующих этапах патогенеза.

Через 4-6 часов после острого повреждения, мозговой ткани происходит активация астроцитов (т.н., астроглиоз) [Горбачева и др, 2018], которые, с одной стороны, продуцируют нейротрофины и обеспечивают защиту нервной ткани, а, с другой, усугубляют ее повреждение через продукцию ими активных форм кислорода (АФК) [Bernardo-Castro et al, 2020].



Рисунок 1.3 - Сопоставление динамики патогенеза острого повреждения мозговой ткани и временного терапевтического окна существующих и перспективных подходов к лечению таких повреждений.

Результирующий вектор данного воздействия во многом определяется этиологией и объемом повреждения. Все описанные выше патогенетические механизмы достигают максимальной активности в течение первых 12-24 часов после повреждения (Рисунок 1.3). При инсультах данный временной интервал идентифицируют, как острую фазу инсульта.

На более поздних этапах повреждения мозговой ткани (24-72 часа после повреждения) к указанным патогенетическим механизмам присоединяется ферроптоз - особая форма апоптоза, индуцируемая соединениями железа

(продукты разрушения излившейся крови) и протекающая с выраженным перикисным окислением компонентов биомембран (мембраны митохондрий, лизосом, плазматические мембраны) [Fang et al, 2022]. Ферроптоз наиболее характерен для поражений мозга, сопровождающихся кровоизлияниями (геморрагический инсульт, токсические энцефалопатии, травматические и инфекционные повреждения мозговой ткани). Повышенная восприимчивость нервной ткани к ферроптозу объясняется высоким содержанием в мембране нейрональных клеток полиненасыщенных жирных кислот [Yao M et al, 2021].

Помимо ферроптоза на данном этапе ключевую роль в прогрессировании патологического процесса играют отек ткани мозга в области пенумбры, а также нейровоспаление [Maida et al, 2020]. В дополнение к уже перечисленным причинам развития отека мозга развивается и осмотический отек мозговой ткани, обусловленный разрушением клеток и высвобождением большого количества белков, ионов и низкомолекулярных соединений в области повреждения [Winkler et al, 2016]. Отек мозговой ткани, как описано выше, нарушает ее трофику, целостность и функцию (что наиболее актуально в отношении пенумбры), а также может приводить к нарушению ГЭБ - все это утяжеляет течение заболевания и уменьшает вероятность выживания пациента.

Массовая гибель нейральных клеток, высвобождение продуктов их распада (т.н., DAMPs - Damage-associated molecular patterns) приводит к активации клеток микроглии и их поляризации в M1-фенотип, а также индуцирует продукцию ими активных форм кислорода и провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6 и TNF- α) [Горбачева и др, 2018; Muzio et al, 2021]. Выброс провоспалительных цитокинов индуцирует лейкоцитарную инфильтрацию области повреждения, что, в свою очередь, усиливает ее повреждение и отек [Bernardo-Castro et al, 2020]. Совокупность данных патогенетических механизмов и составляет нейровоспаление. Через 72 часа после первичного повреждения нейровоспаление становится преобладающим повреждающим фактором в нервной ткани.

Таким образом, замыкается патологический круг: повреждение и гибель нейрональных клеток -> отек, нейровоспаление -> нарушение ГЭБ и ишемия -> разрастание очага повреждения -> повреждение и гибель нейрональных клеток -> и т.д. [Bernardo-Castro et al, 2020; Sorby-Adams et al, 2017; Sifat et al, 2017]. Такой тип повреждения получил название вторичного повреждения мозговой ткани [Lok et al, 2011]. Вероятность развития и объем вторичного повреждения во многом определяются типом и объемом повреждения, а также особенностями иммунологического статуса пациента.

В случае успешной резорбции некротизированных масс и сохранности жизненно-важных центров, происходит замещение мозговой ткани в области повреждения глиальным рубцом [Huang et al, 2014], а неповрежденные отделы мозга пытаются перестроить часть нейронных связей для компенсации функций утраченных отделов. Размер области повреждения и длительность течения патологического процесса в высокой степени коррелируют с развитием постинсультных осложнений: эпилепсии и демиелинизирующих заболеваний.

Единство патогенетических механизмов при острых повреждениях мозговой ткани (вне зависимости от их этиологии) [Hoffman et al, 2009; Ng et al, 2019; Kuriakose et al, 2020; Bernardo-Castro et al, 2020; Wijeratne et al, 2021] наталкивает на мысль, что для их купирования могут быть применены одни и те же подходы, включающие нейропротекцию, подавление нейровоспаления и вторичного повреждения. Основные классы биологически активных молекул, способные осуществлять нейропротекцию в центральном и периферическом отделах нервной системы, способные подавлять нейровоспаление и вторичное повреждение, а также существующие и перспективные терапевтические подходы, направленные на эти ключевые звенья патогенеза в ЦНС, будут рассмотрены далее» [Карагяур и др., 2017].

1.1.3 Ключевые молекулы, стимулирующие нейропротекцию и регенерацию в нервной ткани

Среди эндогенных ключевых молекул, участвующих в процессах поддержания и регенерации нервной ткани после «повреждения, можно выделить 6 основных групп: нейротрофические факторы, факторы роста, противовоспалительные цитокины, протеазы, навигационные молекулы и матриксные белки. К группе нейтрофических факторов относят 3 основных семейства: нейротрофины (NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5), глиальные нейротрофические факторы (GDNF и Art) и нейропозитические цитокины (CNTF, IL-6 и др.)» [Карагяур и др., 2017; Boyd et al, 2003; Гомазков, 2006]. Они играют ключевую роль в развитии, трофике, пластичности и регенерации структур центральной и периферической нервной системы. Рецепторы к нейротрофинам расположены на поверхности нейронов, шванновских клеток и эндотелиальных клеток. Стоит отметить, что у лигандов из группы классических нейротрофических факторов (NGF, BDNF и др.) «существует 2 основных рецептора, один из которых принадлежит к классу trk (tropomyosin receptor kinase), а другой является низкоаффинным рецептором для нейротрофинов p75NTR» [Карагяур и др., 2017; Boyd et al, 2003; Гомазков, 2006]. Любопытным является тот факт, что рецепторы класса trk в основном связывают зрелые (без пропептида) формы нейротрофинов, в то время, как рецептор p75NTR обладает тропностью к проформам нейротрофических факторов. «Связывание нейротрофинов (преимущественно зрелых форм) с trk активирует сигнальные каскады RAS/ERK, PI3K и PLC- γ , что стимулирует рост нейритов и образование моторной концевой пластинки, а за счет активации и/или увеличения экспрессии антиапоптогенного (Bcl-2), а также подавления экспрессии проапоптогенных факторов транскрипции (Forkhead1 и Pax) поддерживает выживаемость поврежденных нейронов» [Карагяур и др., 2017; Boyd et al, 2003; Гомазков, 2006; Gordon et al, 2020] (Рисунок 1.4).

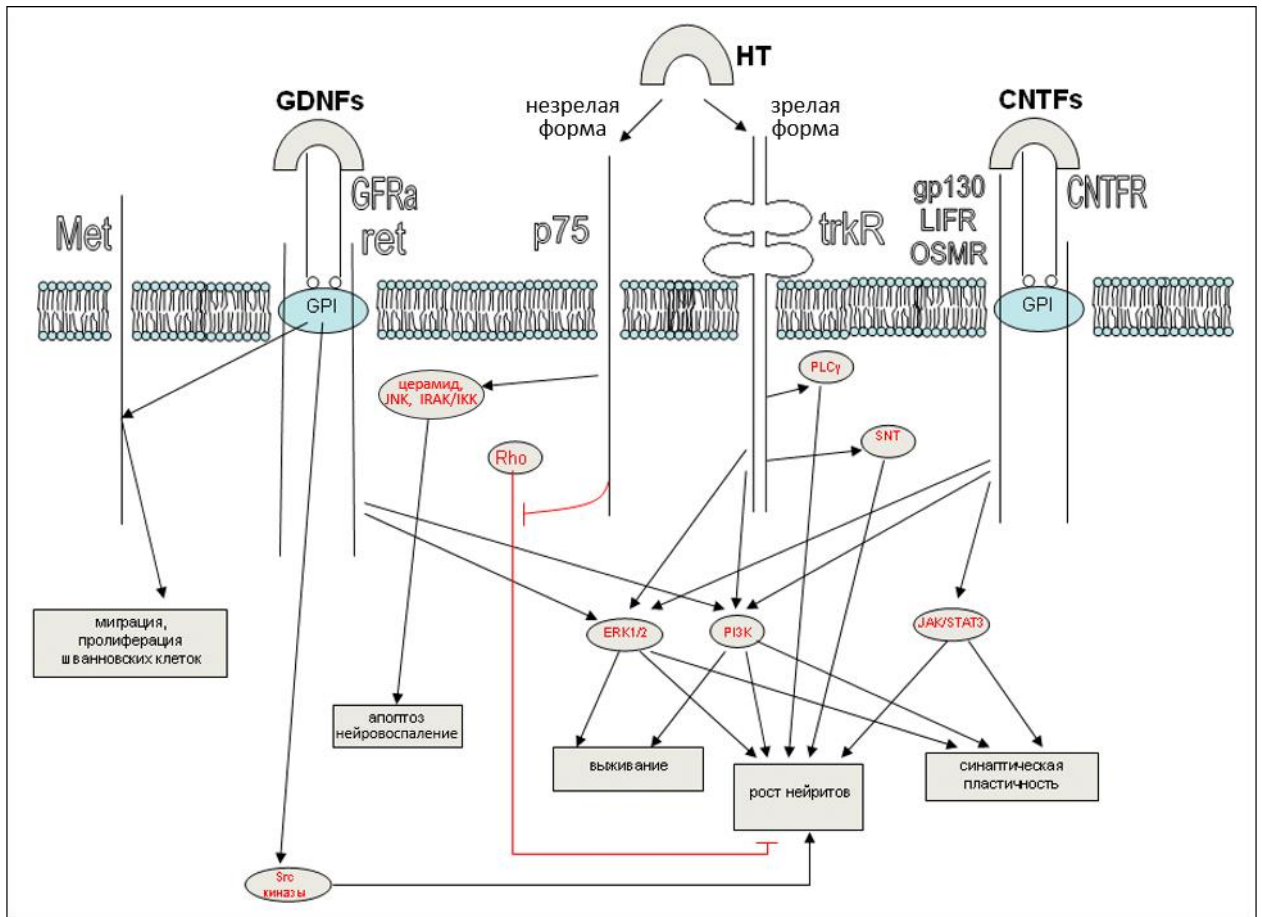


Рисунок 1.4 - Принципиальная схема сигнализации нейротрофических факторов семейств NGF (HT), GDNF и CNTF. Взаимодействие проформ нейротрофинов семейства NGF с рецептором p75 может приводить к запуску программы апоптоза и нейровоспаления.

Связывание проформ нейротрофинов с альтернативным рецептором p75NTR, запускает сигнальные каскады JNK и IRAK/IKK, что может приводить к гибели нейральных клеток и развитию нейровоспаления [Simmons et al, 2017]. Таким образом, казалось бы, одни и те же белки, в зрелой и незрелой форме, могут обладать различным эффектом на регенерацию нервной ткани. Поскольку созревание нейротрофических факторов зависит от ряда ферментов (PACE - Paired basic amino acid cleaving enzyme, PC - Prohormone convertases, Плазмина, MMP-7) [Costa et al, 2018], то изменения экспрессии или функции данных ферментов может приводить к дисбалансу проформ и зрелых форм нейротрофинов и тем самым изменять конечный терапевтический эффект (Рисунок 1.4) [Boyd et al, 2003; Гомазков, 2006].

Тонкости этого механизма регуляции и его биологическое значение в процессах регенерации нервной ткани еще только предстоит установить. Дисбаланс соотношения проформ нейротрофических факторов к их зрелым формам также может возникнуть при повышении экспрессии нейротрофинов (например, в случае терапии генами нейротрофинов), поскольку эндогенных пропротеин конвертаз может оказаться недостаточно для поддержания их адекватного созревания. Поэтому при попытках повысить уровень экспрессии эндогенных или рекомбинантных нейротрофических факторов (в целях сохранения их нейропротективной активности) выигрышной тактикой может оказаться ко-экспрессия с ними ферментов, их активирующих.

Как уже было упомянуто, «нейротрофические факторы обладают тропностью к определенным типам нервных и глиальных клеток, что, вероятно, обусловлено различиями в распределении рецепторов на поверхности нейронов разных типов. Так NGF обеспечивает трофику и регенерацию чувствительных, симпатических и холинергических нейронов, в то время как BDNF поддерживает выживаемость и стимулирует регенерацию, GDNF обеспечивает защиту моторных и симпатических нейронов, а также стимулирует рост чувствительных и симпатических нейритов [Boyd et al, 2003; Гомазков, 2006].

Наряду с нейротрофинами существуют факторы роста и других модальностей, которые, тем не менее, обладают нейротрофической и нейропротективной активностью. К ним можно отнести семейства проангиогенных факторов: семейство фактора роста фибробластов (FGF) и семейство фактора роста эндотелия сосудов (VEGF).

Семейство FGF человека включает белки, кодируемые 22 различными генами: FGF1-FGF14, FGF16-FGF23 [Dono et al, 2003]. Экспрессия FGFs была показана в большинстве органов и тканей, но в ЦНС были идентифицированы FGF2 и FGF1, причем уровень их экспрессии в мозговой ткани повышается после повреждения и при ишемии. FGFs реализуют свое защитное и прорегенераторное действие на нейроны посредством связывания с

тирозинкиназными рецепторами FGFR1-3 с последующей активацией сигнальных каскадов RAS/ERK, PI3K, PLC- γ [Bottcher et al, 2005], стимулирующих нейропротекцию, адгезию нейронов к матриксу и рост нейритов. FGF2 способен стимулировать нейропротекцию зрелых чувствительных и двигательных нейронов [Dono et al, 2003].

Семейство фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) включает не менее 7 представителей: VEGF-A-VEGF-E и PLGF-1,-2. Эти факторы способны стимулировать регенерацию нервной ткани как напрямую (прямая нейротрофическая активность), так и опосредованно (через стимуляцию ангиогенеза) [Hobson et al, 2000; Storkebaum et al, 2004]. Для VEGF известны три тирозинкиназных рецептора, но на поверхности нейронов и шванновских клеток обнаружен только рецептор Flk-1 (VEGFR-2)» [Карагяур и др., 2017; Hobson et al, 2000; Zachary et al, 2005; Bagnard et al, 2001], связываясь с которым, VEGF активирует сигнальные каскады PI3K, PLC- γ и RAS/ERK. На поверхности нейритов существует и другой класс рецепторов для VEGF - нейропилины (NP1 и NP2). Связываясь с ними, VEGF экранирует их от связывания с молекулами репеллентами роста нейритов - семафоринами Sema3A, 3C, 3D и 3F [Bagnard et al, 2001]. «Тем самым VEGF стимулирует прораствание нервных волокон. Через связывание с Flk-1 и NP1 VEGF стимулирует выживаемость чувствительных, моторных и симпатических нейронов, стимулирует рост их нейритов [Storkebaum et al, 2004; Zachary et al, 2005], а также поддерживает выживаемость шванновских клеток, стимулирует их пролиферацию и миграцию [Hobson et al, 2000; Bagnard et al, 2001].

Помимо представителей семейств FGF и VEGF выраженная нейротрофическая активность была показана для белков семейств эпидермального фактора роста (EGF) и инсулиноподобного фактора роста (IGF) [Гомазков, 2006; Russo et al, 2005; Bazley et al, 2005].

Важную роль в процессах регенерации поврежденной нервной ткани играют и протеолитические ферменты. Они очищают область повреждения» [Карагяур и др., 2017] (соединительнотканые чехлы поврежденного нерва,

область кровоизлияния или массивного некроза клеток) от фибрина (мощного ингибитора роста нервных волокон) и клеточного детрита (в т.ч. белков миелина), расщепляют ингибирующие белки (тенасцин-С, F-спондин, Slit-белки, белки Nogo, семафорины) [Chantry et al, 1992] и белки внеклеточного матрикса, высвобождают из матрикса заякоренные факторы роста и активируют их (стимулируют их созревание) [Siconolfi et al, 2001]. Такими свойствами обладают матриксные металлопротеиназы, плазминоген, а также его активаторы: «урокиназный и тканевой активаторы плазминогена (uPA и tPA). На мембране конуса роста нейритов, а также лидирующем крае шванновских и эндотелиальных клеток экспрессируются рецепторы, способные концентрировать эти ферменты, что позволяет осуществлять локальный протеолиз» [Карагяур и др., 2017] по ходу роста нейритов или растущего сосуда [Siconolfi et al, 2001; Pittman et al, 1989]. Также связывание специфических лигандов с рецепторами uPAR, AIIIR, PAR-1 может приводить к активации Src, FAK-киназы, RAS/ERK и JAK/STAT сигнальных путей, которые контролируют процессы выживания, пролиферации, адгезии, миграции и дифференцировки шванновских и эндотелиальных клеток, а в нейронах - рост нейритов [D'Alessio et al, 2009]. Согласно данным литературы, матриксные металлопротеиназы, плазминоген или его активаторы могут быть молекулами выбора для ускорения созревания пронеуротрофинов (при их гиперэкспрессии) в зрелые молекулы нейротрофинов с целью усиления их нейротрофического и нейропротективного потенциала.

Учитывая важный вклад нейровоспаления в прогрессирование вторичного повреждения нервной ткани (особенно, в центральном ее отделе), можно предположить, что экспрессия молекул, его подавляющих (например, TGFb1, IDO (внутриклеточно) и противовоспалительные цитокины IL-4, IL-10, IL-13 и др.), также будут обладать нейропротективной активностью и способствовать скорейшей регенерации нервной ткани [Chen et al, 2015; Wang et al, 2021; Sodhi et al, 2021]. IL-4, IL-10 и IL-13 связываются с рецепторами IL4R, IL10R и IL13R, соответственно, что приводит к активации JAK/STAT

сигнального каскада, повышению уровня экспрессии противовоспалительных молекул и подавлению продукции провоспалительных цитокинов и ко-стимуляторных молекул [Schülke et al, 2018; Shi et al, 2021]. TGF β 1 реализует свой противовоспалительный потенциал через активацию TGF- β -SMAD2/3 сигнального каскада [Zhang H et al, 2018]. Выброс провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12, IL-17, IL-23, TNF α , IFN γ , GM-КСФ), наоборот, увеличивает проницаемость ГЭБ для иммунных клеток, стимулирует привлечение лейкоцитов в область повреждения, прогрессию нейровоспаления и вторичного повреждения мозговой ткани [Becher et al, 2017].

Помимо непосредственной стимуляции процессов выживания нейронов и удлинения нейритов для восстановления поврежденных нервных связей необходимо обеспечить подходящий обладающий пермиссивными свойствами матрикс и адекватную навигацию растущих нервных отростков, чтобы "привести" их к клетке-мишени и предотвратить их прорастание в нежелательные участки ткани. Функции навигационных молекул для нервных отростков выполняют растворимые нетрины, белки Slit и семафорины, заякоренные в мембране эфрины [Seiradake et al, 2016], а также молекулы межклеточной адгезии (NCAM, L1, кадгеринины) и адгезии к матриксу (интегрины) [Ide et al, 1996]. Точность позиционирования конкретного нервного волокна определяется суммарным вектором действия всех поступающих сигналов и уровнем представленности конкретных рецепторов на мембране конуса роста.

Критически важными для выживания и регенерации нервных волокон является наличие пермиссивного матрикса. К основным белкам, стимулирующим рост нейритов, относят ламинины и фибронектин, которые распознаются конусом роста посредством рецепторов α 1 β 1, α 3 β 1 и α 6 β 1 (для ламинина), и α 5 β 1, α 3 β 1, α 4 β 1, α V β 1 и α V β 8 - для фибронектина. «Связывание интегринов конуса роста с ламинином или фибронектином внеклеточного матрикса является сигналом к перестройке цитоскелета и удлинению аксонов

[Letourneau et al, 2009]. Ряд матриксов обладает ингибирующей активностью (протеогликаны внеклеточного матрикса и фибрин) в отношении нервных волокон - они ограничивают образование коллатералей и избыточный рост аксонов в физиологических условиях, однако после травмы подавляют регенерацию нервных волокон» [Карагяур и др., 2017; Snow et al, 1990; Kato-Semba et al, 1995]. Деградация таких ингибирующих матриксов, например, за счет локального ограниченного протеолиза (например, плазмин-опосредованный фибринолиз) стимулирует регенерацию поврежденных аксонов и позволяет им преодолеть (прорасти через) очаг повреждения.

В настоящий момент разрабатываются подходы к манипуляции направлением роста отдельных нервных волокон (например, покрытие поверхностей графта нерва VEGF, который является хемоаттрактантом для нервных волокон и антагонистом репеллентных молекул Sema3A и Sema3F) [Rao et al, 2020], однако, потенциала существующих технологий пока не достаточно для полноценной реиннервации de novo клеток-мишеней, даже в более просто устроенном периферическом отделе нервной системы.

В заключение обзора ключевых белковых молекул, участвующих в регенерации нервной ткани, стоит обратить внимание на тот факт, что конечный нейропротективный эффект конкретной молекулы может значительно варьировать в зависимости от динамики ее экспрессии, времени и пути введения (для вводимых экзогенно молекул), от ее концентрации и сочетанного применения с другими молекулами, а также от индивидуальной чувствительности целевых клеток.

1.2 Существующие и перспективные подходы к медикаментозной стимуляции процессов нейропротекции и регенерации в периферическом отделе нервной системы

«Процесс регенерации нервных волокон сложен, задействует большое количество факторов, и, зачастую, эндогенных ресурсов организма недостаточно для его эффективного завершения, в особенности при тяжелых,

сочетанных и высоких (по уровню повреждения) травмах. Спонтанное восстановление при такого рода травмах практически невозможно» [Карагяур и др., 2017] и требует экзогенного терапевтического или хирургического вмешательства. Хирургические методы лечения повреждений периферического отдела нервной системы подробно анализируются в ряде публикаций [Konofaos et al, 2013; Reddi et al, 2014; Hems et al, 2015], а в данной главе обзора литературы посвящена нехирургическим существующими и перспективным подходам к обеспечению нейропротекции и стимуляции регенерации периферического отдела нервной системы.

Существующие методы стимуляции регенерации поврежденного периферического отдела нервной системы (в основном, нервных стволов) [Масгутов и др, 2013; Древаль и др, 2015] в большинстве своем нацелены на восстановление анатомической целостности поврежденных нервов, устранение внутренней и наружной компрессии нервных стволов, а также создание благоприятных условий для спрутинга, элонгации аксонов и их последующей ремиелинизации. Для стимуляции спрутинга и роста аксонов, а также стимуляции выживания, пролиферации и миграции шванновских клеток применяют витамины группы В (В1, В6 и В12), ряд гормонов (тироксин, трийодтиронин, тестостерон, АКТГ4-10, инсулин), а также чрескожную электронейростимуляцию культи нерва, вибростимуляцию сухожилий и «магнитостимуляцию головного и спинного мозга. Для усиления нейромышечной передачи применяют дибазол, ноотропные и антихолинэстеразные препараты, а для стимуляции ре-миелинизации поврежденного нерва - ганглиозиды, кельтикан.

Витамины группы В участвуют в качестве коферментов в широком спектре метаболических процессов, в частности, в обмене белков, жиров и углеводов, а также синтезе нуклеиновых кислот. Применение витаминов группы В интенсифицирует общий обмен веществ, в т.ч. и процесс регенерации травмированного периферического нерва, а для витамина В12

показано прямое участие в процессах формирования миелиновой оболочки» [Карагяур, 2013; Valtrusch et al, 2021].

Для предупреждения рубцевания в области повреждения нервного ствола и сохранения проходимости его эндоневральных каналов осуществляют инъекции в область повреждения препаратов ронидазы и гиалуронидазы, осуществляют физиотерапевтические процедуры (электрофорез солей хлора, йодистого калия и глюкокортикоидов), прописывают массаж и лечебную физкультуру [Кхир и др, 2011; Vidal, 2023].

Остальные применяемые терапевтические подходы в основном являются симптоматическими и направлены на снятие отека, обезболивание, нормализацию кровообращения в денервированной конечности, коррекцию психоневрологических нарушений, профилактику развития контрактур и тугоподвижности в суставах.

Наиболее значимым недостатком существующих подходов к терапии периферического отдела НС является их неспособность поддерживать выживание поврежденных нервных клеток, что является критически важным условием успешного «восстановления структуры и функции периферического нерва после повреждения. В организме эту функцию выполняют нейротрофические факторы» [Карагяур, 2013], экспрессия которых многократно возрастает после повреждения. Однако, кратковременность их экспрессии и протяженность процесса регенерации делает спонтанное восстановление нервной ткани за счет только эндогенно продуцируемых факторов не эффективным и маловероятным.

«Экзогенное введение рекомбинантных нейротрофических факторов в острый период повреждения периферического отдела НС позволяет обеспечить большее количество нейронов нейротрофической поддержкой, что увеличивает эффективность их выживания, облегчает регенерацию, и в конечном итоге способствует лучшему восстановлению структуры и функции пораженного нерва» [Карагяур и др., 2017; Terenghi et al, 1999]. Однако широкомасштабное применение рекомбинантных факторов роста в

клинической практике ограничено целым рядом недостатков: высокой себестоимостью получения высокоочищенных рекомбинантных белков, краткосрочностью их действия, необходимостью осуществления большого количества инъекций, вероятностью создания токсических локальных концентраций и сложностью смоделировать природный градиент фактора роста с тем, чтобы придать направленность процессу регенерации.

Помимо этого, введение избыточных нефизиологических концентраций нейротрофических факторов может приводить к чрезмерному ветвлению регенерирующих нейритов, образованию невром, множественной иннервации и вращанию нерва в орган-мишень [Klimaschewski et al, 2013]. Для подавления избыточного ветвления нейритов в процессе роста было предложено использовать нейротрофические факторы в комбинации с селективными ингибиторами PI3K/Akt сигнального каскада, который в основном и контролирует ветвление нейритов [Kimpinski et al, 2001; Edstrom et al, 2003; Klimaschewski et al, 2013]. RAS/ERK сигнальный каскад при этом не затрагивается, что стимулирует нейропротекцию и рост нейритов (в экспериментах *in vitro*). Вопрос об эффективности и безопасности предложенного подхода в эксперименте *in vivo* остается открытым.

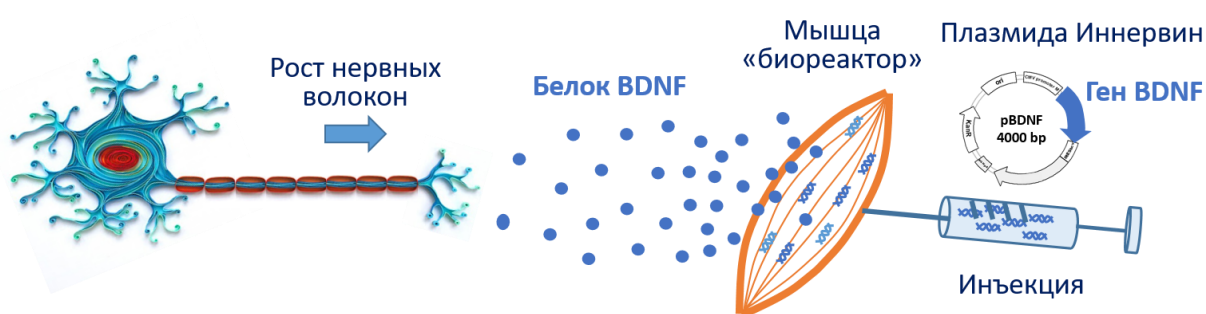


Рисунок 1.5 - Принцип стимулирования регенерации волокон периферического нерва с помощью генотерапевтического подхода. Мышца выполняет функцию «биореактора» по продукции мозгового нейротрофического фактора (BDNF) и создает его природоподобный градиент, что стимулирует рост нервного волокна по направлению к денервированному, но производящему BDNF мышечному волокну.

Генная терапия вирусными или плазмидными конструкциями, несущими гены нейротрофинов, представляет собой перспективную альтернативу использованию рекомбинантных белков, поскольку обеспечивает их длительную и постепенную продукцию и высвобождение, а также позволяет создать природоподобный градиент факторов роста к органу-мишени (Рисунок 1.5), а также при необходимости изменить транскрипционную программу целевых клеток.

В «соответствии с этой концепцией, для стимуляции восстановления поврежденной ПНС разрабатываются вирусные векторы (на основе рекомбинантных адено-, ленти-, аденоассоциированных вирусов (AAV), а также вируса простого герпеса (SHV)), кодирующие гены нейротрофических, проангиогенных и морфогенных факторов (эритропоэтина, NGF, GDNF, BDNF, HGF, VEGF, BMP-7 и т.д.)» [Карагяур и др., 2017], а также протективных факторов транскрипции (в частности, Bcl-2) [Mason et al, 2011; Карагяур, 2013].

Посредством генной модификации самих нейронов в области повреждения можно поддержать их выживаемость (через повышение экспрессии антиапоптотических белков), а также увеличить их чувствительность к факторам роста и хемоаттрактантам (через повышение экспрессии генов факторов роста). Использование векторов на основе SHV и аденовирусов для генетической модификации нейронов ограничено из-за их выраженной вирус-опосредованной токсичности для органов и тканей организма. Рекомбинантные лентивирусы и AAV2, напротив, обладают меньшей токсичностью при способности обеспечить длительную экспрессию трансгена [Tannemaat et al, 2008]. «Безопасность AAV2 векторов была подтверждена в ряде клинических исследований» [Карагяур и др., 2017].

«Помимо нейронов генетической модификации могут быть подвергнуты и клетки глии (в ПНС - шванновские клетки), паракринную и прорегенераторную активность которых можно повысить через гиперэкспрессию генов нейротрофических и проангиогенных факторов»

[Карагяур и др., 2017], белков внеклеточного матрикса и др. факторов (через повышение экспрессии ими генов для ускоренной миграции, фагоцитирования и синтеза белков миелина) (Рисунок 1.6).



Рисунок 1.6 - Перспективные подходы к стимуляции регенерации периферического отдела нервной системы: генная и клеточная терапия, тканевая инженерия.

Эффективность генной терапии поврежденной нервной ткани с помощью вирусных конструкций была подтверждена в экспериментах *in vivo*, в которых была показана лучшая выживаемость нейронов, более быстрое и эффективное прорастание нервных волокон, и их лучшая миелинизация. Поскольку восстановление иннервации органа-мишени (мышцы) происходило быстрее и было более полноценным, то это предотвращало развитие в нем атрофических и дегенеративных изменений, а напротив стимулировало ангиогенез [Mason et al, 2011; Карагяур, 2013]. Многие из протестированных молекул не являются нейротрофинами, но обладают нейропротективной активностью благодаря способности активировать те же самые нейропротективные и прорегенераторные сигнальные каскады и антиапоптотические факторы роста. Крайне полезной особенностью некоторых вирусных векторов (SHV, вектора на основе вируса бешенства) является их способность доставлять

терапевтические гены в целевые клетки даже при «введении в проекции поврежденных нервных стволов: например, внутримышечно или в стопу при повреждении n.ischiadicus (седалищный нерв) [Chattopadhyay et al, 2009; Chen Y et al, 2009], или в стекловидное тело при повреждении» [Карагяур и др., 2017] n.opticus (зрительный нерв) [Martin et al, 2003].

Несмотря на экспериментально продемонстрированную эффективность генной терапии поврежденной нервной ткани вирусными векторами, клиническое применение последних вызывает опасения из-за существующей вероятности трансдукции нецелевых клеток и тканей, интеграции в геном и развития иммунных реакций, что обуславливает необходимость поиска альтернативных методов доставки кДНК нейротропных молекул в целевые клетки в очаге повреждения.

Альтернативным подходом к доставке кДНК в целевые клетки является использование плазмидных генотерапевтических векторов, безопасность и эффективность которых была подтверждена в целом ряде доклинических исследований [Ge et al, 1998; Masgutov et al, 2011; Chelyshev et al, 2012]. Ранее нами было показано, что плазмидная конструкция, кодирующая мозговой нейротрофический фактор (BDNF) человека, после инъекции в денервированную мышцу способна обеспечивать уровень экспрессии рекомбинантного BDNF, достаточный для стимуляции восстановления структуры и функции (электрическая проводимость) поврежденного общего малоберцового нерва в модели травматической денервации задней конечности и ишемического повреждения нерва мышцы [Karagyaur et al, 2015]. В этом случае мышечные волокна выступали в качестве источника продукции рекомбинантного BDNF, обеспечивая его постепенную продукцию и природоподобный градиент BDNF от области повреждения нерва к денервированной мышце.

Безопасность плазмидных векторов была подтверждена и в клинических исследованиях [Powell et al, 2010; Kibbe et al, 2016], в т.ч. проведенных нами. Так, внутримышечное введение плазмидной генетической конструкции,

кодирующей BDNF человека, не вызывало у здоровых добровольцев побочных эффектов, а ее однократное внутримышечное введение пациентам с травмой периферического нерва вызывало улучшение иннервации (по результатам электронейромиографии) и улучшало кровоснабжение мышц (по данным лазерной доплерографии). По результатам проведенного клинического исследования (КИ) было установлено, что эффекты однократного применения моноцистронной плазмидной конструкции ограничиваются сроком 1 месяц, однако, при более длительном сроке наблюдения (3 месяца) различия между группами являются статистически недостоверными. По результатам проведенного КИ для увеличения эффективности генотерапевтической поддержки регенерирующих нервных волокон было рекомендовано использовать режим многократного введения генотерапевтической конструкции или сочетание его применения с другими факторами, усиливающими его эффективность или продлевающими его активность. Другими словами, была констатирована ограниченная эффективность моноцистронной «генной терапии (монокомпонентных препаратов для стимуляции процессов регенерации) и было предложено их комбинирование с другими препаратами, функционально их дополняющими. Результаты и выводы, полученные в КИ, соответствуют таковым, полученным в аналогичных доклинических и клинических исследованиях моноцистронных генотерапевтических препаратов для стимуляции процессов регенерации [Gupta et al, 2009; Makarevich et al, 2015].

Комбинирование плазмидных генотерапевтических конструкций, кодирующих гены различных факторов роста, функционально дополняющих друг друга, приводило к лучшей выживаемости нейронов и более полному восстановлению структуры и функции нервных волокон у мышей, чем при использовании каждой из этих плазмид по-отдельности [Pereira Lopes et al, 2013]. Вероятно, это обусловлено различной чувствительностью отдельных клеточных компонентов периферического нерва (нервных волокон различной модальности, шванновских клеток, эндотелиальных клеток и фибробластов) к

отдельным факторам роста и необходимостью комплексного воздействия на сменяющие друг друга этапы процесса регенерации периферического нерва [Boyd et al, 2003; Гомазков, 2006].

На сегодняшний день нет ни одного завершеного КИ, которое позволило бы однозначно судить об эффективности генной терапии для стимуляции регенерации поврежденного периферического нерва моноцистронными плазмидными конструкциями. Однако, для таких мощных митогенов и признанных стимуляторов регенерации, как VEGF165 и bFGF, в ряде КИ экспериментально установленная способность к стимуляции терапевтического ангиогенеза и регенерации тканей оказалась ниже, чем ожидалось [Gupta et al, 2009; Makarevich et al, 2015]. Предположительно, это обусловлено необходимостью одновременного (параллельного) воздействия сразу на ряд ключевых звеньев процесса регенерации для более эффективной его стимуляции. Накопленные данные позволяют предположить, что одним из основных трендов в регенеративной медицине будущего будет являться переход от терапии монокомпонентными препаратами к терапии комбинациями биологически активных молекул или их генов, функционально дополняющими друг друга и способными стимулировать различные этапы и компоненты процесса регенерации. С этой точки зрения возможными перспективными комбинациями для генной терапии поврежденных нервных волокон могут быть комбинации нейрофических факторов с проангиогенными факторами» [Карагяур и др., 2017] или протеазами.

Существенным недостатком генной терапии для стимуляции нейропротекции и регенерации поврежденной нервной ткани является задержка экспрессии закодированных в генотерапевтических конструкциях кДНК факторов роста, что обусловлено необходимостью доставки генотерапевтической конструкции в ядро клетки-продуцента и необходимостью накопления терапевтически значимых концентраций факторов роста в области повреждения, что может занять 48 часов и более [Bauer et al, 2014]. Потенциально, временной лаг в экспрессии

генотерапевтических конструкций можно компенсировать за счет экзогенного введения нейропротективных молекул в первые дни после повреждения в виде рекомбинантных белков или продуктов секреции (секретома) стволовых клеток или клеток-предшественников.

В постнатальном периоде обновление органов и тканей, а также регенерация организма обеспечивается резидентными клетками-предшественниками и стволовыми клетками, которые обладают специфической паракриной активностью и способны дифференцироваться в определенные типы клеток, заменяющие поврежденные, состарившиеся и утраченные клетки и ткани. Было установлено, что трансплантация таких клеток (первично выделенных аутологичных или аллогенных, иммортализованных и генетически модифицированных) способна стимулировать процессы регенерации поврежденной ткани, в том числе восстановление большего числа аксонов, их миелинизацию и проводимость [Fairbairn et al, 2015], прежде всего, благодаря своей паракриной активности. Множество исследований показало, что стволовые клетки и клетки-предшественники продуцируют широкий спектр «биологически активных молекул, в т.ч. нейротрофические и проангиогенные факторы роста (NGF, BDNF, GDNF, VEGF, HGF, bFGF, SDF, IGF-1 и др.), протеазы и матриксные белки [Makridakis et al, 2013; Kalinina et al, 2015], благодаря которому они и способны стимулировать процесс регенерации поврежденной нервной ткани.

Нами было показано, что мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК), выделенные из жировой ткани» [Карагяур и др., 2017], способны стимулировать более быстрое и полное восстановление структуры и проводимости поврежденного нерва, а также восстановление функции денервированных мышц [Lopatina et al, 2011], при этом прямое сравнение терапевтической эффективности трансплантированных клеток с моноцистронной генотерапевтической конструкцией pVax1-hBDNF показало, что МСК стимулировали восстановление поврежденных нервных волокон более эффективно, чем pVax1-hBDNF, по-видимому, за счет способности

продуцировать целый спектр ростовых факторов и комплексной стимуляции процесса регенерации. В то же время, нейтрализация BDNF, GDNF или VEGF блокирующими антителами снижала нейропротективный и прорегенераторный эффект трансплантированных МСК, что указывает на то, что паракринная продукция нейротрофических факторов является одним из основных механизмов, обуславливающих их нейропротективную активность [Lopatina et al, 2011].

Генетическая модификация клеточных культур с целью увеличения продукции необходимых факторов роста может значительно повысить эффективность клеточной терапии. Так, было продемонстрировано, что инъекция МСК, гиперэкспрессирующих VEGF, в ишемизированные мышцы более эффективно препятствует некрозу мышечной ткани и способствуют ангиогенезу в модели тяжелой ишемии задней конечности мыши, чем инъекция немодифицированных МСК [Shevchenko et al, 2013]. Также было показано, что генетическая модификация шванновских, нейральных стволовых клеток или МСК с целью увеличения продукции ими нейропротективных молекул (NGF, NT-3, GDNF, CNTF, FGF-2) значительно увеличивает их нейропротективные свойства и способность стимулировать восстановление поврежденных периферических нервов [Lopatina et al, 2011; Карагяур, 2013]. Несмотря на многообещающие результаты доклинических исследований о применении клеточной терапии при повреждениях периферического нерва, данные об аналогичных проводимых в настоящее время КИ отсутствуют.

Процесс регенерации является протяженным во времени, поскольку требует пролиферации, миграции, дифференцировки клеток и формирования из них новых функциональных структур взамен утраченных. Ввиду этого для эффективной стимуляции регенеративного процесса необходимо обеспечить относительно длительную продукцию ростовых факторов и, соответственно, «длительную жизнеспособность и функционирование трансплантированных в место повреждения клеток. Известно, что введение клеток в виде суспензии

приводит к гибели 70-90% из них уже в первые дни после трансплантации [Amer et al, 2015], что подталкивает к необходимости поиска альтернативных способов их доставки в область повреждения, например, в составе самозаселяющихся или самоорганизующихся структур, основанных на природных или искусственных матриксах и заселенных клетками, в т.ч. генетически модифицированными. Такие трансплантаты способны выполнять не только функцию матрикса для лучшего выживания» [Карагяур и др., 2017] трансплантированных клеток, но и непосредственно могут направлять рост нервных волокон (служить основой для их роста), физически соединяя концы разорванного периферического нерва [Song et al, 2005; Fang et al, 2010]. Так было показано, что клеточные пласты из шванновских клеток, свернутые в трубчатую структуру, способны стимулировать восстановление нервных волокон в модели *in vivo* даже при критическом размере дефекта седалищного нерва в 15 мм [Pesirikan et al, 2013; Georgiou et al, 2013]. Благодаря продукции широкого спектра факторов роста, стимуляции нейропротекции и регенерации нервных волокон, созданию противовоспалительного микроокружения такие тканеинженерные графты могут служить прекрасной основой для разработки локальных стимуляторов/организаторов процесса регенерации в том числе в периферическом отделе НС.

Учитывая сложность структуры периферического нерва, многоэтапность и многофакторность процессов его регенерации, наиболее перспективным, по-видимому, является комбинированный подход, включающий технологии тканевой инженерии, генной и клеточной терапии, в особенности при тяжелых или обширных повреждениях нервных стволов со значительным разрывом между культями нервов. Следует отметить, что мезенхимные стромальные клетки, которые считаются одним из основных регуляторов процесса регенерации и являются относительно доступным материалом, могут служить основой для разработки перспективных лекарственных кандидатов для нейропротекции и стимуляции регенерации поврежденной нервной ткани, в т.ч. ее периферического отдела.

1.3 Существующие и перспективные подходы к медикаментозной стимуляции процессов нейропротекции и регенерации в центральном отделе нервной системы

«Среди основных существующих терапевтических подходов к купированию острых повреждений мозговой ткани можно выделить подходы, направленные на нормализацию микроциркуляции мозговой ткани (гипотензивная терапия, гемореологические препараты/тромболизис или гемостаз), предотвращение отека мозговой ткани (введение осмотических/противоотечных препаратов) и, отчасти, нейропротекцию поврежденных нейральных клеток (антиоксиданты, метаболические и седативные препараты, полипептиды коры головного мозга животных) [Басалова и др., 2023; Клинические рекомендации. Ишемический инсульт, 2022; Клинические рекомендации. Геморрагический инсульт, 2022; Yao Y et al, 2021; Li J et al, 2021].

Нормализация микроциркуляции мозговой ткани: назначение гемореологических препаратов/тромболизис или гемостаз, в зависимости от типа повреждения (ишемическое повреждение мозга или интрацеребральное кровоизлияние любого генеза) - является основой современной терапии острых повреждений мозговой ткани, поскольку позволяет купировать негативное действие повреждающего фактора на ткань мозга [Baharoglu et al, 2016; Клинические рекомендации. Ишемический инсульт, 2022; Клинические рекомендации. Геморрагический инсульт, 2022]. Существенным недостатком данного подхода является необходимость постановки дифференциального диагноза с целью установления факта кровоизлияния при повреждении: т.е., введение тромболитиков и препаратов, улучшающих микроциркуляцию, противопоказано при интрацеребральном кровоизлиянии, а гемостатическая терапия противопоказана при ишемическом повреждении мозговой ткани [Басалова и др., 2023; Клинические рекомендации. Ишемический инсульт,

2022; Клинические рекомендации. Геморрагический инсульт, 2022]. Проведение такого дифференциального диагноза требует специального оборудования и высококвалифицированного персонала (МРТ-исследование или люмбальная пункция с последующим анализом содержания крови и продуктов распада гемоглобина в ликворе). В реальных условиях клинической практически невозможно осуществить своевременную дифференциальную диагностику и введение препарата в течение небольшого терапевтического окна: 0-4.5 часа от момента развития острого повреждения мозговой ткани, что соответствует современным рекомендациям по терапии острых нарушений мозгового кровообращения [Davis et al, 2009]. Вне указанного терапевтического окна в большинстве случаев подходы, связанные с тромболизисом/гемостазом, обладают ограниченной эффективностью или даже противопоказаны: введение тромболитиков в период более 4.5 часов после возникновения ишемического повреждения головного мозга может привести к геморрагической трансформации ишемического повреждения и ухудшению клинического прогноза [Molina et al, 2001; Cantinieaux et al, 2013].

Применение осмотических и глюкокортикостероидных препаратов позволяет несколько замедлить развитие отека мозговой ткани, что снижает объем и тяжесть вторичного повреждения [Cordonnier et al, 2018]. В то же время, для глюкокортикостероидных препаратов была установлена возможность конверсии их противовоспалительной активности в провоспалительную в условиях хронического стресса и длительной кортикостероидной терапии, что может привести к индукции нейровоспаления в гиппокампе с последующим развитием ряда когнитивных нарушений (деменция) и эмоциональных расстройств (депрессия), как в эксперименте, так и в клинической практике [Gulyaeva et al, 2019; Bolshakov et al, 2021].

Нейропротекция, заявляемая, как основной механизм действия, ряда существующих препаратов (антиоксиданты, метаболические и седативные препараты, полипептиды коры головного мозга сельскохозяйственных

животных) является перспективной точкой терапевтического воздействия, поскольку позволяет защищать поврежденные нейроны от широкого спектра негативных факторов: ишемия, глутамат-опосредованная эксайтотоксичность, ферроптоз и другие формы апоптоза, действие АФК и прочие [Zoerle et al, 2017; Ghozy et al, 2022]. Несмотря на определенную эффективность, существующие препараты с предполагаемой нейропротективной активностью обладают рядом ограничений и недостатков. Так, антиоксидантные препараты (на основе цитиколина, витаминов С, Е и их аналогов), ноотропные или седативные препараты (на основе пирацетама, гамма-аминомасляной кислоты и их аналогов) активны лишь в отношении отдельных звеньев патогенеза острого повреждения мозговой ткани.

Препараты на основе полипептидов коры головного мозга животных обладают более широким спектром нейропротективной и противовоспалительной активности. Среди препаратов данной группы особенно выделяется Целлекс® (Cellex), содержащий, согласно инструкции препарата, “факторы роста и дифференцировки нервных клеток”, способный стимулировать аутофагию и тормозить развитие процессов нейровоспаления. Эффективность его применения была продемонстрирована в ряде клинических исследований, в том числе и в отсроченном периоде после повреждения нервной ткани (постинсультная реабилитация) [Басалова и др., 2023; Володеева и др, 2020; Лаврик и др, 2021]. Однако препараты данной группы также обладают рядом недостатков, и основным является использование ксеногенного источника получения действующих веществ препарата, что в ряде случаев может приводить к развитию иммунных реакций на компоненты препарата, возможной контаминации препарата прионными инфекциями и эндогенными ретровирусами свиней (PERVs) [Denner, 2021; Karagyaour et al, 2021]. Помимо этого, для такого рода препаратов характерна высокая зависимость состава и активности препарата от качества используемого биологического материала и возможность ограничения его получения в перспективе из-за возможных этических ограничений.

Таким образом, существующие терапевтические подходы и лекарственные препараты обладают рядом недостатков и ограничений, такие как, необходимость проведения дифференциальной диагностики поражений мозга с геморрагическим компонентом, узкий диапазон временного терапевтического окна, возможность развития побочных эффектов, отсутствие комплексного действия и активность в отношении лишь отдельных звеньев патогенеза, неспособность подавлять нейровоспаление и вторичное повреждение мозговой ткани (исключение, Целлекс® (Cellex)) [Басалова и др., 2023; Mayer et al, 2008; Mendelow et al, 2013; Карагяур, 2013; Yperzeele et al, 2014]. Все это подталкивает к поиску новых терапевтических подходов и разработке новых лекарственных препаратов, основанных на иных принципах.

Потенциально ряд недостатков существующих терапевтических подходов может быть скорректирован применением подходов регенеративной медицины, прежде всего, методами клеточной терапии или продуктами секреции клеточных культур. Генная терапия, как с использованием плазмидных, так и вирусных векторов, обладает невысокой эффективностью доставки *in vivo*, ограниченной емкостью (что не позволяет воздействовать на множественные мишени) и отсроченным началом терапевтической активности (>24 часов), что делает ее мало применимой для купирования и терапии острых повреждений нервной ткани [Heistad et al, 1996].

В противоположность генотерапевтическим препаратам, которые характеризуются временным лагом в реализации своей нейропротективной активности, немедленный нейропротективный эффект потенциально может быть обеспечен введением в область острого повреждения мозговой ткани рекомбинантных нейротрофических факторов (NGF, BDNF, GDNF, CNTF, и др.), что было подтверждено множеством исследований на животных моделях травматического, ишемического, теплового и др. типов острого повреждения мозговой ткани [Wang et al, 2002; Chen et al, 2013; Fantacci et al, 2013; Liu et al, 2020]. В то же время монотерапия повреждений нервной ткани с использованием очищенных нейротрофинов сопряжена с рядом ограничений

(кратковременность терапевтического эффекта, возможность воздействовать только на часть звеньев патогенеза, вероятность создания токсических концентраций нейротрофинов при локальном введении и их неспособность проникать через ГЭБ при системном введении, высокая стоимость рекомбинантных очищенных нейротрофинов и пр.) и не нашла широкого применения [Allen et al, 2013; Claes et al, 2019].

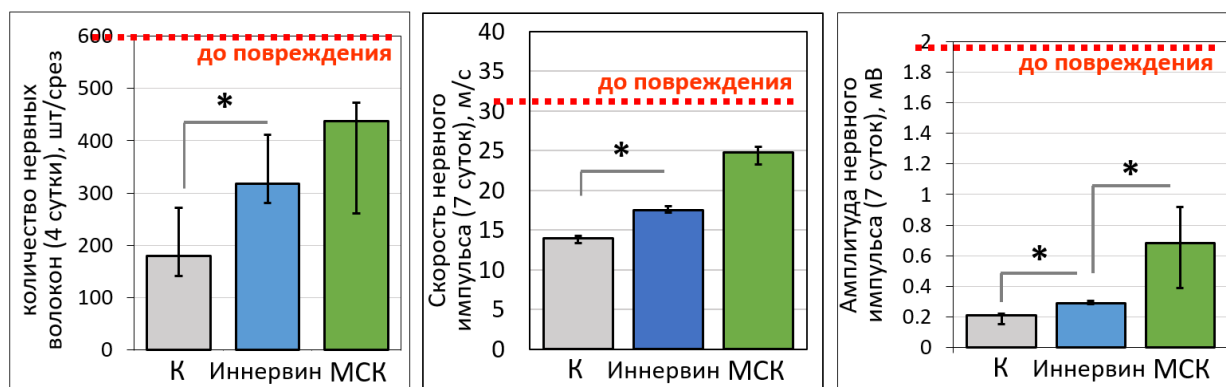


Рисунок 1.7 - Прямое сравнение нейропротективной и прорегенераторной активности моноцистронной генотерапевтической конструкции рVax1-hBDNF (Иннервин) и МСК человека в модели травмы периферического нерва мыши. Видно, что МСК стимулируют более полное восстановление структуры и функции поврежденного периферического нерва, чем Иннервин, по-видимому, за счет продукции комбинаций функционально комплементарных нейропротективных молекул и молекулярных комплексов.

* - $p < 0.05$; $n > 19$ (ANOVA по рангам, критерий Данна); данные представлены в виде медиана (25% и 75%).

В противоположность монотерапии нейротрофическими факторами применение комбинаций молекул, способных подавлять повреждение, стимулировать процессы нейропротекции и регенерации, а также функционально дополнять друг друга, представляется более перспективным (Рисунок 1.7), особенно, если принять во внимание тот факт, что процесс повреждения и регенерации нервной ткани является многоэтапным, многофакторным и развернутым во времени [McGinn et al, 2016; Marklund et al, 2019]. Такие полипотентные комбинации/перспективные лекарственные препараты могут быть разработаны на основе высокоочищенных

рекомбинантных белков, мультимолекулярных композиций, продуцируемых клеточными культурами или самих клеток-продуцентов [Карагяур, 2013; Chrostek et al, 2019]. На данный момент накоплено большое количество экспериментальных данных в доклинических и клинических исследованиях свидетельствующих об эффективности клеточных препаратов для купирования острых повреждений мозговой ткани. Основными типами клеток, которые рассматриваются в качестве перспективных для разработки такого типа лекарственных средств являются нейральные стволовые клетки (НСК), индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК), гематопозитические стволовые клетки (ГСК), клетки микроглии и мезенхимные стромальные клетки (МСК) [Chrostek et al, 2019; Bonilla et al, 2021].

Ряд терапевтических подходов предполагает трансплантацию названных типов клеток с тем, чтобы они могли дифференцироваться в нейроны и глиальные клетки или стимулировали регенерацию через продукцию трофических факторов [Andres et al, 2011; Калинина и др, 2019].

Несмотря на кажущуюся перспективность данный подход имеет ряд серьезных ограничений: трансплантация клеток непосредственно в мозг может вызывать у пациентов судороги и субдуральные кровоизлияния [Kondziolka et al, 2005], а внутривенное введение снижает эффективность их доставки в мозг и сопряжено с риском эмболии [Lee et al, 2009]. Вне зависимости от типа введения большая часть трансплантированных клеток погибает [George et al, 2018] и не достигает области поражения [Borlongan et al, 2004], они способны вызывать иммунную реакцию у реципиента (при использовании аллогенных клеток [High et al, 2019]) и обладают потенциальными опухоленными свойствами (в особенности, иПСК и НСК) [Ghaderi et al, 2018]. Помимо этого, дифференцировка трансплантированных клеток в нейроны или клетки глии не является гарантией их структурной и функциональной интеграции в существующие нейронные связи [Zhang S et al, 2020], а в ряде случаев может приводить к ухудшению состояния пациента.

Так было показано, что трансплантация графтов серотонинергических и дофаминергических нейронов крысам с моделью болезни Паркинсона не только не приводила к компенсации неврологических дефицитов, но, напротив, усугубляла дискинезию, по-видимому, из-за неоптимального соотношения серотонинергических и дофаминергических нейронов в трансплантированных графтах [Gutiérrez-Fernández et al, 2011]. Дополнительными препятствиями широкого распространения клеточной терапии являются сложность получения необходимых клеток (НСК, клетки микроглии), сложность хранения и транспортировки клеточных препаратов [Matthay et al, 2019], а также практическая невозможность применять аутологичные клетки для терапии острых повреждений головного мозга [Lalu et al, 2020].

Изучение механизмов терапевтической активности трансплантированных клеток позволило установить, что одним из ключевых является стимуляция процессов регенерации под действием веществ, секретируемых трансплантированными клетками [Chen et al, 2008; Onda et al, 2008; Xin et al, 2013]. Блокирование круциальных факторов роста может привести к снижению или даже нейтрализации терапевтической активности таких клеток. На основании этих фактов было высказано предположение, что совокупность секретируемых клеткой молекул (т.н., секретом) может действовать даже в отсутствие клеток, что и было подтверждено экспериментально [Chen B et al, 2009; Sakata et al, 2012]. Таким образом, нейропротекция и регенерация мозговой ткани могут быть стимулированы продуктами секреции клеточной линии [Borlongan et al, 2004; Lee et al, 2009; Chen B et al, 2009; Sakata et al, 2012], при этом важными критериями выбора такой линии являются ее доступность и стабильность. По совокупности признаков одним из идеальных кандидатов на разработку такой терапии являются мезенхимные стромальные клетки (МСК)» [Басалова и др., 2023].

Мезенхимные стромальные клетки координируют процессы регенерации поврежденной нервной ткани через продукцию нейропротективных и про-регенераторных молекул

Мезенхимные стромальные клетки входят в состав стромально-сосудистого компартмента практически всех органов и тканей и, согласно современным представлениям, являются важными участниками и регуляторами процессов обновления и регенерации органов и тканей [Sagaradze et al, 2020]. Более того, будучи трансплантированными в область повреждения они способствуют более быстрой и полноценной регенерации поврежденной ткани. Так, в целом ряде экспериментальных моделей острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) было продемонстрировано, что МСК обладают выраженным терапевтическим потенциалом, как в остром, так и хроническом периоде повреждения [Zhang Q et al, 2017; Mu et al, 2019; Andrzejewska et al, 2021]. Будучи введенными в организм экспериментальных животных, внутривенно или непосредственно в мозг, МСК мигрируют в поврежденные участки мозга [Kurtz, 2008] и купируют прогрессирование острой фазы повреждения через предотвращение клеточной гибели [Sun et al, 2013; Han et al, 2016], стабилизацию ГЭБ [Sun et al, 2013; Namioka et al, 2018] и подавление воспалительных процессов в подостром периоде [Li W et al, 2021]. В хроническом периоде повреждения МСК способны стимулировать регенерацию ткани через стимуляцию ангиогенеза и реваскуляризацию регенерирующей ткани [Li W et al, 2021], активацию процессов дифференцировки НСК [Zhang J et al, 2004], а также стимуляцию восстановления поврежденных нейритов и синапсов (Рисунок 1.8) [Li W et al, 2021]. В результате это приводит к увеличению частоты выживания экспериментальных животных, уменьшению объема повреждения мозговой ткани и уменьшению тяжести неврологических нарушений [Horita et al, 2006; Karagyaour et al, 2021; Pischitta et al, 2021].

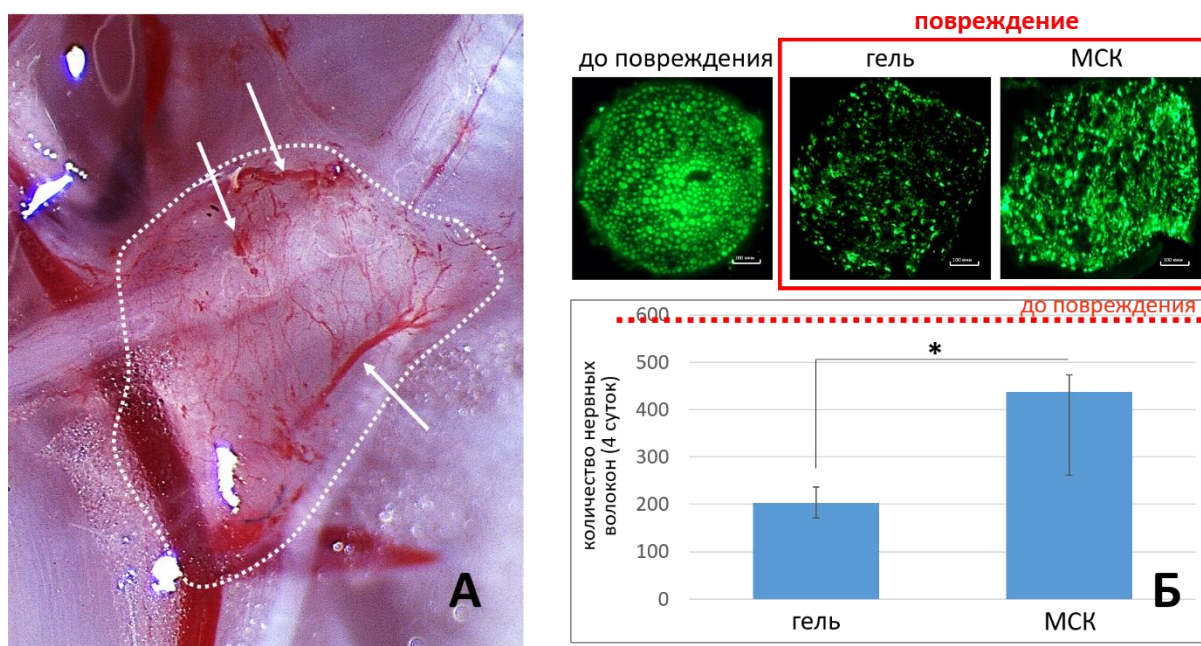


Рисунок 1.8 - Примеры успешной стимуляции ангиогенеза (А) и нейритогенеза (Б) с использованием МСК. А: пунктирной линией обведена область аппликации МСК жировой ткани человека в GFR Matrigel (гель) в подколенную ямку мыши, стрелками обозначены проросшие в Matrigel кровеносные сосуды мыши. Б: зеленая флуоресценция- антитела к белку промежуточных филаментов аксонов NF200, * - $p < 0.05$; $n = 9$ (ANOVA по рангам, критерий Данна); данные представлены в виде медиана (25%; 75%).

Терапия повреждений нервной ткани с использованием МСК успешно применяется в республике Беларусь. К примеру, была разработана инструкция (#242-1218 от 2018 г.) по лечению инсульта введением аутологичных МСК, выделенных из жировой ткани, под слизистую полости носа на стороне инсульта (в первый месяц после ОНМК) [Шанько и др, 2018].

Несмотря на то, что существуют данные о способности МСК дифференцироваться в нейроноподобные, астроцитоподобные или олигодендроцитоподобные клетки в условиях *in vitro* [Калинина и др, 2019; Andrzejewska et al, 2021; Li W et al, 2021], наиболее вероятным механизмом их терапевтической активности в ЦНС считают их способность к продукции широкого спектра биологически активных веществ (цитокины, хемокины, факторы роста, кодирующие и регуляторные РНК) и молекулярных комплексов (экзосомы и др.) [Borlongan et al, 2004; Lee et al, 2009; Chen B et al,

2009; Sakata et al, 2012]. Именно такой широкий спектр продуцируемых молекул и/или их комплексов обеспечивает МСК способность стимулировать, регулировать и координировать различные этапы процесса регенерации в остром, подостром и хроническом периодах повреждения мозговой ткани. МСК обладают сниженной иммуногенностью и могут быть выделены из широкого спектра органов и тканей, в т.ч. из подкожной жировой ткани, пуповинной крови, молока, менструальной крови, пульпы зуба и пр. Такая выраженная способность стимулировать регенеративные процессы и доступность делает МСК практически незаменимыми для решения множества задач регенеративной медицины [Калинина и др, 2019; Andrzejewska et al, 2021].

Несмотря на большой потенциал широкомасштабное практическое применение МСК в регенеративной медицине также имеет ряд ограничений. К основным можно отнести относительно невысокий пролиферативный потенциал МСК, гетерогенность их свойств в зависимости от индивидуальных особенностей донора и типа ткани-источника МСК, а также выявленный недавно тропизм МСК к опухолевым очагам [Ho et al, 2013].

Поскольку терапевтическая активность МСК, как и большинства других БМКП, в основном обусловлена их паракриной активностью, это дает возможность заместить клеточные препараты более безопасными и стабильными препаратами на основе продуктов секреции таких клеток. Опыт применения бесклеточных препаратов для нейропротекции мозга, их сильные и слабые стороны будут рассмотрены далее.

Перспективы и ограничения применения бесклеточных препаратов для стимуляции восстановления мозговой ткани

Как было отмечено выше, патогенез острых повреждений мозговой ткани является многокомпонентным и включает целый ряд повреждающих факторов и патогенетических механизмов, что делает терапию, направленную на один патогенетический механизм, малоэффективной и требует комплексного

подхода при разработке перспективных терапевтических средств [Sorby-Adams et al, 2017; Sifat et al, 2017; Bernardo-Castro et al, 2020; Andrzejewska et al, 2021]. Содержащиеся в секрете МСК и ряда других клеточных линий факторы роста, цитокины и регуляторные РНК обладают нейропротективной, ангиогенной и противовоспалительной активностью и, как раз способны комплексно купировать повреждение и запускать регенеративные процессы [Lopatina et al, 2011; Kalinina et al, 2015]. Это позволяет рассматривать секретом клеточных культур, как перспективный препарат, обладающий комплексной терапевтической активностью.

Благодаря таким уникальным свойствам секретом было предложено использовать в качестве потенциального терапевтического средства при острых и хронических повреждениях нервной системы, как функциональных, так и органических [Патент ЕС 2379089В1/19.12.2009; Патент РФ на изобретение №2620167/ 21.12.2015; Патент РФ на изобретение №2637407/ 01.06.2016; Патент США 20180071342А1/12.09.2017; Hasan et al, 2017; Патент РФ на изобретение №2742034/ 04.10.2018; Cunningham et al, 2020]. В наших исследованиях также было установлено, что секретом МСК жировой ткани стимулирует выживаемость экспериментальных животных, снижает тяжесть неврологических нарушений и уменьшает объем повреждения головного мозга в модели интрацеребрального кровоизлияния (модель геморрагического инсульта) [Karaguyaur et al, 2021]. Было показано, что секретом МСК сохраняет свою терапевтическую активность, как при локальном введении в область повреждения, так и интраназальном и внутривенном при введении, причем ключевыми механизмами его активности являются прямая нейропротективная и противовоспалительная активность [Dzhauari et al, 2023].

Полученные результаты в совокупности с ранее опубликованными данными [Cunningham et al, 2018; Pischiutta et al, 2021; Efimenko et al, 2021], позволяют предположить, что секретом МСК проявляет свою терапевтическую активность при широком спектре острых повреждений головного мозга, включая ишемический и геморрагический инсульты,

энцефалопатии, цереброваскулярные расстройства, черепно-мозговую травму и другие патологии, характеризующиеся наличием сходных патогенетических механизмов. Это позволяет рассматривать секретом (в частности, секретом МСК) как препарат первого выбора (скорпомощной препарат) для терапии широкого спектра острых повреждений головного мозга вне зависимости от их этиологии и еще до момента постановки дифференциального диагноза (что важно при ОНМК), т.е., возможно, даже в рамках временного терапевтического окна в острой фазе повреждения (в первые 6-12 часов после повреждения), что дополнительным образом должно сказаться на увеличении нейропротективной активности секретома.

Как и любой терапевтический подход, применение секретома имеет свои преимущества и недостатки. К преимуществам можно отнести комплексный состав и способность действовать на различные звенья патогенеза, относительно высокая стабильность компонентов секретома и способность некоторых из них проникать через ГЭБ [Tayler et al, 2021]. Основным недостатком разработки и применения препаратов на основе секретома является гетерогенность его качественного и количественного состава, который в высокой степени зависит от типа клеток, возраста, состояния здоровья и индивидуальных особенностей донора, условий культивирования и может сильно варьировать в зависимости от этих параметров [Efimenko et al, 2011; Petrenko et al, 2020]. На это накладывается постоянный поиск донорского материала, необходимость характеристики и оценка микробиологической чистоты каждой новой линии клеток-продуцентов. Помимо этого, в состав секретома входят факторы, обладающие антагонистической активностью, что может значительно снижать его терапевтическую активность. Все это критическим образом осложняет разработку и стандартизацию препаратов на основе секретома.

Одним из перспективных подходов, который позволяет преодолеть такие ограничения, как ограниченная доступность донорского материала, гетерогенность свойств МСК от донора к донору [Cui et al, 2019; Li W et al,

2021], необходимость оценки микробиологической чистоты и терапевтической активности каждого из образцов [Alegre et al, 2014; Xiong et al, 2022], является иммортализация культур МСК с целью замедления их клеточного старения и увеличения пролиферативного потенциала. Использование таких линий МСК позволит масштабировать получение секретома с относительно стабильным составом, что приведет к снижению себестоимости, увеличению эффективности и доступности регенеративных технологий, в особенности при острых повреждениях мозговой ткани.

Что касается клинических исследований терапевтической активности секретома при острых повреждениях головного мозга, то в открытом доступе (<https://www.clinicaltrials.gov>) удалось найти лишь одно активное исследование “Комбинация кондиционированной среды и мезенхимных стромальных клеток пуповинной крови при остром ишемическом инсульте” [ClinicalTrials.gov, #NCT05008588]. Впрочем, по мере развития данного направления и преодоления существующих ограничений, количество клинических исследований в этой области будет неизбежно стремительно расти.

1.6 Заключение по обзору

Повреждения нервной ткани являются актуальной и во многом нерешенной проблемой современной неврологии и нейрохирургии. Это, с одной стороны, обусловлено сложностью устройства нервной системы, ограниченностью ее эндогенного регенераторного потенциала и отсутствием действенных терапевтических подходов, направленных на нейропротекцию поврежденной нервной ткани. В то же время, последние достижения регенеративной биомедицины позволяют предположить, что создание и применение таких терапевтических подходов является вопросом ближайшего будущего.

На основании приведенных данных о сложности архитектоники нервной ткани и временной протяженности патогенеза ее повреждения, можно сделать

предположение о том, что нейропротекция (прямая и непрямая) является ключевой "точкой приложения" для улучшения эффективности терапии повреждений нервной ткани, как центрального, так и периферического ее отделов (несмотря на существующие различия в механизмах их повреждения и регенерации). Эндогенная нейропротекция осуществляется за счет эндогенной продукции нейротрофических факторов сателлитными клетками и органами-мишенями. При повреждении нервной ткани экспрессии эндогенных нейротрофических и нейропротективных молекул недостаточно, однако, их недостаток может быть компенсирован их экзогенным введением, как в виде рекомбинантных белков или содержащих их композиций, так и кодирующих их генов.

Для более эффективной стимуляции процессов регенерации необходимо обеспечить сочетанное воздействие на ее ключевые звенья, такие как выживаемость клеток в области повреждения, локальная иммуносупрессия, стимуляция пролиферации, миграции и дифференцировки стволовых клеток и клеток-предшественников, стимуляция ангиогенеза и реиннервации восстановившейся ткани, что невозможно осуществить с помощью монокомпонентной терапии, но лишь с помощью композиций, состоящих из функционально комплиментарных и плеiotропных и по своему действию биологически активных молекул. Поиск таких композиций и изучение их нейропротективных и прорегенераторных свойств в зависимости от состава и соотношения компонентов, способа и времени доставки, дозы и пр. является одной из основных задач нейрофармакологии и регенеративной биомедицины.

В данной работе нами проведено изучение нейропротективных и прорегенераторных свойств комбинации функционально комплиментарных молекул мозгового нейротрофического фактора (BDNF), обеспечивающего прямую нейропротекцию широкого спектра нейронов и рост их нейритов, и урокиназного активатора плазминогена (uPA), обеспечивающего фибринолиз, «созревание BDNF и других факторов роста, направленный протеолиз внеклеточного матрикса и ангиогенез, при острых повреждениях центральной

и периферической нервной системы. Данная комбинация нейротрофического фактора и протеазы (в виде генетической конструкции, рекомбинантных белков или их композиции (секретом нативных или генетически модифицированных МСК)) для стимуляции нейропротекции и регенерации в нервной ткани является оригинальной, предложена» [Dzhauari et al, 2022] и исследуется впервые.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Реактивы

В исследовании использовали следующие реактивы: реактивы для работы с клеточными культурами: среда Игла, модифицированная Дульбекко (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (Gibco, #11965092), среда DMEM/F12 (Gibco, #11320033), среда Игла, модифицированная Дульбекко (DMEM) с низким содержанием глюкозы (Gibco, #31885049), среда RPMI 1640 (Gibco, #21875034), Advance Stem Cell Basal Medium (HyClone, #SH30879.02), Advance Stem Cell Growth Supplement (HyClone, #SH30878.01), среда X-VIVO™ 15 (Lonza, #BE02-060F), фетальная бычья сыворотка (FBS) (ThermoFisher Scientific, #26140079), смесь антибиотика/антимикотика (Gibco, #15240062), раствор L-Gln (Gibco, #11539876), GlutaMAX™ Supplement (Gibco, #35050061), Пируват натрия (ПанЭко, #Ф023), раствор пенициллина-стрептомицина 100 Ед/мл (Gibco, #15240062), DPBS (ПанЭко, #P060п), Фиколл (ПанЭко, #P050), раствор Хенкса (ПанЭко, #P020П), раствор Версена (ПанЭко, #P080п), раствор Трипсина-ЭДТА (ПанЭко, #П034), бычий сывороточный альбумин (Panreac, #A0850,0050), Lipofectamine2000 (ThermoFisher Scientific, #11668019), Polyethylenimine, Linear, MW 25000 (Polysciences, Inc., США, #23966-1), IncuCyte® Caspase-3/7 (Essen Bioscience, #4440, США), пуромицин (ThermoFisher Scientific, #A1113803).

Для молекулярно-биологических работ использовали реактивы: pVax1 (ThermoFisher Scientific, #V26020), pAAV-EF1a-tdTomato-WPRE-pGHpA (Addgene #67527), pRSV-Rev (Addgene, #12253), pMDLg/pRRE (Addgene, #12251), pMD2.G (Addgene, #12259), NheI (NEB, #R0131), HindIII (NEB, #R0104S), Acc65I (NEB, #R0599S), EagI (NEB, #R0505), EcoRI (NEB, #R0101S), SalI (NEB, #R0138S), KpnI (NEB, #R0142), Phusion High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer (ThermoFisher Scientific, #F532S), протеиназа К (Sigma-Aldrich, #P6556), фенол (Sigma-Aldrich, #P1037), хлороформ (Компонент-Реактив, #3841.1000), 2-пропанол (Appllichem, #A3928,2500PE), агароза (Panreac, #A2114,0250), TRIzol™ Reagent (ThermoFisher Scientific,

США, #15596026), Oligo(dT)15 праймер (Евроген, Россия, #SB001), наборы Direct-zol RNA Miniprep (Zymo Research, США, #R2052), MMLV RT (Евроген, Россия, #SK021), 5X qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия, #PK147L), наборы для ПЦР в реальном времени: Telomerase Activity Quantification qPCR Assay Kit (Sciencell, США, #8928), Relative Human Telomere Length Quantification qPCR Assay Kit (Sciencell, США, #8908)

В работе использованы химические реактивы и реактивы для Вестерн-блоттинга: NaCl (H-1418-1.0, Helicon, Россия), KCl (Panreac, #191494.1211), CaCl₂ (ОАО "Дальхимфарм", Россия), MgCl₂ (ОАО "УФАВИТА", Россия), NaH₂PO₄ (Am-0823-0.5, Helicon, Россия), NaHCO₃ (X022, ПанЭко, Россия), D-глюкоза (Acros Organics, #170080010), формальдегид (Merck, #F8775), L-глутамат (Sigma-Aldrich, #G1376), метилметансульфонат (Sigma-Aldrich, #129925), фосфатно-солевой буфер таблетках (ЭКОсервис, #B-60201), ЭДТА-Na₂ (Sigma-Aldrich, #D2900000), ДМСО (Applichem, #A3672), Tris (Amresco, #0497-5KG), Тритон X-100 (Sigma-Aldrich, #T8787), NaOH (Sigma-Aldrich, #S5881), NaNO₂ (Merck, #237213), диметилсульфат (Merck, #320293), SYBR Green I (Sigma-Aldrich, #S9430), додецилсульфат натрия (Panreac, #132363.1211), коктейль ингибиторов протеаз (Promega, #G6521), RapiGest (Waters, #186001861), трис-карбоксииэтилфосфин (Sigma-Aldrich, #C4706-10G), метиметантиосульфат (Sigma-Aldrich, #64306), трипсин (ПанЭко, №9002-07-7), PVDF-мембрана Immobilon-P (Millipore, #IPVH00010), обезжиренное сухое молоко (Applichem, #A0830,0500), Tween 20 (Merck, США, #P1379-100ML), PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (ThermoFisher Scientific, #26616), Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad, США, #1705060).

В исследовании использованы нативные и рекомбинантные белки: мозговой нейротрофический фактор человека BDNF (#ab206642-2, Abcam, США), колониестимулирующий фактор макрофагов человека (GM-CSF) (SciStore, #PSG030-10), IFN γ человека (R&D Systems, #285-IF-100/CF), липополисахарид (10 нг/мл) (SigmaAldrich, #297-473-0), IL-4 человека (R&D

Systems, #204-IL-010/CF) (20 нг/мл), TGF β человека (Peprotech, #100-21) (20 нг/мл), в том числе антитела: неспецифические овечьи иммуноглобулины класса G (ThermoFisher Scientific, США, #31243), нейтрализующие антитела к BDNF - Anti-Brain Derived Neurotrophic Factor Antibody (Merck, США, #AB1513P), первичные кроличьи антитела к белку промежуточных нейрофиламентов NF200 («Sigma», #N4142), флуоресцентно меченные вторичные козы антикроличьи антитела (Invitrogen, #A11034, США), антитела к CD68 (Abcam, #ab125212, США), антитела к CD163 (Abcam, #ab182422, США), антитела к CD80 (BD, #566992), антитела к CD86 (BD, #555660), антитела к CD206 (BioLegend, #141720), антитела к CD209 (BioLegend, #343006), флуоресцентно меченные вторичные антитела коза-против-кролика (Invitrogen, #A11034, США), Anti-Telomerase reverse transcriptase antibody [2C4] (Abcam, США, #ab5181), alpha Tubulin Antibody (B-5-1-2) (Santa Cruz, США, #sc-23948), вторичные антитела кролик-против-мышь, меченные пероксидазой хрена, Р-РАМ Iss (Имтек, Россия), а также реактивы для иммуноцитологических и иммуногистологических методов: Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura Finetek, #SA62550-01), 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI) (Sigma, #MBD0015-10ML, США), а также наборы ИФА: MSC Phenotyping Cocktail Kit, anti-human, REAfinity (Miltenyi Biotec, США, #130-125-285), Human Free BDNF Quantikine ELISA Kit (R&D, #DBD00), Human uPA ELISA Kit (URK) (Abcam, #ab119611), Human VEGF Quantikine ELISA Kit (R&D, #DVE00), Human HGF Quantikine ELISA Kit (R&D, #DHG00), Human IL-6 Quantikine ELISA Kit (R&D, #D6050), Human Serpin E1/PAI-1 Quantikine ELISA Kit (R&D, #DSE100), Human CCL2/MCP-1 Quantikine ELISA Kit (R&D, #DCP00), Lenti-X™ p24 Rapid Titer Kit (Takara Bio, #632200).

Для работы с животными были использованы: 2,2,2-трибромэтанол (Merck, #T48402), изобутиловый спирт (Merck, #240486-100ML), Zoletil® 50 (VirBac, Испания), ксилазин (InterChemie, Нидерланды), ингибитор uPA человека BC 11 hydrobromide (TOCRIS, США, #4372), Цианокобаламин

(витамин В12), раствор для инъекций 0.5 мг/мл (ОАО "Дальхимфарм", Россия), физиологический раствор (ООО "Гротекс", Россия), Церебролизин (Everpharma, серия #C2VB1A, срок годности - 03.2025).

В работе были использованы расходники: Centriprep Centrifugal Filter Unit (Millipore, #4302, USA), HLB Oasis (Waters, #WAT106202), Bead ruptor 4 (Omni, #25-010), клеточное сито Falcon® 40 µm Cell Strainer (Corning, США, #352340), полипропиленовые пробирки объемом 200 мкл - 50 мл, культуральные чашки 60 мм и 100 мм, чашки Петри 100 мм, наконечники для пипеток (с фильтрами и без) 10 мкл - 5 мл, серологические пипетки 2 мл - 50 мл.

2.2 Клеточные культуры

В работе использовали следующие культуры клеток: HEK293T (АТСС, #CRL-3216™) - для наработки рекомбинантных белков и сборки лентивирусных частиц, Neuro2a (АТСС, #CCL-131™) и SH-SY5Y (АТСС, #CRL-2266™) - для тестирования биологической активности рекомбинантных белков и секретома МСК, первично выделенные мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) человека и крысы - для наработки секретома и генетической модификации, первично выделенные МСК человека - для получения кДНК мозгового нейротрофического фактора (Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF) и урокиназного активатора плазминогена (urokinase-type Plasminogen activator, uPA), первично выделенные фибробласты дермы человека для оценки потенциальной трансформирующей активности секретома МСК (soft agar colony formation assay, оценки трансформирующей активности секретома МСК на уровне транскрипта целевых клеток) и оценки эффекта клеточного старения на секреторную активность МСК (активация сигнального каскада NF-κB), первично выделенные клетки моноцитарно-макрофагальной фракции (ММФ) периферической крови человека - для оценки иммуномодулирующей активности секретома МСК в моделях in vitro.

Культуры клеток HEK293T, Neuro2a и первично выделенные фибробласты дермы человека культивировали на среде Игла, модифицированной Дульбекко «(DMEM), с высоким содержанием глюкозы (Gibco, #11965092), SH-SY5Y - в среде DMEM/F12 (Gibco, #11320033), крысиные МСК - в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM), с низким содержанием глюкозы (Gibco, #31885049), клетки ММФ - в среде RPMI 1640 (Gibco, #21875034). В качестве добавок к указанным выше средам использовали 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (ThermoFisher Scientific, #26140079), 1x смесь антибиотика/антимикотика (Gibco, #15240062) и при необходимости 1x L-Gln (Gibco, #11539876).

Для наработки лентивирусных частиц использовали среду культивирования DMEM с высоким содержанием глюкозы (Gibco, #11965092), содержащую 2% инактивированной бычьей сыворотки (FBS) (ThermoFisher Scientific, #26140079), 1x смесь антибиотика/антимикотика (Gibco, #15240062)» [Dzhauari et al, 2022] и при необходимости 1x L-Gln (Gibco, #11539876).

Клетки ММФ выделяли из периферической крови человека. Для этого 20 мл венозной крови смешивали с «200 мкл 0.5М раствора ЭДТА*К2 (антикоагулянт) и центрифугировали при 400g в течение 10 минут для того, чтобы отделить форменные элементы крови от плазмы. Плазму отбирали, а к осадку клеток добавляли эквивалентный объем DPBS (ПанЭко, #P060п). Суспензию форменных элементов крови в DPBS наслаивали на раствор фикола (ПанЭко, #P050) с удельной плотностью 1.077 г/мл и затем центрифугировали при 400g в течение 30 минут без активного торможения. На границе разделения фаз фикола и DPBS собирали слой мононуклеаров, их отмывали два раза DPBS, осаждали центрифугированием и ресуспендировали в среде роста» [Джауари, 2024].

«Крысиные МСК из жировой ткани получали от половозрелых самцов крыс линии Вистар (см. раздел 2.3) в соответствии с ранее описанным протоколом» [Джауари, 2024; Aleksandrushkina et al, 2019]. МСК человека

получали из биобанка Института регенеративной медицины МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова (<https://human.depo.msu.ru>) и культивировали в среде Advance Stem Cell Basal Medium (HyClone, #SH30879.02), содержащей 10% добавки Advance Stem Cell Growth Supplement (HyClone, #SH30878.01) и смеси антибиотика/антимикотика (Gibco, США, #15240062). Все процедуры с образцами тканей пациентов проводились в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрены Этическим комитетом МГУ им. М.В. Ломоносова (#IRB00010587), протокол №4 (2018 г). Полученные МСК «характеризовали, как клетки, способные адгезировать к пластику, экспрессировать CD73, CD90 и CD105, и лишённые экспрессии гематопоэтических и эндотелиальных маркеров CD14, CD19, CD20, CD34, CD45 и HLA-DR, а также способные к дифференцировке *in vitro* в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях, что соответствует критериям, установленным Международным обществом клеточной терапии (ISCT) [Dominici et al, 2006; Viswanathan et al, 2019]. Все эксперименты с первично выделенными МСК проводили в течение 5-7 пассажей» [Джауари, 2024], а с генетически модифицированными до 44 пассажа. Все перечисленные культуры клеток культивировали при 37 °C и 5% CO₂ в инкубаторе Binder CB150 (BINDER GmbH, Германия). Среду культивирования меняли каждые 3–4 суток.

2.3 Животные

Тестирование биологической активности бицистронной генетической конструкции pNCure, кодирующей BDNF и uPA, исследование ее диссеминации, а также изучение ее мутагенности с прогнозом канцерогенности осуществляли на самцах мышей F1 CBA/C57Bl в возрасте 8-12 недель (массой 20-27 г), полученных из SPF вивария ФФМ МГУ. Оценку подострой токсичности бицистронной генетической конструкции, кодирующей BDNF и uPA, оценку биологической активности комбинации рекомбинантных белков BDNF и uPA, а также секрета первично выделенных и генетически модифицированных МСК, содержащего BDNF и

uPA, в модели интрацеребральной посттравматической гематомы проводили на самцах крыс популяции Вистар в возрасте 3-3.5 месяцев (массой 280-340 г) и 9-10 месяцев (массой 450-550 г), полученных из питомника лабораторных животных "Пушино". Потенциальный генотоксический эффект pNCure оценивали на линиях дрозофил line_1 (y1, sn3+ /y1, sn3+ генотип) и line_2 (y1+, sn3/y1+, sn3 генотип), полученных из генетической коллекции Института биологии гена. Животных содержали и использовали в эксперименте в полном соответствии с Директивой 2010/63/ЕС [Directive 2010/63/EU (20.10.2010)] и рекомендациями Комитета по биоэтике МГУ им. М.В. Ломоносова (разрешения №3.4 от 21 марта 2021 г. и №3.5 от 17 марта 2022 г.).

2.4 Конструирование бицистронной генетической конструкции, кодирующей мозговой нейротрофический фактор (BDNF) и урокиназный активатор плазминогена (uPA) человека

«Ранее было показано, что секретом МСК человека способен препятствовать гибели нервных волокон периферического нерва после травмы и стимулирует его регенерацию» [Карагяур, 2013]. «Подавление активности отдельных факторов роста с помощью блокирующих антител показало, что одной из ключевых молекул, обуславливающих наблюдаемое нейропротективное действие секрета МСК, является мозговой нейротрофический фактор (BDNF)» [Карагяур, 2013]. Результаты данного исследования были подтверждены разработкой и изучением биологической активности генетической конструкции, кодирующей BDNF - pVax1-hBDNF [Karagyaur et al, 2015]. Введение BDNF в виде плазмидной генетической конструкции (а не в виде белка) было предложено с целью обеспечения продолжительной экспрессии BDNF, ввиду того, что процесс регенерации нервной системы является растянутым во времени и требует длительной экспрессии нейротрофических факторов. Помимо этого, генетическая конструкция pVax1-hBDNF, введенная в мышцу, обеспечивала постепенное высвобождение BDNF и создавала градиент его экспрессии (увеличение

концентрации BDNF по мере приближения к мышце), подобно тому, что происходит в окружении денервированной мышцы при травме.

Однако, оказалось, что нейропротективная активность pVax1-hBDNF значительно уступает по своей силе действию секрета МСК [Lopatina et al, 2011; Karagyaur et al, 2015]. «Предположительно это связано с тем, что секретом содержит не только BDNF, но и молекулы других модальностей (проангиогенные факторы, противовоспалительные и антиапоптотические молекулы и др.)» [Карагяур, 2013]. Было предложено дополнить активность BDNF другой молекулой, которая обладает принципиально другими мишенями и механизмом действия. При анализе секрета МСК особое внимание привлек урокиназный активатор плазминогена. Это связано с его способностью активировать противосвертывающую систему крови (фибрин является мощным ингибитором роста нервных волокон в центральной и периферической нервной системе), запускать протеолиз внеклеточного матрикса и активацию факторов роста, стимулировать ангиогенез, участвовать в навигации и прорастании нервных волокон, стимулировать мезенхимальный переход шванновских клеток и эндотелиоцитов, что является неотъемлемой частью процессов регенерации. Более того, целый ряд исследований подтверждают важность компонентов системы урокиназного активатора «плазминогена в развитии и функционировании центральной и периферической нервной ткани. Так, активация экспрессии генов uPA, его рецептора uPAR, ингибитора uPA PAI-1 является» [Карагяур, 2013] одной из первых в ответ на повреждение или изменение состояния (обучение) центральной и периферической нервной системы [Шмакова и др, 2021; Shmakova et al, 2021].

Для изучения нейропротективной активности комбинации BDNF и uPA в моделях повреждения и продолжительной регенерации центральной и периферической нервной системы был разработан бицистронный плазмидный вектор, кодирующий кДНК BDNF и uPA человека. В качестве основы для создания «плазмиды использовали вектор pVax1m, полученный путем

введения энхансерной последовательности вируса SV40 между промотором и энхансером CMV в векторе pVax1 (ThermoFisher Scientific, #V26020) для увеличения захвата плазмиды ядром клетки» [Karagyaur et al, 2020; Dean et al, 1999]. кДНК BDNF и uPA были получены методом обратной транскрипции тотальной РНК, выделенной из первично выделенных МСК жировой ткани человека, как это описано в разделах 2.2 и 2.9 (последовательности праймеров приведены в Таблице 1 Приложения). Ампликон кДНК BDNF, содержащий также на 5' конце консенсусную Kozak-последовательность (GCCACC), встраивали в вектор pVax1m после промотора CMV по сайтам рестрикции NheI и HindIII [Kozak, 1984]. кДНК uPA клонировали по сайтам рестрикции Acc65I и EagI, а между кДНК BDNF и кДНК uPA по сайтам рестрикции HindIII и Acc65I встраивали последовательность IRES HCV [Lukavsky, 2009], собранную из синтетических олигонуклеотидов. Согласно исследованию R. Jubin [Jubin et al., 2000], IRES HCV обеспечивает в 10 раз меньшую продукцию второго белка (в данном случае, uPA), чем первого белка (BDNF), в составе бицистронной конструкции. Каждая кДНК несет свои собственные стартовый и стоп-кодоны (стартовый кодон для uPA встроен в IRES HCV). Такая последовательность генов факторов роста/цитокинов в структуре бицистронной генетической конструкции объясняется тем, что, согласно литературным данным, нейротрофические факторы являются основными нейропротекторами и стимуляторами процессов регенерации поврежденной нервной ткани [Siconolfi et al, 2001; Boyd et al, 2003; Гомазков, 2006; Карагяур, 2013], а также возможным токсическим действием uPA в случае его гиперпродукции [Koziol et al, 1975; Unal et al, 2000].

Для увеличения продуктивности «плазмиды были сконструированы и изучены четыре дополнительных ее варианта с синтетическим интроном и последовательностью посттранскрипционного регуляторного элемента вируса гепатита сурка (WHV) - WPRE. Синтетический интрон был создан de novo, собран из синтетических олигонуклеотидов и встроен между промотором CMV» [Karagyaur et al, 2020] и консенсусной Kozak-последовательностью

(сайт рестрикции NheI). Последовательность интрона представляет собой 5'-**GTGAGTAACAGAGATCTAATACGCTTCTCTTGCTAAGCCTAACSTTTTCTGTCTTTGTTTCTGCTTTTCCCCCCCCCACAG**-3' (ключевые последовательности синтетического интрона: донорная и акцепторная последовательность, точка ветвления - выделены жирным шрифтом). До проведения тестирования не было очевидно, какая из ориентаций интрона (прямая или обратная) будет более предпочтительной для продукции терапевтических белков, поэтому оба варианта генетической конструкции были сохранены (pVax1m-f/rIntr-hBDNF-IRES-huPA). Последовательность WPRE была клонирована из pAAV-EF1a-tdTomato-WPRE-pGHpA (Addgene #67527) [Wertz et al., 2015] и встроена в варианты генетической конструкции pVax1m-hBDNF-IRES-huPA с прямой и обратной ориентацией синтетического интрона между стоп-кодоном huPA и сигналом полиаденилирования бычьего гормона роста (по сайту рестрикции XbaI). Полученные варианты плазмид тестировали параллельно с описанной ранее плазмидой pVax1-hBDNF, кодирующей только ген BDNF [Karagyaour et al., 2015]. Плазмида pVax1m-fIntr-hBDNF-IRES-huPA (с прямой ориентацией интрона и без WPRE) по итогам исследования (раздел 3.2.1) была оценена, как наиболее эффективная, и для удобства ей было присвоено название pNCure (plasmid for nervous tissue cure, «плазмида для лечения нервной ткани»).

2.5 Оценка биологической активности бицистронной генетической конструкции *in vitro*

Чтобы определить, какой из вариантов плазмиды «pVax1m-f/rIntr-hBDNF-IRES-huPA (с или без WPRE) обеспечивает максимальный уровень продукции рекомбинантных белков BDNF и uPA, культуры HEK293T трансфецировали перечисленными вариантами плазмиды, а также pVax1-hBDNF и контрольной плазмидой pVax1m» [Karagyaour et al, 2020] (не менее, чем в трех повторах) с использованием Lipofectamine2000 (ThermoFisher Scientific, #11668019) в соответствии с рекомендациями производителя.

Трансфицированные клетки культивировали в полной среде роста в течение 24 часов, а затем среду культивирования меняли на среду, содержащую 2% фетальной бычьей сыворотки (FBS). Через «72 часа после трансфекции кондиционированную среду собирали и анализировали на содержание рекомбинантных BDNF и uPA человека с использованием наборов Human Free BDNF Quantikine ELISA Kit (R&D, #DBD00) и Human uPA ELISA Kit (URK) (Abcam, #ab119611)» [Karagyaur et al, 2020], соответственно, согласно рекомендациям производителя.

«Биологическую активность бицистронной генетической конструкции pNCure *in vitro* оценивали по способности закодированных в ней рекомбинантных белков BDNF и uPA стимулировать рост нейритов в клеточной культуре нейробластомы мыши» [Karagyaur et al, 2020] Neuro2a. Известно, что эта клеточная линия дифференцируется и запускает нейритогенез (рост нейритов) в условиях депривации сыворотки [Semina et al. 2016]. Для проведения исследования клетки Neuro2a высевали в 24-луночный планшет с низкой конфлюэнтностью (10–15%), а через 24 часа полную среду роста заменяли средой DMEM, содержащей 1% FBS, для стимуляции роста нейритов. В лунки добавляли кондиционированную среду от «клеток HEK293T, трансфицированных плазмидами pNCure, pVax1-hBDNF или контрольной плазмидой pVax1m (конечная концентрация BDNF в лунках pNCure, pVax1-hBDNF составляла около 50 нг/мл). Некоторые лунки использовали в качестве групп положительного (1% FBS) или отрицательного (10% FBS) контроля» [Karagyaur et al, 2020]. Каждую из групп изучали в трипликатах. Клетки инкубировали около 72 часов, а после полученные культуры фотографировали в проходящем свете с помощью инвертированного микроскопа, оснащенного камерой. Нейритами считали отростки, длина которых была в 2 и более раз больше диаметра клетки. Клетки, содержащие нейриты, в каждой из групп подсчитывали с помощью программы ClickCounter2 и нормализовали на общее количество клеток.

2.6 Внутримышечная инъекция плазмиды и модель травматической денервации задней конечности

Для изучения нейропротективной активности комбинации BDNF и uPA в составе бицистронной генетической конструкции pNCure на модели травматической денервации задней конечности мышцы необходимо было разработать адекватный и эффективный способ доставки генетической конструкции в мышечные волокна. Ранее с этой целью был использован описанный подход, сочетающий в себе гидродинамический удар и электропорацию [Manthorpe et al., 1993]. Хотя такой подход увеличивал эффективность доставки целевой плазмиды в мышечные волокна, он был сопряжен с существенным некрозом мышечной ткани (в среднем 10-30%), что влияло на чистоту эксперимента и снижало вероятность потенциальной клинической трансляции данной разработки.

С учетом этих фактов был модифицирован протокол введения плазмидной конструкции, и инъекция ударной дозы раствора плазмиды в одну точку мышцы с последующей электропорацией была заменена несколькими внутримышечными инъекциями плазмиды с меньшим объемом раствора и без электропорации. Для оценки эффективности доставки плазмиды в мышечные волокна посредством множественных инъекций без электропорации, растворы плазмидных конструкций pVax1m- β -Gal или pNCure (общий объем 60 мкл, 1 мкг/мкл), вводили в одну или шесть разных точек передней большеберцовой мышцы экспериментальных мышей (по три мышцы в каждой группе). Через 72 часа после введения плазмид мышей забивали передозировкой наркоза и выделяли передние большеберцовые мышцы. Для оценки экспрессии β -Gal мышцы из соответствующих групп замораживали в среде для заморозки Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura Finetek, #SA62550-01) и из них приготавливали криосрезы. Срезы фиксировали в 10% растворе формалина, окрашивали на предмет экспрессии β -Gal согласно опубликованному ранее протоколу [Ma et al, 2002] и подсчитывали количество β -Gal-положительных

мышечных волокон. Чтобы оценить влияние описанного режима инъекций генетической конструкции на продукцию рекомбинантного белка, из мышц, в которые вводили плазмиду pNCure, получали эксплантную органотипическую культуру [Jang et al., 2004]. «Полученные мышечные эксплантаты кондиционировали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (Gibco, #11965092) с 2% FBS (ThermoFisher Scientific, #26140079) и 1% раствора антибиотика/антимикотика» [Karagyaur et al, 2020] (Gibco, #15240062). Кондиционированную среду концентрировали в 20 раз, используя последовательность протоколов обессоливания, лиофилизации и восстановления полученных белков в меньшем объеме DMEM без сыворотки. Содержание «рекомбинантных BDNF и uPA человека в концентрате кондиционированной среды оценивали с помощью наборов для иммуноферментного анализа Human Free BDNF Quantikine ELISA Kit (R&D, #DBD00) и Human uPA ELISA Kit (URK) (Abcam, #ab119611)» [Karagyaur et al, 2020], соответственно, согласно рекомендациям производителя. Процедура концентрирования кондиционированной среды была необходима для определения рекомбинантных белков в условиях достаточно низкой продуктивности мышечных эксплантатов и умеренной чувствительности ИФА-систем BDNF и uPA.

Для изучения нейропротективной активности комбинации BDNF и uPA в составе бицистронной генетической конструкции pNCure на модели травматической денервации задней конечности была использована описанная ранее модель травмы общего малоберцового нерва мыши [Karagyaur et al., 2015]. Данный нерв расположен поверхностно (что обеспечивает удобство хирургического доступа), является смешанным (т.е., позволяет изучать восстановление нервных волокон различных модальностей) и его повреждение ярко проявляется клинически, поскольку он «иннервирует мышцы-разгибатели пальцев стопы (что позволяет клинически подтверждать его повреждение» [Карагяур, 2013] и осуществлять неинвазивную диагностику восстановления его функций). Модель травмы периферического

нерва была наложена под руководством профессора Кафедры физиологии человека и животных Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, д.б.н. Балезиной О.П.

Для исследования 60 мышей были рандомизированы в четыре группы по 10 животных: группы положительного (инъекции витамина В12) и «отрицательного (pVax1m 1 мкг/мкл) контроля и четыре экспериментальные группы (pNCure 1 или 2 мкг/мкл, pVax1-hBDNF 2 мкг/мкл и pVax1-huPA 2 мкг/мкл). Такое количество экспериментальных животных является минимально необходимым для оценки фармакологических эффектов и проведения статистической обработки результатов. Мышей анестезировали инъекциями 2.5% 2,2,2-трибромэтанола на изобутиловом спирте, общий малоберцовый нерв (n. peroneus communis) изолировали от окружающей ткани в стерильных условиях и раздавливали пинцетом шириной 1 мм» [Karagyaur et al, 2020] с покрытыми силиконом браншами два раза по 20 секунд. После зашивания раны мышам из группы отрицательного контроля и двух экспериментальных групп делали инъекции плазмид в «шесть различных участков передней большеберцовой мышцы. Аналогичным образом инъекции плазмид осуществляли через 4, 9 и 13 суток после повреждения нерва. Мышам из группы положительного контроля» [Karagyaur et al, 2020] (витамин В12) вводили раствор витамина В12 на физиологическом растворе в день травмы и затем каждые 48 ч до окончания эксперимента подкожно из расчета 65 мкг/кг. Применение инъекций витамина В12 для стимуляции регенерации периферического нерва после травмы обусловлено, с одной стороны, отсутствием зарегистрированных препаратов, обладающих нейротрофической активностью и схожим принципом действия (плазмидная конструкция), а, с другой стороны, показаниями к применению витамина В12 при "травмах периферических нервов" согласно инструкции препарата.

2.7 Оценка восстановления структуры и проводимости поврежденного периферического нерва

«Через 18 суток после повреждения общего малоберцового нерва оценивали влияние многократных инъекций плазмиды на его функциональное и структурное восстановление. Функциональное состояние нерва оценивали по степени восстановления его проводимости. Оценку проводимости нервов осуществляли, как описано ранее [Karagyaur et al., 2015]. Животных забивали, поврежденные нервы изолировали и помещали» [Karagyaur et al, 2020] в раствор Лайли (135.0 мМ NaCl, 4.0 мМ KCl, 2.2 мМ CaCl₂, 1.0 мМ MgCl₂, 0.9 мМ NaH₂PO₄, 16.3 мМ NaHCO₃ и 11.0 мМ D-глюкозы, pH 7.2- 7.4) для проведения электрофизиологических исследований. Три серии «суммарных потенциалов действия нерва (СПДН) регистрировали для каждого нерва с использованием монополярного аспирационного серебряного электрода, расположенного на расстоянии 10 мм от места повреждения» [Karagyaur et al, 2020] и подключенного через AD-преобразователь к персональному компьютеру. Полученные потенциалы действия нерва были проанализированы с использованием программного обеспечения PowerGraph Professional 3.3 (ООО "ДИСофт"). Оценивали продолжительность «латентного периода и амплитуду СПДН. Латентный период представляет собой интервал времени от момента стимуляции и до момента регистрации СПДН на аспирационном электроде, т.е. фактически представляет собой задержку проведения СПДН по нерву. Латентный период обратно пропорционален скорости проведения нервного импульса и измеряется в миллисекундах. Данная величина характеризует степень зрелости нервных волокон: толщину безмиелиновых нервных волокон и толщину миелиновой оболочки миелинизированных нервных волокон. Амплитуда СПДН прямопропорциональна количеству нервных волокон, участвующих в его проведении; измеряется в милливольтгах» [Карагяур, 2013].

«Восстановление структуры поврежденного нерва оценивали по количеству аксонов на фиксированных 10% формалином замороженных

срезах фрагмента общего малоберцового нерва, расположенного на 3 мм дистальнее места повреждения» [Карагяур, 2013]. Для этого полученные криосрезы окрашивали первичными кроличьими антителами к белку промежуточных нейрофиламентов NF200 («Sigma», #N4142) и флуоресцентно меченными вторичными козьими антикроличьими антителами (Invitrogen, #A11034, США). «Образцы исследовали с помощью микроскопа Leica DM6000, оснащенного камерой DFC360 FX и DFC420C (Leica Microsystems GmbH, Германия), с использованием репрезентативных полей зрения для получения фотографий. Обработку и анализ изображений проводили с использованием программного обеспечения LasX (Leica Microsystems GmbH, Германия) и FiJi» [Dzhauari et al, 2022; Lopatina et al, 2011; Karagyaur et al, 2015].

2.8 Сборка лентивирусных частиц, трансдукция

Прямое введение бицистронной генетической конструкции, кодирующей BDNF и uPA, в область кровоизлияния в головном мозге не оказало видимого нейропротективного эффекта. Проведенный в параллели эксперимент с введением в область модельного кровоизлияния в головном мозге плазмидной конструкции pVax1 m- β -Gal, кодирующей маркерный белок β -Gal, позволил идентифицировать лишь одиночные β -Gal позитивные клетки. Все это свидетельствует о том, что плазмидные генетические конструкции, введенные в область повреждения мозговой ткани, практически не захватываются поврежденными клетками, и, соответственно, закодированные в них терапевтические гены не могут быть эффективно экспрессированы. Для увеличения эффективности доставки целевых генов в ткань мозга были собраны лентивирусные генетические конструкции (вектор переноса), кодирующие гены β -Gal, BDNF и uPA (Рисунок 3.7 (Результаты)).

Вектора переноса для сборки лентивирусных частиц (ЛВЧ) собирали с использованием стандартных молекулярно-биологических методов на основе векторов для сборки ЛВЧ III-го поколения: pVLT (Евроген, Россия): pVLT- β -

Gal, pVLT-BDNF-IRES-uPA, pVLT-hTERT и Lenti (Takara, США): Lenti-AncBE-SpCas9(NG)-GFP-NLS, Lenti-gRNA-RFP, Lenti-Ef1a-shRNA, Lenti-tetO-shRNA, Lenti-tetO-BDNF-IRES-uPA.

Для сборки ЛВЧ использовали ранее опубликованный протокол [Tuurin-Kuzmin et al, 2020] с модификациями. Вкратце, сборку ЛВЧ проводили в клетках-сборщиках HEK293T. Для этого клетки наращивали в стандартных условиях культивирования на 100 мм культуральных чашках до достижения конфлюента 80-90%. Для трансфекции в 1 мл стерильного физиологического раствора готовили смесь, содержащую 25 мкг плазмидной ДНК (9.25 мкг вектора переноса, кодирующего РНК ЛВЧ, 4.75 мкг pRSV-Rev (Addgene, #12253), 9.25 мкг pMDLg/pRRE (Addgene, #12251) и 1.75 мкг pMD2.G (Addgene, #12259)) и 125 мкл 0.1% раствора Polyethylenimine, Linear, MW 25000 (Polysciences, Inc., США, #23966-1), которую инкубировали 20-30 минут от момента приготовления при комнатной температуре, а затем наносили на клетки-сборщики. Через 6-12 часов после трансфекции клеткам заменяли среду роста на полную, которую в свою очередь спустя 12-18 часов меняли на среду DMEM с высоким содержанием глюкозы, содержащую 2% инактивированной бычьей сыворотки для сборки ЛВЧ (см. раздел 2.2). Кондиционированную среду, содержащую ЛВЧ, собирали через 64-72 ч после трансфекции и отделяли от клеточного дебриса фильтрацией через фильтры с диаметром пор 0.45 мкм. Титр ЛВЧ оценивали с помощью Lenti-X™ p24 Rapid Titer Kit (Takara Bio, #632200).

ЛВЧ, кодирующие β -Gal, BDNF и uPA, для введения животным концентрировали центрифугированием при 16000g 4°C в течение 4 часов. 5/6 объема надосадочной жидкости удаляли, а полученный концентрат (6x) использовали для введения в область кровоизлияния животным или для оценки сохранности ЛВЧ в ходе концентрирования (наносили на культуру HEK293T). Для повышения эффективности трансдукции в препарат, содержащий ЛВЧ, добавляли протамина сульфат в конечной концентрации 50 мкг/мл [Lin et al, 2012].

Для трансдукции первично выделенных МСК использовали МСК ранних (<3) пассажей. МСК высаживали на 6-луночные планшеты с достижением конfluence 30-40%, в лунках меняли среду на 1-1.2 мл среды, содержащей ЛВЧ, и центрифугировали при 300g и комнатной температуре в течение 1-1.5 часа для увеличения эффективности трансдукции. После центрифугирования среду меняли на стандартную культуральную среду и клетки инкубировали в течение ~8 часов. Процедуру трансдукции повторяли 2 раза. Между трансдукциями препарат ЛВЧ хранили при +4°C. Селекцию трансдуцированных МСК в ходе получения иммортализованной линии осуществляли путем внесения в полную среду роста МСК пуромидина до достижения конечной концентрации 1 мкг/мл. Селекцию начинали через 7 суток после трансдукции и продолжали ее в течение 10-14 суток (смена среды культивирования - каждые 2-3 суток), ориентируясь на гибель нетрансдуцированных МСК из группы контроля, культивировавшихся в аналогичных условиях.

2.9 Приготовление сред культивирования для введения в область интрацеребральной посттравматической гематомы

Забегая вперед, констатируем, что введение препарата ЛВЧ в область кровоизлияния в мозговой ткани не позволило добиться доставки целевых генов β -Gal (маркерный белок), BDNF и uPA в клетки мозга. По этой причине для изучения сочетанной нейропротективной активности BDNF и uPA в модели интрацеребральной посттравматической гематомы использовали препараты рекомбинантных белков BDNF и uPA или композиций их содержащих (секретом МСК).

«Образцы кондиционированной среды, содержащей мозговой нейротрофический фактор человека (hBDNF), урокиназный активатор плазминогена человека (huPA) или их комбинацию, получали из клеток НЕК293Т, трансфицированных плазмидами pVax1, pVax1-hBDNF» [Karagyaur et al, 2015], pVax1-huPA или pNCure [Karagyaur et al, 2020],

обозначаемых как Контроль, BDNF, uPA и BU (BDNF+uPA) соответственно. Для получения кондиционированной среды, содержащей искомые рекомбинантные белки трансфицированные клетки НЕК293Т культивировали в бессывороточной среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (Gibco, #11965092) в течение 48 часов. Затем образцы среды собирали, центрифугировали в течение 10 мин при 3000g для удаления клеточного дебриса. Образцы среды BDNF и BU концентрировали примерно в 50 раз с помощью Centriprep Centrifugal Filter Unit (Millipore, #4302, USA) до концентрации BDNF 3.5 нг/мкл (108 нМ), что было подтверждено проведением иммуноферментного анализа с помощью набора Human Free BDNF Quantikine ELISA Kit (R&D, #DBD00).

«Образцы среды uPA концентрировали примерно в 8-10 раз с помощью Centriprep Centrifugal Filter Unit (Millipore, #4302, USA). Концентрация uPA при таком режиме концентрирования в образцах среды uPA и BU достигала 0.4 нг/мкл (8 нМ), что подтверждали с помощью набора Human uPA ELISA Kit (URK)» [Karagyaur et al, 2021] (Abcam, #ab119611).

Кондиционированную среду, содержащую компоненты секрета «МСК человека или крысы, получали согласно опубликованному ранее протоколу [Sagaradze et al, 2019]. Вкратце, субконфлюентные МСК человека или крысы на пассажах 4–5 тщательно промывали раствором Хенкса (ПанЭко, #P020П), а затем культивировали в течение 7 суток в «среде DMEM с низким содержанием глюкозы (Gibco, #31885049), добавкой GlutaMAX™, пируватом и 100 Ед/мл пенициллина-стрептомицина» [Karagyaur et al, 2021] (Gibco, #15240062).

По окончании кондиционирования среду собирали и центрифугировали в течение 10 минут при 300g для удаления клеточного дебриса (группа чМСК1х)» [Джауари, 2024] или образцы еще дополнительно концентрировали в 5-50 раз (группы кМСК10х, чМСК5х, чМСК10х, чМСК25х, чМСК50х), используя картриджи для ультрафильтрации с отсечкой молекул с молекулярной массой менее 10 кДа (Merck, Германия). Секретом

иммортизированных и генетически модифицированных МСК (см. раздел 2.14) процессировали аналогичным образом. «Кондиционирование среды МСК и концентрирование ее с помощью картриджей для ультрафильтрации для ряда экспериментов осуществляла м.н.с. Лаборатории репарации и регенерации тканей Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова, к.б.н. Н.А. Басалова» [Джауари, 2024].

При оценке нейропротективной активности рекомбинантных молекул BDNF и uPA, а также секрета МСК, в качестве отрицательного контроля (DMEM) использовали «DMEM с низким содержанием глюкозы (Gibco, #31885049), добавкой GlutaMAX™, пируватом и 100 Ед/мл пенициллина-стрептомицина (Gibco, #15240062)» [Джауари, 2024]. В качестве положительного контроля использовали контрольную среду DMEM с «добавлением 3.5 нг/мкл рекомбинантного мозгового нейротрофического фактора человека (группа BDNF) (#ab206642-2, Abcam, США)» [Dzhauari et al, 2022]. Для изучения сочетанной активности секрета МСК и рекомбинантного BDNF, как одного из основных нейропротекторов, секретом чМСК1х дополняли человеческим рекомбинантным BDNF до конечной концентрации 3.5 нг/мкл (группа чМСК-BDNF).

Для эксперимента по оценке роли BDNF и uPA в нейропротективной активности секрета МСК методом ингибиторного анализа были приготовлены следующие препараты секрета МСК: для отрицательного контроля - «чМСК10х, содержащий 5 мкг/мл неспецифических овечьих иммуноглобулинов класса G (ThermoFisher Scientific, США, #31243); для оценки подавления нейротрофической активности BDNF - чМСК10х, содержащий 5 мкг/мл нейтрализующих антител к BDNF - Anti-Brain Derived Neurotrophic Factor Antibody» [Karagyaur et al, 2021] (Merck, США, #AB1513P) в соответствии с рекомендациями производителя; для оценки подавления нейротрофической активности uPA - чМСК10х, содержащий 16.4 мкМ ингибитора uPA человека BC 11 hydrobromide (TOCRIS, США, #4372). BC 11

hydrobromide, согласно информации от производителя, является высокоспецифичным ингибитором uPA человека и не оказывает ингибирующего влияния на "8 родственных ферментов", IC₅₀ = 8.2 мкМ.

2.10 Модель интрацеребральной посттравматической гематомы

Исследование нейропротективной активности комбинации BDNF и uPA, а также содержащих их композиций, проводили на модели интрацеребральной посттравматической гематомы, которую моделировали введением аутологичной крови во внутреннюю капсулу правого полушария по А.Н. Макаренко и др. [Макаренко и др, 2002]. Внутренняя капсула содержит большое количество проводящих путей, «которые соединяют кору с базальными ганглиями, ядрами спинного мозга и ядрами черепно-мозговых нервов. Таким образом, повреждение внутренней капсулы вызывает различные неврологические нарушения, тяжесть которых коррелирует с тяжестью травмы головного мозга.

Стоит отметить, что модель интрацеребральной посттравматической гематомы позволяет моделировать широкий спектр патологических процессов (ишемия, ферроптоз, глутамат-опосредованная токсичность, нейровоспаление и вторичное повреждение), протекающих в головном мозге» [Басалова и др., 2023], при повреждениях различного генеза: острых нарушениях мозгового кровообращения, травмах, острых инфекциях, интоксикациях и пр. [Hoffman et al, 2009; Ng et al, 2019; Kuriakose et al, 2020]. Все это делает выбранную модель интрацеребральной посттравматической гематомы удобным и универсальным объектом для изучения механизмов повреждения и регенерации в головном мозге, а также удобным инструментом для оценки нейропротективной и прорегенераторной активности перспективных лекарственных кандидатов и композиций. «Модель интрацеребральной посттравматической гематомы была освоена при методологической поддержке к.б.н. Литвиновой С.А. и профессора, д.м.н. Ворониной Т.А.

(Лаборатория психофармакологии ФГБНУ "НИИ фармакологии имени В.В. Закусова")» [Джауари, 2024].

Для «моделирования внутримозгового кровоизлияния крыс анестезировали раствором, содержащим 2% Zoletil® 50 (VirBac, Испания) и 1.5% ксилазина (InterChemie, Нидерланды) в физиологическом растворе в дозе 1 мл/кг массы тела и помещали в стереотаксический аппарат. Рассекали кожу и сухожильный апоневроз, череп перфорировали (кзади от брегмы -2.0 мм, вправо от сигмы – 3.5 мм)» [Karagyaur et al, 2021; Paxinos et al, 2007]. Ткань головного мозга в области перфорации черепа разрушали и повреждали поверхностные вены головного мозга на соответствующей стороне. «Для стандартизации объема излившейся крови в очаг повреждения медленно вводили 20 мкл аутологичной крови, взятой из подъязычной вены» [Ткачук и др., 2023], операционное поле посыпали порошком Цефтриаксона (ПАО «Биосинтез», Россия), рану ушивали. При интрацеребральном (в область кровоизлияния) пути введения нейропротективную композицию или ЛВЧ, кодирующие β -Gal, вводили через 5 минут после моделирования кровоизлияния (для предотвращения вымывания введенной крови), до момента ушивания раны, однократно, в объеме 20-40 мкл. Внутривенные инъекции нейропротективных композиций, содержащих BDNF и uPA, или контрольных препаратов осуществляли в хвостовую вену крыс в объеме 100 мкл через 5 минут, 1 ч, 3 ч, 6 ч, 48 ч, 96 ч и 144 часа после моделирования интрацеребральной посттравматической гематомы, однократно или многократно, в зависимости от дизайна эксперимента (см. ниже).

Интраназальное введение нейропротективных композиций, содержащих BDNF и uPA, осуществляли однократно (по 40 мкл в каждый носовой ход - всего 80 мкл) через 5 минут, 1 ч, 3 ч или 6 часов после моделирования интрацеребральной посттравматической гематомы, в зависимости от дизайна эксперимента. Для интраназального введения секретома крыс после моделирования кровоизлияния и ушивания раны клали на спину и оставляли

в таком положении после введения секрета на 25–30 минут для его всасывания в слизистую оболочку носовых ходов.

Введение в спинномозговой канал (интратекально) выполняли между L5 и S1, введение осуществляли однократно медленным введением 100 мкл нейропротективной композиции, содержащей BDNF и uPA. Объем вводимых растворов определялся максимальной емкостью безопасного и эффективного объема инъекции для каждого пути введения. Внутри каждого из экспериментов введение нейропротективных композиций или контрольных препаратов осуществлялось вслепую (т.е., исследователь, осуществлявший инъекцию не был проинформирован, нейропротективную композицию или контрольный препарат он вводит).

Животным из группы ложнооперированного контроля (ЛО) «делали перфорацию черепа без какого-либо последующего повреждения головного мозга или инъекций крови» [Ткачук и др., 2023], нейропротективных композиций или контрольных образцов. В первых экспериментах группа ЛО была необходима для исключения неспецифического влияния методики хирургического доступа на поведение и неврологическое состояние экспериментальных животных. Результаты этих экспериментов показали, что все 24 крысы из группы ЛО ничем не отличались от интактных (здоровых, неоперированных) животных (100% выживаемость, нет неврологических нарушений и очага повреждения головного мозга по данным МРТ и гистологического исследования), что свидетельствовало о низком травматизме проводимых хирургических манипуляций *per se*. В связи с этим на заседании Комитета по биоэтике МГУ им. М.В. Ломоносова было рекомендовано отказаться от включения этой контрольной группы в последующие эксперименты с целью рационального использования экспериментальных животных.

При изучении способности плазмидных генетических конструкций проникать в клетки головного мозга в очаге интрацеребральной посттравматической гематомы было опробовано несколько способов введения

генетической конструкции pVax1m- β -Gal: после инъекции крови и вместе с кровью, в количестве 40 или 10 мкг/животное (0.5 мг/мл или 2 мг/мл, соответственно, в 20 мкл раствора, поскольку эффективное и безопасное (изоосмотическое) количество плазмиды, вводимой в область повреждения мозга неизвестно). Использованные для инъекции количества плазмиды были продиктованы, с одной стороны, полученными ранее результатами о минимальном терапевтически активном количестве генно-инженерных препаратов (плазмид) на моделях восстановления травмированного/ишемизированного периферического нерва [Karagyaur et al, 2015; Karagyaur et al, 2020], а, с другой стороны, размером области повреждения и растворимостью плазмидных препаратов в солевых растворах.

После первых экспериментов по оценке нейропротективной активности BDNF и uPA в виде рекомбинантных белков и, в особенности, в составе секрета МСК стало понятно, что данные композиции обладают выраженными нейропротективными свойствами в модели интрацеребральной посттравматической гематомы. Поскольку повреждения мозговой ткани вследствие острых нарушений мозгового кровообращения (ОНМК, инсульты) и черепно-мозговых травм (ЧМТ) представляют собой острую и нерешенную медико-социальную проблему, мы предположили, что установленная нейропротективная активность секрета МСК может послужить мощной предпосылкой для разработки на его основе лекарственного препарата, способного замедлить прогрессию и снизить тяжесть повреждения мозговой ткани после ОНМК и ЧМТ. Именно этим мотивом объясняется проведение экспериментов, призванных установить оптимальные пути введения, время введения (временное терапевтическое окно) и концентрации, эксперименты с повторностями введения нейропротективной субстанции и введение пожилым животным, а также использование различных подходов к генетической модификации МСК (как источника секрета) с целью стабилизации качественного и количественного состава получаемого секрета.

В исследование были включены 459 животных:

1. 36 крыс - для оценки нейропротективной активности комбинации BDNF и uPA, закодированных в бицистронной генетической конструкции pNCure: ложнооперированные (ЛО) - 3 крысы, контроль на повреждение (КП) - 7 крыс, контроль (pVax1m, 2 мг/мл) - 7 крыс, группа pNCure (2 мг/мл) - 7 крыс, и 4 группы pVax1m- β -Gal (0.5 мг/мл (доза -10 мкг) или 2 мг/мл (доза - 40 мкг), вместе с кровью (ВК) или после крови (ПК) - ВК10, ВК40, ПК10, ПК40, соответственно) по 3 крысы. Введение - в область кровоизлияния, однократно, в объеме 20 мкл, через 5 минут после моделирования кровоизлияния, если не указано иное;

2. 6 крыс - для оценки способности ЛВЧ, кодирующих маркерный белок β -Gal, проникать в целевые клетки, прилежащие к области модельного кровоизлияния: ЛВЧ, кодирующие ген β -Gal, в дозах 12 тыс. (600 тыс. ЛВЧ в мл) и 72 тыс. (3.6 млн ЛВЧ в мл) ЛВЧ, по 3 крысы. Введение - в область кровоизлияния, однократно, в объеме 40 мкл, через 5 минут после моделирования кровоизлияния;

3. 70 крыс - для изучения нейропротективной активности рекомбинантных BDNF и uPA: ложнооперированные крысы (ЛО), контроль (DMEM-LG), BDNF (3.5 нг/мкл, 108 нМ), uPA (0.4 нг/мкл, 8нМ) и BU (BDNF 3.5 нг/мкл + uPA 0.4 нг/мкл), по 14 крыс в каждой группе. Введение - в область кровоизлияния, однократно, по 20 мкл, через 5 минут после моделирования кровоизлияния;

4. 70 крыс - для изучения нейропротективной активности секрета МСК: ложнооперированные крысы (ЛО) - 10 крыс, отрицательный контроль (DMEM-LG) - 20 крыс, экспериментальные группы - BDNF, чМСК1х, чМСК10х, чМСК-BDNF, по 10 крыс в каждой группе. Введение - в область кровоизлияния, однократно, по 20 мкл, через 5 минут после моделирования кровоизлияния;

5. 34 крыс - для исследования видовой специфичности: контроль (DMEM-LG) - 10 крыс, положительный контроль - Церебролизин (Everpharma, серия #C2VB1A, срок годности - 03.2025) - 12 крыс, и кМСК10х - 12 крыс.

Введение - в область кровоизлияния, однократно, по 20 мкл, через 5 минут после моделирования кровоизлияния;

6. 30 крыс - для подбора оптимального пути введения: контрольные группы (DMEM-LG, внутривенно или в область гематомы), экспериментальные группы - чМСК10х (в область гематомы, внутривенно, интраназально или в спинномозговой канал), по 5 крыс в каждой группе. Введение - через 5 минут после моделирования кровоизлияния, однократно, 40 мкл - в область гематомы, 80 мкл - интраназально (по 40 мкл в каждый носовой ход), 100 мкл - внутривенно;

7. 35 крыс - для определения оптимального времени введения (временное терапевтическое окно) нейропротективной композиции (секретом МСК), содержащей BDNF и uPA: контроль (DMEM-LG, внутривенно через 1 час после моделирования кровоизлияния), экспериментальные группы - чМСК10х (внутривенно или интраназально, через 1, 3 или 6 часов после моделирования кровоизлияния), по 5 крыс в каждой группе. Введение однократное, объемы введения: 80 мкл - интраназально (по 40 мкл в каждый носовой ход), 100 мкл - внутривенно;

8. 30 крыс - для определения оптимальной дозы нейропротективной композиции (секретом МСК), содержащей BDNF и uPA: контроль (DMEM-LG, сконцентрированный в 50 раз), экспериментальные группы, содержащие различные степени концентрирования секрета МСК (чМСК1х, чМСК5х, чМСК10х, чМСК25х или чМСК50х), по 5 крыс в каждой групп. Введение - внутривенно, однократно, через 1 час после моделирования кровоизлияния, объем введения - 100 мкл;

9. 36 крыс - для определения эффективности курсового применения нейропротективной композиции (секретом МСК), содержащей BDNF и uPA: контрольные группы (DMEM-LG) - однократное введение (5 крыс) или повторное введение (10 крыс), экспериментальные группы (чМСК10х) - однократное введение (11 крыс) или повторное введение (10 крыс)). Введение - внутривенно, через 1 час после моделирования кровоизлияния. Повторное

введение осуществляли через 48, 96 и 144 часа после моделирования кровоизлияния, объем введения - 100 мкл;

10. 20 крыс - для определения эффективности применения нейропротективной композиции (секретом МСК), содержащей BDNF и uPA, у пожилых животных: контроль (DMEM-LG) и эксперимент (чМСК10х), по 10 крыс в каждой группе. Введение - внутривенно, однократно, через 1 час после моделирования кровоизлияния, объем введения - 100 мкл;

11. 22 крысы - для оценки нейропротективной активности композиции на основе секрета иммортиализованных МСК: контроль (DMEM-LG) - 6 крыс, экспериментальные группы - секретом первично выделенных МСК (чМСК10х, 6 крыс) и секретом иммортиализованных МСК человека (иМСК10х) - 10 крыс. Введение - внутривенно, однократно, через 1 час после моделирования кровоизлияния, объем введения - 100 мкл;

12. 40 крыс - для оценки нейропротективной активности композиции на основе секрета генетически модифицированных МСК: отрицательный контроль (DMEM-LG), положительный контроль - секретом иммортиализованных МСК человека неконцентрированный (иМСК1х), экспериментальные группы - секретом генетически модифицированных МСК неконцентрированный (1х): от МСК, гиперэкспрессирующих BDNF и uPA конститутивно (кBU) или индуцируемо (иBU), от МСК, гиперэкспрессирующих shRNA к VHL конститутивно (ksh) или индуцируемо (ish), а также комбинации секретов от МСК с конститутивной и индуцируемой гиперэкспрессией - кBU+ksh и иBU+ish, по 5 крыс в каждой группе. Введение - внутривенно, однократно, через 1 час после моделирования кровоизлияния, объем введения - 100 мкл;

13. 30 крыс - для оценки роли BDNF и uPA в нейропротективной активности секрета МСК методом ингибиторного анализа: отрицательный контроль 1 (DMEM-LG), отрицательный контроль 2 (чМСК10х с неспецифическими овечьими иммуноглобулинами класса G, чМСК10х+IgG), положительный контроль (чМСК10х), экспериментальные группы - чМСК10х

с добавлением нейтрализующих антител к BDNF человека (чМСК10х+аBDNF) и чМСК10х с добавлением специфического ингибитора к uPA (чМСК10х+iuPA), по 6 крыс в каждой группе. Введение - в область кровоизлияния, однократно, по 40 мкл, через 5 минут после моделирования кровоизлияния.

Крысы, погибшие в течение первых 24 часов от моделирования интрацеребральной посттравматической гематомы из исследования исключались.

2.11 Оценка неврологических показателей в модели интрацеребральной посттравматической гематомы

За животными наблюдали в течение 14-28 суток после моделирования внутримозгового кровоизлияния с ежедневной регистрацией процента выживших крыс и оценкой неврологического статуса через 3 и 10 (за исключением эксперимента по курсовому введению) или через 3, 10 и 28 суток (эксперимент по курсовому введению) после «кровоизлияния (по шкале Stroke-index McGraw, модифицированной для грызунов И.В. Ганнушкиной) в зависимости от эксперимента [McGraw et al, 1976; Ганнушкина, 2000]. «Вкратце, «визуально здоровые животные» не имели признаков неврологического дефицита. Животных с признаками вялости, слабости конечностей, тремора, птоза и/или полуптоза относили к животным «с легкими неврологическими нарушениями». Животных с признаками пареза и/или паралича конечностей, нарушения координации, или находящихся в коме, относили» [Ткачук и др., 2023] к животным «с тяжелыми неврологическими нарушениями».

Когнитивные нарушения оценивали с помощью теста пассивного избегания [Доеррнер et al, 2014]. У животных вырабатывали рефлекс за 24 часа до моделирования внутримозгового кровоизлияния. Для этого каждое животное помещали в аппарат для оценки пассивного избегания (San Diego

Instruments, США) и регистрировали время (в секундах) до момента «его входа в темную камеру аппарата. В камере крыса получала 8 болевых электрических раздражителей (0.4 мА, 1 сек каждый). Через 24 часа» [Ткачук и др., 2023] и 10 суток после моделирования внутримозгового кровоизлияния (для тестирования кратковременной и долговременной памяти, соответственно) животных повторно обследовали и фиксировали время (в секундах) «избегания темной камеры с электрическим полом. Максимальное время наблюдения за каждым животным составляло 180 секунд (100%). Полученные результаты в секундах нормировали на 180 секунд, и вычисляли «эффективность» краткосрочной и долгосрочной памяти в %» [Ткачук и др., 2023]. По результатам исследований оценка когнитивных нарушений у крыс после моделирования интрацеребральной посттравматической гематомы (с введением нейропротективных субстанций и без них) оказалась не очень информативна, поэтому была использована только в самых первых экспериментах.

2.12 МРТ

«МРТ исследование проводили в Центре коллективного пользования ФГАОУ ВО "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" МЗ РФ» [Джауари, 2024]. МРТ-изображения получали через 11, 14 или 28 суток (в зависимости от эксперимента) после моделирования интрацеребральной посттравматической гематомы с «использованием системы Clinscan 7T (Bruker Biospin, США), снабженной катушкой для анализа мозга крыс с TurboS Spin Echo и подавлением сигнала от жировой ткани. Коронарные проекции были получены с использованием следующих параметров: TR (время повторения) = 5220 мс; TE (время до эха) = 53 мс; продолжительность эха сигнала = 9; базовое разрешение 230x320; FoV (поле зрения) = 32 × 40 мм; толщина среза = 0.5 мм; расстояние между срезами = 0.75 мм. Поперечные проекции были получены с использованием следующих параметров: TR = 4000 мс; TE = 40

мс; продолжительность эха сигнала = 9; базовое разрешение 288x320; FoV = 40 × 40 мм; толщина среза = 0.5 мм; расстояние между срезами = 0.6 мм» [Ткачук и др., 2023].

2.13 Гистологическое и иммуногистохимическое исследование ткани мозга

Для оценки эффективности доставки плазмидных конструкций (pVax1m- β -Gal) в очаг кровоизлияния в модели интрацеребрального посттравматического кровоизлияния через пять суток после моделирования инсульта, крыс умерщвляли в среде CO₂, мозг извлекали и замораживали в среде для криоконсервации гистологических образцов Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura, США, #4583). Из полученных образцов приготавливали криосрезы головного мозга в области повреждения. Полученные криосрезы окрашивали на содержание β -галактозидазы, согласно опубликованному ранее протоколу [http://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/x_gal.htm].

Для морфометрической оценки объема повреждения головного мозга крыс умерщвляли в среде CO₂ через 14 или 28 суток (в зависимости от эксперимента) после моделирования интрацеребральной посттравматической гематомы. «Головной мозг извлекали, фиксировали в 4% растворе формальдегида и заливали парафином. Срезы головного мозга, содержащие очаг повреждения, депарафинизировали и антигены демаскировали. Часть срезов окрашивали гематоксилин-эозином, крезильным фиолетовым (окраска по Нисслю) или берлинской лазурью Перлса (окраска по Перлсу). Комбинация этих красителей позволяет оценить различные аспекты морфологических изменений в поврежденном мозге: размер поражения, функциональное состояние нейронов, степень инфильтрации лейкоцитами и относительный объем отложений гемосидерина.

Парафинизация образцов мозга экспериментальных животных, а также гистологическая окраска полученных срезов выполнялась под руководством: профессора д.м.н. П.Г. Малькова и к.м.н. Н.В. Даниловой (Медицинский

научно-образовательный центр МГУ имени М.В. Ломоносова)» [Ткачук и др., 2023; Джауари, 2024], к.б.н. Т.В. Безугловой и доцента к.м.н. М.В. Мниховича (НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ "РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского").

«Для иммуногистохимического окрашивания срезы обрабатывали 50 мМ раствором ацетата аммония и блокировали 10% козьей сывороткой для уменьшения фоновой флуоресценции. После блокирования их инкубировали с антителами к CD68 (Abcam, #ab125212, США) и CD163 (Abcam, #ab182422, США) с последующей инкубацией с флуоресцентно мечеными вторичными козьими антикроличьими антителами (Invitrogen, #A11034, США). Ядра окрашивали раствором 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI) (Sigma, #MBD0015-10ML, США). Образцы исследовали с помощью микроскопа Leica DM6000, оснащенного камерой DFC360 FX и DFC420C (Leica Microsystems GmbH, Германия), с использованием репрезентативных полей зрения для получения фотографий. Обработку и анализ изображений проводили с использованием программного обеспечения LasX (Leica Microsystems GmbH, Германия) и FiJi» [Karagyaur et al, 2021].

«Имуногистохимическое окрашивание криосрезов осуществляла м.н.с. Лаборатории репарации и регенерации тканей Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова, к.б.н. Н.А. Басалова» [Джауари, 2024].

2.14 Генетическая модификация и редактирование генома МСК человека

Для увеличения стабильности качественного и количественного состава секрета МСК или повышения в его составе концентрации факторов, обладающих нейротрофической и прорегенеративной активностью, был проведен ряд генетических модификаций первично выделенных МСК.

Культура первично выделенных МСК человека была иммортализована путем гиперэкспрессии гена TERT (Telomerase reverse transcriptase) человека. Данная конструкция была собрана на основе вектора pVLT (Евроген). кДНК

TERT получали путем обратной транскрипции тотальной мРНК МСК человека, амплифицировали с помощью праймеров: 5'-CCACCGAATTCGCCACCATGCCGCGCGCTCCCCGCTGCCGAGCCGTGCGCT и 5'-GCGTCGTCGACTCAGTCCAGGATGGTCTTGAAGTCTGAGGGCAGTGCCGGGTTG и встраивали в вектор pVLT по сайтам рестрикции EcoRI и Sall.

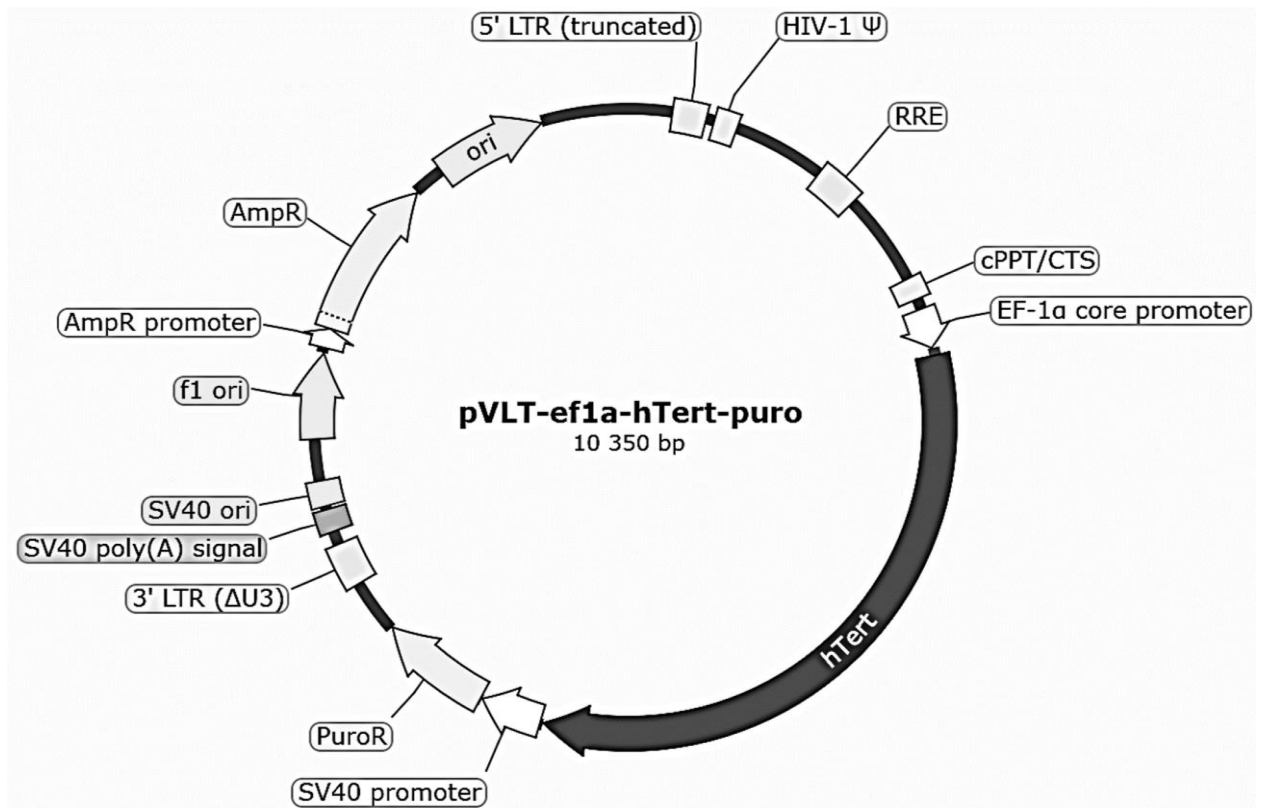


Рисунок 2.1 - Карта лентивирусного вектора переноса pVLT-EF1a-hTERT-puro, кодирующего ген теломеразы человека и ген устойчивости к пурамицину, и предназначенного для иммортализации клеточных культур.

Для обеспечения возможности селекции генетически модифицированных клеток в полученную генетическую конструкцию по сайтам рестрикции Sall и KpnI встраивали кассету экспрессии гена пурамицин N-ацетилтрансферазы, экспрессия которой обеспечивает клеткам возможность роста на среде, содержащей пурамицин до 1 мкг/мл. Карта результирующего вектора переноса приведена на рисунке 2.1.

На основе полученной генетической конструкции собирали лентивирусные частицы, с помощью которых осуществляли иммортализацию первично выделенных МСК человека, как это описано в разделе 2.8.

Экспрессию TERT в генетически модифицированных клетках подтверждали с помощью ПЦР в реальном времени и иммуноблоттинга. Для проведения иммуноблоттинга, лизаты первично выделенных МСК и иммортализованных МСК подвергали электрофорезу в 12% полиакриламидном геле по стандартному протоколу с последующим переносом белков из геля на PVDF-мембрану. Детектирование теломеразы человека на PVDF-мембране осуществляли с помощью антител Anti-Telomerase reverse transcriptase antibody [2C4] (Abcam, США, #ab5181), нормировку осуществляли по содержанию альфа-тубулина (TUBA1A) с помощью антител alpha Tubulin Antibody (B-5-1-2) (Santa Cruz, США, #sc-23948). В качестве вторых антител использовали антитела кролик-против-мыши, меченные пероксидазой хрена, P-RAM Iss (Имтек, Россия). В качестве маркера молекулярного веса использовали - PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (ThermoFisher Scientific, #26616). Проявление окрашенной PVDF-мембраны осуществляли с «помощью набора Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad, США, #1705060). Регистрацию сигнала осуществляли с помощью Bio Rad ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, США).

Функциональную активность TERT подтверждали с помощью наборов Telomerase Activity Quantification qPCR Assay Kit (Sciencell, США, #8928) и Relative Human Telomere Length Quantification qPCR Assay Kit (Sciencell, США, #8908), согласно рекомендациям производителя» [Primak et al., 2024]. Проводили тщательный анализ свойств полученных иммортализованных МСК- см. раздел 2.15. В качестве группы положительного контроля при изучении свойств и характеристике полученных иммортализованных клеточных линий выступала коммерчески доступная линия МСК жировой ткани человека ASC52telo (ATCC, США, #SCRC-4000).

Повышение экспрессии генов BDNF и uPA осуществляли с помощью 2 различных систем: конститутивной и индуцируемой тетрациклином/доксициклином. Параллельная разработка 2 систем экспрессии (конститутивной и индуцируемой) целевых молекул, обладающих нейропротективной активностью, обусловлена тем, что на этапе планирования эксперимента невозможно было предсказать эффективность функционирования каждой из этих систем, а также оценить их влияние на свойства конечных клеточных линий. Для конститутивного или индуцируемого повышения экспрессии генов BDNF и uPA с помощью стандартных молекулярно-биологических методов были собраны генетические конструкции, карты которых приведены на Рисунке 3.20 (Результаты). На основе полученных генетических конструкций собирали лентивирусные частицы, с помощью которых осуществляли генетическую модификацию иммортализованных МСК человека, как это описано в разделе 2.8.

В процессах регенерации нервной ткани критически важную роль играют проангиогенные факторы, составляющие немалую терапевтически активную часть секрета МСК. Для изучения сочетанного действия проангиогенных факторов с BDNF и uPA в модели интрацеребральной посттравматической гематомы нами были созданы линии клеток, гиперэкспрессирующих широкий спектр проангиогенных факторов. Это было достигнуто путем конститутивного (CRISPR/Cas9) и индуцируемого (shRNA) выключения активности белка VHL, являющегося супрессором фактора, индуцируемого гипоксией (HIF-1a). Белок VHL ответственен за убиквитинилирование и инактивацию HIF-1a в условиях нормоксии, что снижает содержание проангиогенных и нейропротективных факторов и микроРНК в составе секрета таких клеток. Выключение активности VHL позволяет поддерживать активность HIF-1a даже в условиях нормоксии, что увеличивает уровень продукции и стабилизирует состав секрета МСК по

широкому спектру ангиогенных и нейропротективных факторов, а также, потенциально, может увеличить терапевтическую ценность секрета МСК.

Для конститутивного выключения активности гена *VHL* использовали модификацию системы CRISPR/Cas9, способную осуществлять редактирование заданных азотистых оснований: деаминирование цитозина в кодирующей области гена *VHL* в составе кодонов CAG, CGA, CAA, что приводит к образованию преждевременного стоп-кодона и нарушению экспрессии целевого белка. Для этого была использована собранная ранее генетическая конструкция Lenti-AncBE-SpCas9(NG)-GFP-NLS (Рисунок 3.20 (Результаты)), которая продемонстрировала свою высокую активность в выключении целевых генов в первичных культурах клеток, в т.ч. МСК. Направляющая РНК 5'-CGTCCCAGTTCTCCGCCCTC была подобрана в соответствии с ранее опубликованными рекомендациями [Karagyaour et al, 2018] и не имела предсказанных нецелевых сайтов редактирования в кодирующей части генома человека. Дуплекс олигонуклеотидов, кодирующих данную направляющую РНК, с помощью стандартных молекулярно-биологических методов был встроен в вектор Lenti-gRNA-RFP (Рисунок 3.20 (Результаты)), собранный ранее для доставки направляющих РНК. «На основе полученных генетических конструкций собирали лентивирусные частицы, с помощью которых осуществляли конститутивный нокаут гена *VHL* в иммортализованных МСК человека» [Primak et al., 2024], как это описано в разделе 2.8. Эффективность редактирования целевого гена *VHL* оценивали путем амплификации целевого локуса ДНК с помощью пары праймеров: 5'-TAGCSTCGCSTCCGTTACAА и 5'-GCCGTCTGAAGTTGAGCCATA.

Для подавления активности гена *VHL* помимо редактирования его гена с помощью технологии CRISPR/Cas9 использовали систему коротких шпилечных РНК (shRNA) к гену *VHL* (5'-AAACAGUCCAGGCUACUCCAUCACAGCAUGGAGUAGCCUGGACUGUUUCC и 5'-AAUCCAUUGGUAGGACCAGAGCACAGCCUCUGGUCCUACSSAAUGGAUCC) под контролем конститутивного и индуцируемого (тетрациклинового)

промоторов. Для этого гены этих shRNA были закодированы в вектора Lenti-Ef1a и Lenti-tetO под контроль конститутивного и индуцируемого промоторов, соответственно (Рисунок 3.20 (Результаты)). Полученные генетические конструкции использовали для сборки лентивирусных частиц, которыми трансдуцировали иммортализованные культуры МСК человека, как это описано в разделе 2.8. Эффективность подавления экспрессии VHL с помощью shRNA оценивали по уровню его мРНК в реакции ПЦР в реальном времени с использованием специфичных праймеров (Таблица 1 Приложения).

Для подтверждения работоспособности индуцируемой системы экспрессии BDNF + uPA и установления оптимальных концентраций индуктора (доксциклина) было проведено титрование концентраций доксициклина (0, 20, 80, 200 и 500 нг/мл) в среде культивирования клеточной культуры МСК, трансдуцированной вирусными частицами, кодирующими гены BDNF и uPA под индуцируемым тетрациклином/доксциклином промотором tetO, с последующим анализом среды культивирования на содержание BDNF и uPA с помощью иммуноферментного анализа, аналогично тому, как описано в разделе 2.5. Доксициклин в соответствующей концентрации добавляли в среду культивирования каждые 48 часов.

Эффективность конститутивного и индуцируемого нокаута VHL косвенно подтверждали оценкой изменения уровня мРНК основных проангиогенных факторов (VEGF и HGF) в лизате генетически модифицированных МСК с помощью ПЦР в реальном времени (последовательности праймеров и параметры ПЦР-реакции приведены в Таблице 1 Приложения). Уровень VEGF и HGF в секрете генетически модифицированных МСК оценивали с помощью иммуноферментного анализа, согласно инструкции производителя (Human VEGF Quantikine ELISA Kit (R&D, #DVE00), Human HGF Quantikine ELISA Kit (R&D, #DHG00)).

2.15 Характеризация immortalized MSC человека

Immortalized MSC служили основой для всех последующих генетических модификаций MSC (конститутивная и индуцируемая гиперэкспрессия BDNF и uPA, конститутивное и индуцируемое подавление VHL), поэтому необходимо было подтвердить, что immortalization существенным образом не изменяет иммунофенотип MSC, не снижает их пролиферативную активность и способствует поддержанию стабильности состава секретора от пассажа к пассажи. В качестве группы положительного контроля при изучении свойств и характеристике полученных immortalized клеточных линий выступала коммерчески доступная линия MSC жировой ткани человека ASC52telo (ATCC, США, #SCRC-4000).

Имунофенотипирование immortalized MSC проводили с «помощью набора MSC Phenotyping Cocktail Kit, anti-human, REAfinity (Miltenyi Biotec, США, #130-125-285) согласно инструкции производителя по наличию MSC-специфичных» [Primak et al., 2024] маркеров: CD73, CD90 и CD105, и отсутствию гематopoэтических и эндотелиальных поверхностных маркеров: CD14, CD20, CD34 и CD45. Пролиферативный потенциал immortalized MSC оценивали путем их пассирования в соотношении 1:3 до момента радикального замедления пролиферативной активности (~35-40 пассажи). Имунофенотипирование immortalized MSC выполнял лаборант Лаборатории регенерации и репарации тканей Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова М.А. Виговский.

Оценку скорости пролиферации immortalized MSC на различных пассажах осуществляли путем их высаживания в лунки 6-луночного культурального планшета в количестве 100 тыс. на лунку с последующей автоматической фотофиксацией с использованием системы IncuCyte® ZOOM Live Cell Analysis System (Essen Bioscience) в течение 120 часов (16 полей зрения на 1 лунку). Анализ полученных изображений осуществляли с помощью встроенного программного обеспечения, путем

наложения «маски» и высчитыванием процента клеточного конfluence. Увеличение конfluence напрямую коррелирует с клеточной пролиферацией и делает возможной оценку скорости пролиферации клеточной культуры. Оценку скорости пролиферации иммортализованных МСК на различных пассажах выполнял лаборант Кафедры биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова Н.С. Волошин.

Стабильность состава секрета оценивали с помощью протеомного анализа (чтобы оценить, как изменился профиль секреции широкого спектра продуцируемых клеткой белков после генетической модификации), иммуноферментного анализа ключевых нейротрофических и ангиогенных факторов (BDNF, uPA, VEGF, HGF).

Для проведения протеомного анализа секретов первично выделенных и иммортализованных МСК использовали клеточные культуры, достигшие 80% конfluence монослоя (по 5-7 100 мм чашек на 1 образец). Их депривировали в течение 16 часов в бессывороточной среде DMEM Low Glucose без фенолового красного (Gibco, #11054020). После чего среду меняли на аналогичную и нарабатывали кондиционированную среду в течение 24 часов. Далее белки кондиционированной среды концентрировали на фильтре с диаметром пор 10кДа более, чем в 100 раз.

Для получения пептидов образцы секретируемых белков, содержащие ~10-30 мкг белка, разводили до концентрации 0.1-0.3 мкг/мл в 50 мМ бикарбонат-аммонийном буфере, pH 8.5, с добавлением 0.05% реагента Rapigest (Waters, #186001861), затем последовательно инкубировали с 2 мМ трис-карбоксиэтилфосфина (Sigma-Aldrich, #C4706-10G) (1 час при 60 °C), с 4 мМ метиметантиосульфата (Sigma-Aldrich, #64306) (15 минут, комнатная температура) и с 4 нг/мл трипсина (ПанЭко, №9002-07-7) (16 часов при 37 °C). После этого к образцам добавляли муравьиную кислоту (Applichem, #131030) до концентрации 0.1% и очищали полученные пептиды на колонках HLB Oasis (Waters, # WAT106202).

Хромато-масс-спектрометрический анализ пептидов проводили на базе ЦКП ГНЦ ФГБУН Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН на приборах Ultimate 3000nano UPLC и TIMS-TOF-PRO. Полученные данные обрабатывали с использованием ПО MaxQuant согласно рекомендациям разработчиков. Пробоподготовку образцов для протеомного анализа и биоинформатический анализ полученных данных осуществляли сотрудники Кафедры биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова М.А. Кулебякина и Е.С. Чечехина.

Иммуноферментный анализ BDNF, uPA, VEGF и HGF осуществляли, как это описано выше.

С помощью ПЦР в реальном времени была изучена стабильность экспрессии мРНК ключевых факторов роста и цитокинов, входящих в состав секрета МСК и обуславливающих его нейропротективные, проангиогенные и иммуномодулирующие свойства, в зависимости от пассажа МСК (последовательности праймеров и параметры ПЦР-реакции приведены в Таблице 1 Приложения). Полученные при характеристике иммортализованной культуры МСК данные сравнивали с аналогичными, полученными для первично выделенных немодифицированных МСК жировой ткани человека.

2.16 Выделение РНК, обратная транскрипция, ПЦР в реальном времени

«Тотальную РНК из клеточных лизатов и осадков выделяли с помощью набора Direct-zol RNA Miniprep (Zymo Research, США, #R2052) согласно инструкции производителя» [Primak et al., 2024]. Все работы с РНК производили на льду, с использованием расходников со степенью чистоты RNase-free. Полученную РНК хранили при -80 °С не более 1 месяца. Синтез кДНК для «проведения ПЦР в реальном времени осуществляли с использованием набора MMLV RT (Евроген, Россия, #SK021) в соответствии с рекомендациями производителя. В качестве праймера для обратной

транскрипции использовали Oligo(dT)15 праймер (Евроген, Россия, #SB001). В качестве матрицы использовали 1-2 мкг РНК (в зависимости от концентрации РНК) на 20 мкл реакционной смеси. Полученную кДНК использовали сразу после приготовления или хранили при -80 °С не более 1 недели. ПЦР в реальном времени осуществляли с использованием смеси 5X qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия, #PK147L) согласно инструкции производителя» [Primak et al., 2024]. В реакцию вносили 2 мкл синтезированной кДНК или тотальной ДНК. Использованные праймеры и параметры ПЦР реакции указаны в Таблице 1 Приложения.

2.17 In vitro модели оценки биологической активности МСК

Чтобы «оценить прямую нейропротективную активность BDNF, uPA, их комбинации и секретомов МСК была использована ранее опубликованную *in vitro* модель нейротоксичности, индуцированной глутаматом [Hu et al, 2012; Nampoothiri et al, 2014]. Эта клеточная модель отражает одну из основных причин гибели нейронов во время инсульта: нейротоксичность, вызванную глутаматом. Для этого клетки нейробластомы человека SH-SY5Y высевали в 48-луночные планшеты в полную питательную среду в количестве 40000 клеток/лунку в четырех повторах. На следующий день среду заменяли на образцы бессывороточной среды (K+), бессывороточной среды» [Karagaur et al, 2021] с 3.5 нг/мкл человеческого рекомбинантного BDNF (rBDNF), кондиционированной среды НЕК293Т, содержащей BDNF (3.5 нг/мкл), uPA (0.4 нг/мкл) или их комбинацию, или секрета МСК (чМСК1х, чМСК10х, чМСК-BDNF или кМСК10х); затем в каждую лунку добавляли L-глутамат до конечной концентрации 100 мМ [Nampoothiri et al, 2014] и реагент для детекции апоптотических процессов IncuCyte® «Caspase-3/7 до конечной концентрации 5 мкМ (Essen Bioscience, #4440, США). В контрольной группе (K-) не добавляли L-глутамат, BDNF или секретом МСК для отслеживания спонтанной гибели клеток в бессывороточной среде. Глутамат вызывает быстрое увеличение цитозольной концентрации Ca²⁺ в клетках SH-SY5Y

(аналогично тому, что происходит в нейронах) с последующей активацией каспазы. Реагент IncuCyte[®] Caspase-3/7 для апоптоза, расщепленный активированной Caspase-3/7, окрашивает ядерную ДНК (флуоресценция в канале GFP). Чтобы контролировать гибель клеток SH-SY5Y, планшеты помещали в систему анализа живых клеток Incucyte[®] ZOOM (Essen Bioscience), расположенную внутри инкубатора с CO₂. Покадровую визуализацию девяти полей зрения (фазовый контраст и флуоресцентный (GFP) канал) для каждой лунки выполняли через 1, 3, 6, 12, 24, 48 и 72 часа после замены среды» [Karagaur et al, 2021; Джауари, 2024]. Оценка прямой нейропротективной активности BDNF, uPA, их комбинации и секретомов МСК была выполнена при методической поддержке лаборанта Лаборатории генно-клеточной терапии Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова к.б.н. Н.А. Александровской.

«Для оценки способности BDNF, uPA, их комбинации и секретомов МСК стимулировать рост нейритов клетки SH-SY5Y высевали в 48-луночные планшеты в полную питательную среду по 40000 клеток/лунку не менее, чем в 5 повторностях. На следующий день среду заменяли на бессывороточную среду (контроль), бессывороточную среду» [Karagaur et al, 2021; Dzhauari et al, 2022] с 3.5 нг/мкл человеческого рекомбинантного BDNF (rBDNF), кондиционированной среды НЕК293Т, содержащей BDNF (3.5 нг/мкл), uPA (0.4 нг/мкл) или их комбинацию, или секретом МСК (чМСК1х, чМСК10х, чМСК-BDNF или кМСК10х). «Чтобы контролировать рост нейритов из клеток SH-SY5Y, планшеты помещали в систему анализа живых клеток Incucyte[®] ZOOM (Essen Bioscience), расположенную внутри инкубатора с CO₂. Покадровую визуализацию девяти полей зрения каждой лунки выполняли через 0, 6 и 24 часа после замены среды. Микрофотографии для расчета процента живых клеток (по сравнению с исходным числом клеток) и оценки скорости роста нейритов анализировали с помощью программного

обеспечения ImageJ (NIH, США). Клеточные отростки длиной более двух диаметров клеток считались нейритами» [Ткачук и др., 2023].

Для оценки способности компонентов секрета МСК направлять поляризацию клеток моноцитарно-макрофагального звена была использована опубликованная ранее *in vitro* модель [Zubkova et al, 2021]. Вкратце, клетки моноцитарно-макрофагального звена получали из периферической крови, как было описано выше, а затем «высаживали на культуральные планшеты с высокоадгезионной поверхностью BD Primaria в концентрации $1.5 \cdot 10^6$ клеток/мл, а планшеты помещали в CO₂-инкубатор на 35-40 минут. После окончания времени инкубации, неприкрепившиеся клетки отмывали, а к оставшимся добавляли бессывороточную культуральную среду X-VIVO™ 15 (Lonza, #BE02-060F) с колониестимулирующим фактором макрофагов (GM-CSF) (SciStore, #PSG030-10) в концентрации 50 нг/мл. Клетки культивировали в течение 8 суток. На 6-й день после выделения популяции моноцитов/макрофагов осуществляли их поляризацию в M1-фенотип путем добавления в среду роста рекомбинантного IFN γ (R&D Systems, #285-IF-100/CF) человека (50 нг/мл) и липополисахарида (10 нг/мл) (SigmaAldrich, #297-473-0) или в M2-фенотип путем добавления в среду роста рекомбинантных IL-4 (R&D Systems, #204-IL-010/CF) (20 нг/мл) и TGF β (Peprotech, #100-21) (20 нг/мл) человека. В часть образцов добавляли 10% 10x секрета МСК человека (конечная концентрация - 1x). Клетки инкубировали в поляризующих средах в течение 48 часов, после чего их снимали с пластика культуральными скребками (TPP, Швейцария), окрашивали на маркеры M1- и M2-фенотипов и анализировали состав популяций с помощью проточной цитометрии BD FACSAria III (BD Biosciences, США). Оценивали также прямое и боковое светорассеяние клеток, для визуализации степени чистоты полученных клеточных популяций. Для оценки эффективности поляризации макрофагов в M1-фенотипа в присутствии или отсутствии компонентов секрета МСК использовали антитела к маркерам CD80 (BD, #566992) и CD86 (BD, #555660). Для оценки эффективности поляризации макрофагов в

M2-фенотип в присутствии или отсутствии компонентов секрета МСК использовали антитела к маркерам CD206 (BioLegend, #141720) и CD209 (BioLegend, #343006). Оценка иммуномодулирующей активности секрета МСК была выполнена сотрудником Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии» МЗ РФ к.б.н. Е.С. Зубковой» [Ткачук и др., 2023; Джауари, 2024].

2.18 Исследование подострой токсичности, мутагенности с прогнозом канцерогенности бицистронной генетической конструкции

Для исследования подострой токсичности бицистронной генетической конструкции, кодирующей BDNF и uPA, крыс разделили на 3 группы (Таблица 2.1). Все инъекции осуществляли ежедневно внутримышечно в течение 30 суток. На «30-й день эксперимента по 5 самцов и 5 самок из каждой группы были подвергнуты эвтаназии передозировкой CO₂ для проведения диагностической аутопсии и забора органов. Вторую часть животных оставляли для наблюдения за возможным отсроченным негативным действием плазмиды» [Karagyaug et al, 2021a]. На 60-й день эксперимента их подвергали эвтаназии аналогичным образом. При внешнем осмотре обращали внимание на возможные деформации, отеки, выделения из естественных отверстий, состояние шерсти, зубов и слизистых оболочек. При вскрытии оценивали состояние плевры и брюшины, грудной и брюшной полостей.

Таблица 2.1 - Описание контрольной и экспериментальных групп при проведении исследования подострой токсичности бицистронной плазмидной конструкции pNCure

Группа	Описание экспериментальных животных	Вводимый препарат
Tox1 (отрицательный контроль)	10 самцов и 10 самок крыс популяции Вистар, 180-200 г	стерильный 0.9% раствор хлорида натрия (физиологический раствор)

Тох2 (эксперимент)	10 самцов и 10 самок крыс популяции Вистар, 180-200 г	0.118 мг/кг плазмиды pNCure
Тох3 (эксперимент)	10 самцов и 10 самок крыс популяции Вистар, 180-200 г	2 мг/кг плазмиды pNCure

Поскольку BDNF, закодированный в бицистронной генетической конструкции pNCure, играет ключевую роль в функционировании периферической и центральной нервной системы [Boyd et al, 2003; Гомазков, 2006], оценивали возможные побочные эффекты на неврологический статус и поведение экспериментальных животных. Поведение крыс изучали в тесте «Открытое поле» на 29-й и 59-й день эксперимента. Основные показатели этого теста отражали двигательную активность (пройденное расстояние, время в движении), ориентировочно-исследовательское поведение (количество обследованных норок, количество стоек, количество выходов в центр манежа) и тревожность (время груминга, количество дефекаций, время нахождения в центре арены, латентный период выхода в центр арены).

Потенциальную мутагенность бицистронной генетической конструкции pNCure изучали с помощью анализа ДНК-комет *in vivo* [Olive et al, 2006; OECD Guidelines for the Testing of Chemicals]. Для исследования мышей разделили на 4 группы (Таблица 2.2).

Мышей умерщвляли в «среде CO₂ через 3 часа (для 20 мг/кг pNCure или метилметансульфоната (Sigma-Aldrich, #129925)) или через 24 часа (для 200 мг/кг pNCure или физиологического раствора) после инъекций. От каждой мыши были получены обе бедренные кости, печень, головной мозг и бедренная мышца» [Karaguyur et al, 2021a], в которую осуществляли инъекцию. Эпифизы бедренной кости отрезали и клетки костного мозга вымывали 2 мл холодного PBS pH 7.5, содержащего 20 мМ ЭДТА-Na₂ (Sigma-Aldrich, #D2900000) и 10% ДМСО (Applichem, #A3672). Каждый образец печени, головного мозга и бедренной мышцы гомогенизировали в 2 мл

свежего буфера того же состава. 60 мкл полученной клеточной суспензии смешивали с 240 мкл 1% легкоплавкой агарозы в PBS, нагревали до 36°C.

Таблица 2.2 - Описание контрольных и экспериментальных групп при изучении потенциальной мутагенности бицистронной плазмидной конструкции pNCure

Группа	Описание экспериментальных животных	Вводимый препарат
Mut1 (отрицательный контроль)	5 самцов мыши F1 СВА/С57В1 20-22 г (8-9 недель)	стерильный 0.9% раствор хлорида натрия (физиологический раствор), внутримышечно, 100 мкл
Mut2 (эксперимент)	5 самцов мыши F1 СВА/С57В1 20-22 г (8-9 недель)	pNCure, 20 мг/кг, внутримышечно, однократно
Mut3 (эксперимент)	5 самцов мыши F1 СВА/С57В1 20-22 г (8-9 недель)	pNCure, 200 мг/кг, внутримышечно, однократно
Mut4 (положительный контроль)	5 самцов мыши F1 СВА/С57В1 20-22 г (8-9 недель)	метилметансульфонат 40 мг/кг, интраперитонеально, однократно

60 мкл полученной клеточной суспензии в агарозе наносили на предметные стекла, покрытые агарозой, накрывали покровным стеклом и помещали на лед. Через 10 минут покровные стекла удаляли и иммобилизованные клетки лизировали не менее 1 часа в буфере 10 мМ Tris-HCl [pH 10], 2.5 М NaCl, 100 мМ ЭДТА-Na₂, 1% Тритон X-100 (Sigma-Aldrich, #T8787), 10% ДМСО. Затем предметные стекла инкубировали в 300 мМ NaOH (Sigma-Aldrich, #S5881), 1 мМ ЭДТА-Na₂ [pH > 13] в течение 20 минут и проводили электрофорез при 1 В/см в течение 20 минут. «Предметные стекла промывали в течение 10 мин в PBS, фиксировали в течение 15 мин в 70% этаноле. Предметные стекла высушивали и окрашивали SYBR Green I (Sigma-Aldrich, #S9430) (1:10000 в буфере TE [pH 8.5] с 50% глицерином, непосредственно перед исследованием в течение 30 минут в темноте»

[Karagyaur et al, 2021a]. Образцы визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа (увеличение 200x). Полученные изображения анализировали с помощью программы CASP 1.2.2 [Konca et al, 2003]. Для каждого образца анализировали не менее 100 ДНК-комет. В качестве индикатора использовали процент фрагментированной ДНК в хвосте ДНК-комет (% ДНК в хвосте).

Потенциальную генотоксическую активность pNCure оценивали с использованием модели спонтанной соматической рекомбинации у дрозофил [Ávalos et al, 2015; Neurokoeva et al, 2015]. Были использованы две линии дрозофилы: линия_1 (генотип $y1, sn3^{+}/y1, sn3^{+}$) и линия_2 (генотип $y1^{+}, sn3/y1^{+}, sn3$). Девственных самок дрозофилы линии_2 скрещивали с самцами дрозофилы линии_1. Каждые 8 часов меняли чашки с питательной средой для максимальной синхронизации возраста эмбрионов мух. 1-часовых гибридных зародышей собирали на сите и промывали водой, 96% этанолом и снова водой, промывание повторяли. Затем эмбрионы переносили на покрывное стекло и покрывали вазелиновым маслом. «Микроинъекции 1 мг/мл растворов плазмид (контрольная плазида pVax1 или pNCure) или раствора циклофосамида (10 мкМ или 1 мМ) выполняли через хорион» [Karagyaur et al, 2021a] в полярную область плазмы яйца с помощью предварительно заточенной иглы. Примерный объем инъецированной смеси составил 0.02 мкл. По окончании инъекций покрывное стекло с зародышами перемещали во влажную камеру. Через сутки собирали личинок одного возраста и переносили в пробирку со стандартной питательной средой. В каждой экспериментальной группе были проведены инъекции более, чем 200 эмбрионов, но только около 50% из них превратились в самок. В группе отрицательного контроля гибридные зародыши оставались интактными, чтобы выявить базовый уровень соматической рекомбинации у дрозофил. С 9-го по 18-й день эксперимента новое поколение мух-дрозофил изучали с помощью бинокулярного стереоскопического микроскопа в отраженном свете. Регистрировали общее количество просканированных самок, количество самок с одиночными (y, sn)

и двойными (y, sn) пятнами, мутантными щетинками (макрохеты на голове, груди и щитке) желтого или скрученного фенотипа. Оценка генотоксической активности pNCure была выполнена при методической поддержке профессора РАН д.б.н. Ю.В. Шидловского и к.б.н. Е.Н. Козлова (ФГБУН Институт биологии гена РАН)

2.19 Исследование биораспределения и эктопической экспрессии бицистронной генетической конструкции в организме мыши

Для изучения диссеминации плазмиды и возможности ее эктопической экспрессии мыши были рандомизировано разделены на две группы: «pNCure_1» и «pNCure_2» по 12 мышей в каждой. «Плазмиду pNCure вводили в 60 мкл стерильного 0.9% солевого раствора в левую переднюю большеберцовую мышцу в дозе 60 мкг/мышь для pNCure_1 (1 мг/мл) или 120 мкг/мышь для pNCure_2 (2 мг/мл). Инъекции повторяли на 4, 9, 13 сутки эксперимента. Дозы плазмид, временные точки и техника введения были такими же, как было выше (см. раздел 2.6) при изучении биологической активности данной генетической конструкции *in vivo*» [Karagyaur et al, 2021a]. Двух мышей не подвергали манипуляциям - они послужили донорами тканей для приготовления контрольных и калибровочных образцов.

На 20-й, 27-й и 41-й день от начала эксперимента (т. е. через 1, 2 и 4 недели после последней внутримышечной инъекции) забивали по 4 мыши из каждой группы. У них «забирали образцы крови (300-400 мкл) и органов (легкие, печень, почки, селезенка, сердце, головной мозг, мышечная ткань из места инъекции и из контралатеральной конечности)» [Karagyaur et al, 2021a]. Образцы органов брали в двух повторностях (~20 мг для ПЦР в реальном времени и ~100 мг для ИФА). На 20-й день двух необработанных мышей умерщвляли и обрабатывали таким же образом. Образцы крови коагулировали при комнатной температуре в течение 12 часов, а сыворотку отделяли центрифугированием при 13000g в течение 10 минут. По готовности все

образцы органов и сыворотки (150 мкл) немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до исследования.

Для выделения ДНК использовали модифицированный протокол, ранее описанный для генотипирования мышей [Genomic DNA Preparation Protocol]. «Образцы органов и тканей взвешивали (17-25 мг) и диссоциировали в 200 мкл лизис буфера, содержащего 50 мМ Трис (pH 8.0), 100 мМ ЭДТА- Na_2 , 0.5% додецилсульфата натрия (Panreac, #132363.1211) и 0.7 мг/мл протеиназы К (Sigma-Aldrich, #P6556), при 56°C в течение 18-24 часов с периодическим аккуратным встряхиванием пробирок до полного растворения образца ткани. Полученные лизаты хранили при температуре -20°C до ПЦР-тестирования в реальном времени» [Karagyaur et al, 2021a]. Тотальную ДНК из образцов сыворотки (150 мкл) экстрагировали в соответствии со стандартным протоколом экстракции фенолом (Sigma-Aldrich, #P1037) и хлороформом (Компонент-Реактив, #3841.1000), осаждали 2-пропанолом (Appllichem, #A3928,2500PE), промывали 70% этанолом и восстанавливали в 150 мкл деионизированной воды.

Лизаты органов и тканей (но не образцы ДНК из сыворотки) «разводили в 10 раз деионизированной водой и использовали эти образцы ДНК в качестве матрицы для ПЦР в реальном времени из расчета 1 мкл на 25 мкл реакционной смеси. Все ПЦР в реальном времени проводили с использованием набора для ПЦР в реальном времени qPCRMix-HS SYBR (Евроген, #PK147L) с использованием праймеров для идентификации плазмидной ДНК: 5'-CATCACCААСТGGGACGACA и 5'-TAGCCACATACATGGCAGGC ($59\text{ }^{\circ}\text{C}$, 180 bp), для идентификации геномной ДНК» [Karagyaur et al, 2021a] (ген Acta1): 5'-CAGTGCCGAАСТACCCAGT и 5'-CAGGGGAGTGATСТАТGGTGG ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 180 bp). ПЦР-амплификацию проводили в термоциклере iCycler, оборудованном системой детекции iQ5 (Bio-Rad). Регистрацию флуоресцентного сигнала (SYBR) в канале FAM и анализ полученных результатов проводили с помощью программы CFX Manager Software (Bio-Rad). Для оценки уровня сигнала использовали

параметр ΔC_t кривых ПЦР в реальном времени: ΔC_t обратно пропорционален количеству искомой ДНК в исходной реакционной смеси. Для контроля качества ДНК параллельно с pNCure идентифицировали ген мышечного актина альфа-1 (Acta1), который выступал в роли внутреннего контроля. Каждый образец анализировали в трех повторностях. «Экспериментально установленное количество плазмидной ДНК нормализовали к массе лизированного образца органа или ткани.

Для оценки эктопической экспрессии рекомбинантного BDNF человека в органах и тканях мыши» [Karagyaur et al, 2021a] с наибольшим содержанием плазмиды pNCure (по результатам ПЦР в реальном времени) измеряли его «концентрацию в гомогенатах образцов тканей с помощью набора для иммуноферментного анализа Human Free BDNF Quantikine ELISA Kit (R&D, #DBD00) согласно инструкции производителя» [Dzhauari et al, 2022]. Для этого образцы тканей гомогенизировали в пробирках объемом 1.5 мл в 100 мкл PBS, содержащего 2х коктейль ингибиторов протеаз (Promega, #G6521), с использованием Bead ruptor 4 (Omni, #25-010). Полученные лизаты пропускали несколько раз через иглу инсулинового шприца и осветляли центрифугированием при 13000g и 4 °C в течение 10 минут. Полученные супернатанты использовали для анализа. В ходе ИФА оценивали только уровень BDNF, так как благодаря дизайну pNCure продукция BDNF была в 10 раз больше, чем продукция uPA [Jubin et al, 2000; Karagyaur et al, 2020].

2.20 Исследование потенциальной трансформирующей активности секретома иммортализованных МСК

Результаты исследований показали, что секретом МСК, как совокупность белковых и небелковых факторов способна оказывать выраженный нейропротективный и прорегенераторный эффект в модели интрацеребральной посттравматической гематомы. Поскольку повреждения мозговой ткани представляют собой острую и нерешенную медико-социальную проблему, установленная нейропротективная активность

секретом МСК может послужить мощной предпосылкой для разработки на его основе лекарственного препарата, способного замедлить прогрессию повреждения мозговой ткани при целом ряде патологий, сопровождающихся повреждением головного мозга. Результаты анализа мировой литературы и наших собственных исследований (ограниченный пролиферативный потенциал и быстрое старение первично выделенных МСК) свидетельствуют о том, что реальные перспективы выхода в клиническую практику имеют лишь продукты стандартизованных охарактеризованных клеточных линий, например, иммортализованных МСК. С другой стороны, клиническое использование таких линий может быть сопряжено с риском опухолевой трансформации, поскольку в состав секрета входит широкий спектр факторов роста и антиапоптотических молекул, а секретом иммортализованных МСК еще потенциально может содержать теломеразу или кодирующие ее нуклеиновые кислоты.

Безопасность секрета первично выделенных МСК была продемонстрирована ранее в целом ряде исследований [Moll et al, 2020; Fathi-Kazerooni et al, 2022; Giovannelli et al, 2023], и было показано, что сам по себе он не обладает канцерогенным действием и не способен вызывать опухолевую трансформацию [Silver et al, 2000; Onzi et al, 2016]. Вопрос способности иммортализованных клеточных культур вызывать опухолевую трансформацию остается открытым.

Для изучения потенциальной трансформирующей активности секрета иммортализованных линий МСК были изучены:

- способность теломеразы переноситься в составе секрета в виде ДНК, РНК или белка;
- способность индуцировать образование колоний первично выделенных фибробластов дермы в тесте soft agar colony formation assay;
- транскриптом первично выделенных фибробластов дермы после воздействия секрета первично выделенных и иммортализованных МСК на предмет изменения экспрессии проонкогенов и антионкогенов.

Для обнаружения теломеразы или кодирующих ее нуклеиновых кислот в секретоме иммортализованных МСК наработку секретомы иммортализованными МСК проводили, как это описано ранее (см. раздел 2.9). Для увеличения вероятности детекции теломеразы или кодирующих ее нуклеиновых кислот секретом был сконцентрирован в 100 раз с помощью «картриджей для ультрафильтрации с отсечкой молекулярной массы менее 10 кДа (Merck, Германия)» [Ткачук и др., 2023].

Для изучения способности теломеразы переноситься в составе секретомы иммортализованных МСК в виде ДНК (внехромосомная ДНК, фрагменты ДНК из лизированных клеток и т.п.) проводили фенол-хлороформную экстракцию тотальной ДНК (с переосаждением изопропанолом) из 100х секретомы иммортализованных клеток. Полученную ДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР в реальном времени, как это описано в разделе 2.16 (последовательности праймеров и параметры ПЦР-реакции приведены в Таблице 1 Приложения).

Для изучения способности теломеразы переноситься в составе секретомы иммортализованных МСК в виде РНК (в составе внеклеточных везикул, РНК из лизированных клеток и т.п.) проводили экстракцию тотальной РНК из 100х секретомы иммортализованных клеток. Полученную РНК использовали в качестве матрицы для обратной транскрипции, с последующим проведением ПЦР в реальном времени, как это описано в разделе 2.16 (последовательности праймеров и параметры ПЦР-реакции приведены в Таблице 1 Приложения).

Для изучения способности теломеразы переноситься в составе секретомы иммортализованных МСК в виде белка (секретируемого, в составе внеклеточных везикул или содержимого лизированных клеток) был проведен электрофорез белковых образцов 100х секретомы иммортализованных МСК. Для этого использовали 12% полиакриламидный гель и стандартные параметры электрофореза и переноса на «PVDF-мембрану с последующей блокировкой неспецифического связывания антител

раствором 5% обезжиренного сухого молока (Applichem, #A0830,0500) на фосфатно-солевом буфере, содержащем 0.1% Tween 20 (Merck, США, #P1379-100ML)» [Primak et al., 2024]. Детектирование теломеразы человека на PVDF-мембране осуществляли с помощью антител Anti-Telomerase reverse transcriptase antibody [2C4] (Abcam, США, #ab5181), нормировку осуществляли по содержанию альфа-тубулина (TUBA1A) с помощью антител alpha Tubulin Antibody (B-5-1-2) (Santa Cruz, США, #sc-23948). Согласно ранее опубликованным данным белки цитоскелета могут быть обнаружены в клеточном секрете ввиду фонового лизиса клеток-продуцентов. В качестве вторых антител использовали антитела кролик-против-мыши, меченные пероксидазой хрена, P-RAM Iss (Имтек, Россия). В качестве маркера молекулярного веса использовали - PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (ThermoFisher Scientific, #26616). Проявление окрашенной PVDF-мембраны осуществляли с помощью набора Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad, США, #1705060). Регистрацию сигнала осуществляли с помощью Bio Rad ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, США).

Одним из рекомендованных способов оценки потенциальной трансформирующей активности [Миронов и др, 2012; Борисевич и др, 2014] лекарственных кандидатов является soft agar colony formation assay, базирующийся на способности трансформированных (опухолевых клеток) формировать в агаре колонии. Для проведения этого анализа были использованы первично выделенные фибробласты дермы человека на 5-8 пассаже (от 2 различных доноров). Дно лунок 12-луночного планшета предварительно покрывали 1% раствором агарозы (Panreac, #A2114,0250) на DMEM без сыворотки и антибиотика, стерилизованным автоклавированием. Фибробласты деадгезировали от поверхности пластика последовательным промыванием растворами Версена (ПанЭко, #P080п) и Трипсина-ЭДТА (ПанЭко, #П034), центрифугировали, ресуспендировали в полной среде роста, пропускали через клеточное сито Falcon® 40 µm Cell Strainer (Corning, США, #352340) для избавления от клеточных агрегатов и подсчитывали их

концентрацию в камере Горяева. Стерилизованный автоклавированием раствор 0.8% агарозы на DMEM без сыворотки и антибиотика, охлажденный до 39 °С, смешивали с эквивалентным объемом DMEM, содержащим 2х раствор L-Gln (Gibco, #11539876), 2х раствор смеси антибиотика/антимикотика (Gibco, #15240062) и 10% бычьего сывороточного альбумина, стерилизованным фильтрованием через фильтры с диаметром пор 0.2 мкм и подогретым до температуры 39 °С. В полученную смесь раствора агарозы и DMEM вносили подготовленные первично выделенные фибробласты дермы человека из расчета 1000 клеток на 1 мл конечной смеси, аккуратно перемешивали, избегая образования пузырей и по 500 мкл наносили в отдельные лунки предварительно подготовленного 12-луночного планшета. Планшет оставляли в стерильных условиях при комнатной температуре на 40 минут для полимеризации агарозы. Затем поверх заполимеризовавшейся агарозы аккуратно наносили исследуемые растворы (по 500 мкл): сконцентрированный в 10 раз секретом первично выделенных или иммортализованных МСК (см. раздел 2.9). В группе отрицательного контроля наносили полную среду роста фибробластов (см. раздел 2.2). В группах положительного контроля для стимуляции трансформации клеток использовали известные мутагены: 3мМ нитрит натрия (NaNO_2) и 0.01% диметилсульфат (DMS) на полной среде роста [Kodama et al, 1976; Mukhailenko et al, 2019]. Замену исследуемых растворов проводили каждые 3 суток в течение 2 недель. В группе DMS через 6 часов после добавления индуцирующей среды ее заменяли на полную среду роста, которую и использовали для дальнейшего культивирования клеток в этой группе, поскольку инкубация в среде роста, содержащей DMS, в течение более 24 часов вызывала гибель всей клеточной культуры. Фотографирование клеток осуществляли сразу после заключения в агарозу и добавления сред роста (точка 0 суток) для подтверждения отсутствия клеточных агрегатов в начале эксперимента, а также через 3, 7 и 14 дни от начала эксперимента с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti (Nikon, Япония), оснащенного

камерой, в проходящем свете. При анализе изображений учитывали количество (абсолютное и относительное) одиночных клеток, клеточных дуплетов и многоклеточных структур в каждой из экспериментальных и контрольных групп.

Трансформирующая активность лекарственного кандидата потенциально может быть незаметна фенотипически, но она может привести к дисбалансу экспрессии проонкогенов и антионкогенов и проявиться фенотипически лишь в отсроченном периоде. Для оценки такой потенциальной отсроченной трансформирующей активности секрета иммортализованных МСК был проанализирован транскриптом первично выделенных фибробластов дермы человека, культивированных в секрете первично выделенных или иммортализованных МСК. Для этого первично выделенные фибробласты дермы человека 5-8 пассажей (от 2 различных доноров) растили в полной среде роста на 100 мм культуральных чашках в стандартных условиях культивирования до достижения 80-90% конfluence, а затем среду роста заменяли на 1x секретом первично выделенных или иммортализованных МСК (по 7 мл на чашку). В группе отрицательного контроля культивирование проводили в полной среде роста фибробластов (см. раздел 2.2). В группах положительного контроля для стимуляции трансформации клеток использовали известные мутагены: 3мМ нитрит натрия (NaNO_2) и 0.01% диметилсульфат (DMS) на полной среде роста [Kodama et al, 1976; Mykhailenko et al, 2019]. В группе DMS через 6 часов после добавления индуцирующей среды ее заменяли на полную среду роста, которую и использовали для дальнейшего культивирования клеток в этой группе, поскольку инкубация в среде роста, содержащей DMS, в течение более 24 часов вызывала гибель всей клеточной культуры. Смену среды роста в чашках проводили каждые 3 суток, а через 7 суток после начала эксперимента фибробласты деадгезировали последовательным промыванием растворами Версена (ПанЭко, #P080п) и Трипсина-ЭДТА (ПанЭко, #П034), подсчитывали количество клеток в каждой из групп, центрифугировали и дважды отмывали

от компонентов среды культивирования стерильным раствором Хэнкса (ПанЭко, #P020П). Полученный осадок фибробластов замораживали в жидком азоте и хранили до момента исследования при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Из полученных клеточных осадков выделяли тотальную РНК, как это описано в разделе 2.16, которую затем использовали для транскриптомного анализа. Качество выделенной тотальной РНК оценивали с помощью Bioanalyzer 2100 (Agilent). Количество и чистоту РНК оценивали на NanoPhotometer (Implen). 800 нг суммарной РНК использовали для создания библиотек с помощью NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module и NEBNext® Ultra II™ Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs) в соответствии с инструкцией производителя. Качество библиотек проверяли на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent), а выход подтверждали методом qPCR. Затем библиотеки секвенировали на приборе NovaSeq6000 (Illumina) с парным считыванием по 61 п.н. Транскриптомный анализ лизатов фибробластов был выполнен в.н.с. Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО "Казанский (Приволжский) федеральный университет", к.б.н. Е.И. Шагимардановой.

Анализ экспрессии генов (распределение экспрессии и сравнительный анализ экспрессии между образцами) осуществляли в программах STAR, Subread и DESeq2. Для полученных в результате анализа списков генов проводили аннотацию с использованием ресурса g:Profiler, что позволило установить ключевые процессы, в которых они участвуют.

2.21 Статистический анализ

«Статистический анализ проводили с использованием программы SigmaPlot11.0 (Systat Software, Inc.; Германия). Численные данные оценивали на нормальность распределения с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Различия между группами анализировали с использованием t-критерия Стьюдента (для попарных сравнений) или дисперсионного анализа (ANOVA): тесты Ньюмена-Кейлса и Сидака-Холма - для множественных

сравнений, если распределение являлось нормальным. Для сравнения групп данных с распределением, отличным от нормального, использовали дисперсионный анализ (ANOVA) по рангам (критерий Данна). Данные представлены, как среднее значение \pm стандартное отклонение или медиана (25%; 75%) в зависимости от используемого теста. Для анализа выживаемости экспериментальных животных и построения кривых выживаемости использовался метод Каплана-Мейера (лог-ранк-тест)» [Карагяур, 2013].

«Для анализа категориальных данных (неврологическое состояние после инсульта) использовали точный критерий Фишера: группы BDNF, чМСК1х, чМСК10х, чМСК-BDNF и кМСК10х попарно сравнивали с контрольной группой. Поскольку точный критерий Фишера поддерживает только массивы 2×2 (χ^2 неприменим для малых групп), пропорции животных были объединены в две группы: «визуально здоровые животные» + «с легкими неврологическими нарушениями», «с тяжелыми неврологическими нарушениями» + «погибшие». Различные моменты времени сравнивались по отдельности» [Karagyaur et al, 2021; Dzhauari et al, 2022; Dzhauari et al, 2023].

Для всех типов проведенного статистического анализа значимыми считали различия между группами при $p < 0.05$.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Обоснование выбора комбинации факторов, обладающих протективной и прорегенераторной активностью в отношении нервной ткани

Состояние проблемы на момент исследования. Процессы повреждения и регенерации тканей и органов являются многоэтапными и вовлекают большое количество молекулярных и клеточных участников [Sorby-Adams et al, 2017; Sifat et al, 2017; Bernardo-Castro et al, 2020; Andrzejewska et al, 2021]. Несмотря на активное изучение, роль многих из них, как и вопросы координации активности между ними, остаются неизвестными. Все более становится очевидным, что для противодействия повреждению и эффективной стимуляции регенерации необходимо сочетанное и координированное воздействие на их ключевые этапы. Это подтверждается большим количеством доклинических и клинических исследований, направленных на стимуляцию регенерации, в которых демонстрируется превалирование эффективности комплексных терапевтических подходов над монокомпонентными [Gupta et al, 2009; Makarevich et al, 2015].

Для процессов повреждения и регенерации нервной ткани, помимо этого, характерен еще и ряд особенностей: быстрое расширение очага повреждения, невозможность полноценной спонтанной регенерации, высокая вероятность возникновения жизнеугрожающих состояний [Lok et al, 2011; Sun, 2014]. Это обусловлено сложностью архитектоники нервной системы, исключительностью (невозможностью замены) отдельных ее элементов, высокой чувствительностью к трофическим сигналам от окружающих тканей и наличием большого количества различных ингибирующих сигналов в зрелой нервной системе (в основном, в ЦНС).

Ввиду сказанного выше самым эффективным подходом для снижения негативных последствий повреждений нервной системы на сегодняшний день считается нейропротекция. Она возможна благодаря тому, что абсолютное большинство патогенетических процессов (в т.ч. и в нервной ткани) не

молниеносны, а развернуты во времени, что открывает возможность воздействовать на них и купировать их негативные последствия.

Основными молекулами, осуществляющими поддержку и «стимулирующими регенерацию нервной ткани, считаются нейротрофические факторы из семейств фактора роста нервов (nerve growth factor, NGF), глиального нейротрофического фактора (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) и нейроцитокинов [Boyd et al, 2003; Гомазков, 2006]. Они способны стимулировать выживание нервных клеток, рост их нейритов (аксонов и дендритов)» [Карагяур, 2013], установление и поддержание синаптических связей. При этом для них характерна тропность к определенным типам нейральных клеток и низкий поддерживающий уровень экспрессии. Острое повреждение в центральной нервной системе индуцирует повышение их экспрессии, однако, последняя возрастает недостаточно быстро, что не позволяет оперативно купировать расширение и прогрессирование повреждения [Boyd et al, 2003]. Также, эндогенная экспрессия нейротрофических факторов зачастую ограничена 2-4 неделями, что делает полноценную регенерацию поврежденной нервной ткани практически невозможной в такой короткий срок (Рисунок 1.2, Обзор литературы) [Boyd et al, 2003]. Помимо этого, для нейротрофинов из семейства «NGF (сам NGF, мозговой нейротрофический фактор (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), нейротрофины-3/-4 (NT-3, NT-4)) характерна бифункциональная активность» [Карагяур, 2013]: в зрелой форме (после отщепления пропептида) они связываются преимущественно с рецепторами класса тирозинкиназ TrkA, TrkB и TrkC, «запуская выживание и регенерацию нейральных клеток, а в форме пропептида – с низкоаффинным рецептором p75NTR, который запускает процессы апоптоза нейральных клеток» [Карагяур, 2013; Boyd et al, 2003; Гомазков, 2006; Gordon et al, 2009].

На основе сказанного выше можно сделать вывод о том, что для обеспечения эффективной нейропротекции мозговой ткани эндогенной продукции нейротрофических факторов недостаточно: их экспрессия

запускается слишком поздно и длится недолго. Экзогенное введение рекомбинантных нейротрофических факторов рассматривается, как один из терапевтических подходов для стимуляции протекции и регенерации нервной ткани [Wang et al, 2016; Idrisova et al, 2022], «при этом необходимо обеспечить преобладание зрелых форм нейротрофинов семейства NGF во избежание нежелательных эффектов, описанных выше, и, по возможности, обеспечить комплексность нейропротективного и прорегенераторного воздействия за счет привлечения функционально комплементарных (дополняющих) молекул» [Карагяур, 2013; Karagyaur et al, 2020]. Поскольку данный вопрос изучен крайне мало, а повреждения центральной и периферической ткани представляют собой острую и нерешенную медико-социальную проблему, мы посвятили данное исследование поиску сочетаний таких молекул и изучению их свойств в клинически релевантных моделях повреждения центральной и периферической нервной ткани.

3.1.1 Анализ факторов, обладающих нейропротективной и прорегенераторной активностью, и поиск их перспективных сочетаний

Ранее было продемонстрировано, что «генетическая конструкция pVax1-hBDNF, кодирующая ген мозгового нейротрофического фактора человека, способна стимулировать нейропротекцию, структурную и функциональную регенерацию волокон периферического нерва после травмы» [Карагяур, 2013; Karagyaur et al, 2015]. Однако, сравнительный анализ результатов исследования pVax1-hBDNF с таковыми для мезенхимных мультипотентных стромальных клеток (МСК, которые считаются одним из основных стимуляторов и регуляторов регенеративных процессов [Калинина и др, 2011; Rajarinen et al, 2019; Li X et al, 2022]) на аналогичной модели, показал, что МСК обладают более выраженным нейропротективным и прорегенераторным эффектом [Lopatina et al, 2011; Карагяур, 2013]. Анализ механизмов их нейропротективной активности показал, что в основном он обусловлен их

секреторной активностью, т.е. способностью продуцировать широкий спектр факторов роста, «цитокинов, ферментов, белков матрикса и микроРНК, многие из которых обладают нейропротективной и прорегенераторной активностью» [Loratina et al, 2011; Kalinina et al, 2015]. Совокупность молекул, продуцируемых клетками (в частности, МСК), получила название «секретом». В его составе были идентифицированы и нейтрофические факторы, в том числе, BDNF, хотя в количестве значительно меньшем (0.81 ± 0.63 нг/мл), чем способна обеспечить экспрессия оптимизированной генетической конструкции [Karagyaug et al, 2015]. Мы «предположили, что такой более выраженный нейропротективный эффект секрета МСК по сравнению действием генетической конструкции pVax1-hBDNF, кодирующей лишь один нейропротективный ген, может быть обусловлен содержанием широкого спектра факторов» [Карагяур, 2013] (белковых и небелковых) и, соответственно, комплексностью его действия. Мы провели биоинформатический анализ протеома секрета МСК, полученный нами ранее [Kalinina et al, 2015], и вычленили основные группы белковых молекул, потенциально обладающие нейропротективной и прорегенераторной активностью:

1. нейротрофические факторы и нейропоэтические цитокины (BDNF, GDNF, NGF, LIF, IL-6);
2. проангиогенные факторы (VEGF, HGF, uPA, PlGF, PDGF, ангиопоэтин, ангиопоэтин-подобные белки-2/-4, фоллистатин, ингибин А, мидкин, MMP-2/-9, TIMP-1/-2, лептин, VASN);
3. противовоспалительные цитокины (TGF β , IDO, IL-4, IL-10, IL-13);
4. другие факторы роста и белки, обладающие нейропротективной активностью (bFGF, EGF, IGF-I, KGF, SDF-1, нейрегулины, TCN2, NEGR1, GMFB, HDGF, CTGF, PEDF, NENF, а также белки, связывающие инсулиноподобный фактор роста);
5. белки матрикса (фибронектин, коллаген-1a1/-4a1, ламинин-a2/b2, периостин, нейролигин-2, нидоген-1/-2);

Помимо названных, в составе секрета «МСК» были идентифицированы провоспалительные цитокины (IL-1A, IL-6, IL-8, IL-12, TNF α , G-CSF, M-CSF), белки, ассоциированные с разрушением клеток (цитоплазматические, ядерные, рибосомальные, митохондриальные и мембранные белки), и другие молекулы, для которых не существует однозначных данных об их способности стимулировать процессы нейропротекции или регенерации в нервной ткани» [Карагяур, 2013].

Исследования последних лет, также показывают, что в секрете МСК содержится также широкий спектр микроРНК, обладающих нейропротективной (miR-9, miR-15a, miR-113b, miR-132, miR-17-92 и др.) [Ma et al, 2018; Xin et al, 2021] и ангиогенной активностью (miR-9, miR-21, miR-132, miR-182, miR-377 и др.) [Xiao et al, 2021; Han Y et al, 2022], однако, изучение некодирующих РНК в составе секрета МСК не является объектом данного исследования.

Изучение состава молекулярного «коктейля», продуцируемого МСК, и функциональной значимости каждого из его компонентов позволит лучше понять фундаментальные механизмы регенерации поврежденной ткани, а также принципы координации отдельных этапов и звеньев регенеративных процессов. Предположительно, это заложит основы к возможности управления этим процессом и его стимуляции в будущем, а также позволит разработать принципиально новые терапевтические подходы и лекарственные препараты.

Как уже было отмечено выше, критически важными молекулами для поддержания и регенерации нервной ткани являются нейротрофические факторы, что позволяет рассматривать одного из их представителей, как основу для разработки нейропротективной композиции молекул. Среди прочих нейротрофических факторов для разработки такой композиции был выбран BDNF, который, согласно данным мировой литературы, обладает одним из самых широких спектров нейропротективной и нейротрофической активности (по сравнению с другими нейротрофинами), как в центральной, так

и периферической нервной системе [Boyd et al, 2003; Гомазков, 2006]. Нарушения экспрессии BDNF ассоциированы с развитием неврологических и психических заболеваний [Lee et al, 2015; Su et al, 2021], а его нокаут приводит к постнатальной гибели экспериментальных животных [Ito et al, 2011; Ernfors et al, 2014]. Нейропротективная активность BDNF была подтверждена рядом исследований при различных типах повреждения нервной системы [Bathina et al, 2015; Karagyaur, 2015], в т.ч. в клиническом исследовании (КИ) I/II-фазы генотерапевтической конструкции pVax1-hBDNF («Иннервин») при травматических денервациях верхней конечности [собств. неопубликованные данные]. По результатам проведенного КИ было установлено, что даже однократная инъекция генотерапевтической конструкции pVax1-hBDNF, кодирующей BDNF, в мышцы денервированной руки приводила к улучшению нервной проводимости по данным электронейромиографии, а также улучшению кровоснабжения по данным доплерографии, а 92.5% исследуемых оценивали свою реакцию на лечение, как удовлетворительную или высокоудовлетворительную. Однако, на сроке наблюдения более 3 месяцев от момента начала терапии статистически достоверных различий между группами исследования установлено не было. По результатам КИ было рекомендовано использовать многократный режим введения генотерапевтической конструкции pVax1-hBDNF и/или ее сочетанное применение с другими факторами, усиливающими ее эффективность или продлевающими ее активность.

Среди идентифицированных белковых молекул в составе секрета МСК было необходимо выбрать молекулу, способную максимально полно функционально дополнить активность мозгового нейротрофического фактора (BDNF). Поскольку сам BDNF является мощным защитным и трофическим фактором для двигательных, «симпатических, дофаминергических и ганглиозных нейронов, шванновских клеток и эндотелиоцитов, а также стимулятором роста нейритов и формирования синапсов для указанных типов нейронов» [Карагяур, 2013; Boyd et al, 2003; Гомазков, 2006;], мы

предположили, что добавление другого нейротрофина не сможет радикально усилить нейропротективную активность BDNF. При анализе потенциальных кандидатов из групп проангиогенных факторов, противовоспалительных цитокинов и белков матрикса наше внимание привлекла молекула урокиназного активатора плазминогена (uPA).

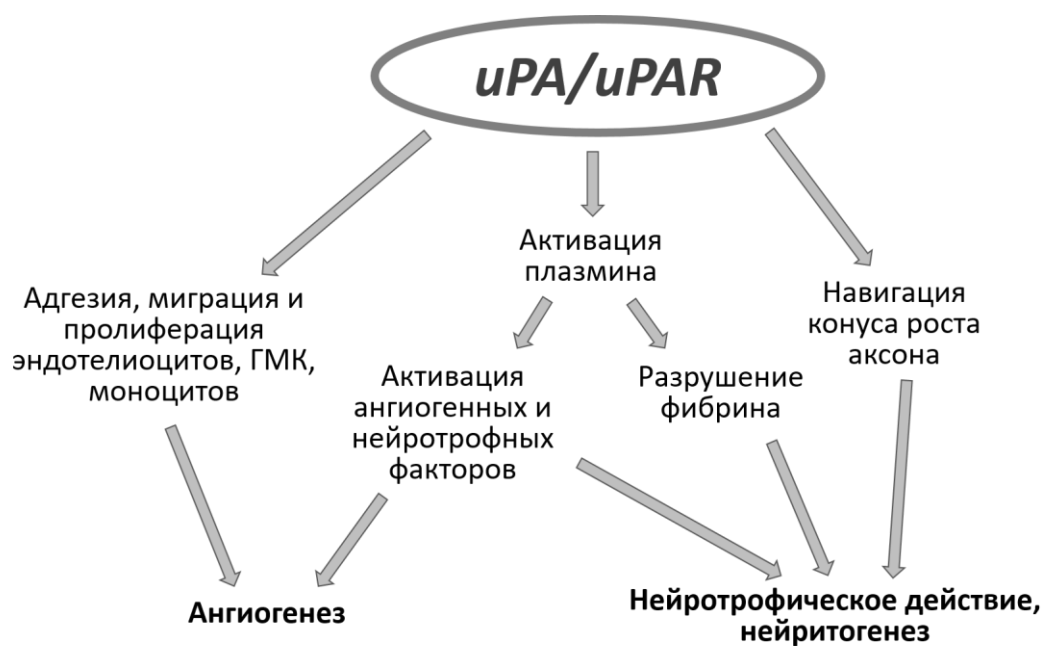


Рисунок 3.1 - Плейотропные эффекты системы урокиназного активатора плазминогена на процессы регенерации.

uPA является молекулой с плейотропным действием (Рисунок 3.1), исходно идентифицированной, как один из активаторов плазминогена, т.е. активаторов противосвертывающей системы крови [Ploug et al, 1956]. Поскольку фибриноген и фибрин вызывают демиелинизацию аксонов, ингибируют их рост [Akassoglou et al, 2002; Schachtrup et al, 2007; Myers et al, 2011], а также активирует клетки микроглии (в ЦНС), приводя к развитию демиелинизирующих заболеваний [Abbadessa et al, 2022], его удаление (с чем и помогает справиться противосвертывающая система) является одним из условий успешной регенерации в центральной и периферической нервной системе. Плазмин, активированный uPA, способен не только расщеплять фибрин, но и активировать матриксные металлопротеиназы [Davis et al, 2001],

запускать расщепление внеклеточного матрикса (ВКМ), стимулировать высвобождение из ВКМ заякоренных факторов роста и их последующее созревание (через отщепление пропептида) [Naldini et al, 1995; McColl et al, 2003; Gray et al, 2008]. Такая активация факторов роста затрагивает и нейротрофины из семейства NGF (в т.ч. и BDNF), что увеличивает вероятность их взаимодействия с Trk-рецепторами (а не p75NTR), опосредующими нейротрофическую и нейропротективную функцию NGF и членов его семейства.

Деградация ВКМ и высвобождение факторов роста стимулирует процессы миграции клеток, роста нервных волокон и ангиогенез, необходимый для полноценной и функциональной регенерации тканей. Способность uPA стимулировать ангиогенез была подтверждена экспериментально [Traktuev et al, 2007]. Особенностью uPA в отличие от родственной молекулы тканевого активатора плазминогена (tPA) является наличие у uPA специфического рецептора uPAR (uPA receptor), при связывании с которым каталитическая активность uPA возрастает в ~50 раз, что позволяет создать локализовать протеолиз ВКМ и активацию ростовых факторов [Semina et al, 2016a]. Поскольку uPAR локализован преимущественно на лидирующем крае клетки или конусе роста нейрита, такой направленный протеолиз способствует более эффективной миграции клетки или росту конуса роста через ВКМ [Siconolfi et al, 2001; Semina et al, 2016a, Narayanaswamy et al, 2017].

Также ряд накопленных данных позволяет утверждать, что uPA является одним из модуляторов синаптогенеза и синаптической пластичности в центральной нервной системе [Del Bigio et al, 1999; Merino et al, 2018; Diaz et al, 2019; Merino et al, 2020].

Помимо названных механизмов действия uPA нами недавно было показано, что проформа uPA может проникать в ядро неповрежденной клетки и через регуляцию активности транскрипционных факторов Snai1 и NF-κB изменять экспрессию генов и способствовать переходу клеток в

мезенхимальный фенотип [Shmakova et al, 2022]. Такой переход является неотъемлемой частью миграции эндотелиоцитов, а также глиальных клеток периферической и центральной нервной системы (шванновских клеток, олигодендроцитов и астроцитов) в ходе реализации ими своих функций. Это позволяет эндотелиоцитам формировать новые капилляры, а клеткам глии – очищать области повреждения нервной ткани от клеточного детрита и стимулировать направленный рост нервных волокон [Balakrishnan et al, 2021]. Способность uPA *per se*, как в виде рекомбинантного белка, так и в виде кодирующей его генетической конструкции «pVax1-huPA, стимулировать восстановление нервных волокон периферического нерва в модели травматической денервации задней конечности мышцы была подтверждена нами и нашими коллегами экспериментально» [Karagyaur et al, 2015; Вардья, 2002]. На основе гена урокиназного активатора плазминогена нашими коллегами был разработан перспективный моноцистронный генотерапевтический препарат («Юпикор») для стимуляции процессов ангиогенеза в ишемизированных мышечных тканях [Traktuev et al, 2007].

Важность системы урокиназного активатора плазминогена в процессах регенерации и ответа нервной ткани на стресс подтверждается целым рядом исследований. Так, было показано, что повреждение периферического нерва вызывает быстрое повышение экспрессии компонентов урокиназной системы в нейронах чувствительных ганглиев на стороне повреждения [Siconolfi et al, 2001]. Аналогичные изменения наблюдаются и в центральной нервной системе при ее повреждении или в процессе обучения [Shmakova et al, 2021a], а нарушения экспрессии uPA или компонентов его системы ассоциированы с развитием ряда неврологических, психически и когнитивных нарушений [Eagleson et al, 2011; Shmakova et al, 2023]. Накопленные данные свидетельствуют о том, что компоненты системы урокиназного активатора плазминогена могут являться белками раннего ответа, подобно *c-fos*, *c-myc* и *c-jun* [Siconolfi et al, 2001; Shmakova et al, 2021a].

Такая плейотропность действия uPA и функциональная комплементарность активности BDNF (включая способность активировать проформу BDNF) делает пару факторов BDNF и uPA одним из перспективных сочетаний факторов роста/цитокинов для стимуляции защиты и регенерации нервной ткани.

В ходе анализа идентифицированных в секретоме МСК белков рассматривались и другие сочетания факторов: BDNF + VEGF, BDNF + IL-10, BDNF + TGF β , GDNF + HGF, однако, они были отклонены в силу ряда причин: узкий (IL-10) или перекрывающийся (HGF) с нейротрофином спектр активности, преимущественное действие лишь в одном из отделов нервной системы (IL-10), наличие выраженной побочной активности: VEGF – увеличение проницаемости гематоэнцефалического барьера и индукция вазогенного отека, TGF β – профибротическая активность.

По имеющимся у нас данным сочетание мозгового нейротрофического фактора (BDNF) и урокиназного активатора плазминогена (uPA), как комбинация функционально комплементарных и потенцирующих факторов для стимуляции нейропротекции и регенерации нервной ткани ранее не рассматривалась и никем не была предложена.

На дальнейших этапах работы было проведено изучение нейропротективной и прорегенераторной активности комбинации выбранных молекул BDNF и uPA в различных экспериментальных моделях повреждения центральной и периферической нервной системы.

3.2 Разработка систем экспрессии и доставки мозгового нейротрофического фактора (BDNF) и урокиназного активатора плазминогена (uPA) для изучения их сочетанной активности в процессах защиты и регенерации нервной системы

Состояние проблемы на момент исследования. Для изучения функции отдельных генов и молекул в биологических процессах могут быть использованы следующие экспериментальные подходы: повышение или

блокирование экспрессии этих генов, введение готовых исследуемых молекул или нейтрализация их активности, а также модификация молекул (нуклеиновых кислот, белков и др.), что может привести к изменению их свойств и функций [Karagaur et al, 2022].

Существуют различные способы повышения концентрации нужной молекулы (например, молекулы белка) в определенном компартменте организма, при этом каждый из них характеризуется своими особенностями локализации и распределенности нужного белка, а также особенностями его динамики его концентрации в нужном компартменте организма.

Самым простым является однократное или регулярное введение белка в нужный компартмент. В данном случае наиболее высокая (пиковая) концентрация белка достигается в месте введения и в момент введения и далее она постепенно снижается за счет разрушения введенного белка, поглощения его клетками или диффузии в окружающие ткани. Динамика элиминации и диффузии введенной молекулы определяется ее свойствами: растворимостью, чувствительностью к протеазам и изменению рН, связанностью с носителем, а также ее биологическими свойствами (токсичность, способность вызывать воспаление или сосудистые реакции и т.п.) [Manning et al, 2010; Zhang et al, 2018]. Данный подход может оказаться полезным в случае необходимости быстрого достижения высоких концентраций искомых молекул в области повреждения для снижения его негативных последствий, например, с целью нейропротекции ткани мозга после повреждения, когда временное окно терапевтического воздействия ограничено. Следует помнить о достаточно быстрой элиминации введенного белка, что может потребовать его повторного введения для поддержания биологического или терапевтического эффекта (Рисунок 3.2). Недостатком данного подхода является возможность создания локальных токсических концентраций исследуемого белка или включающей его композиции, что может быть преодолено титрованием вводимой дозы такого белка.

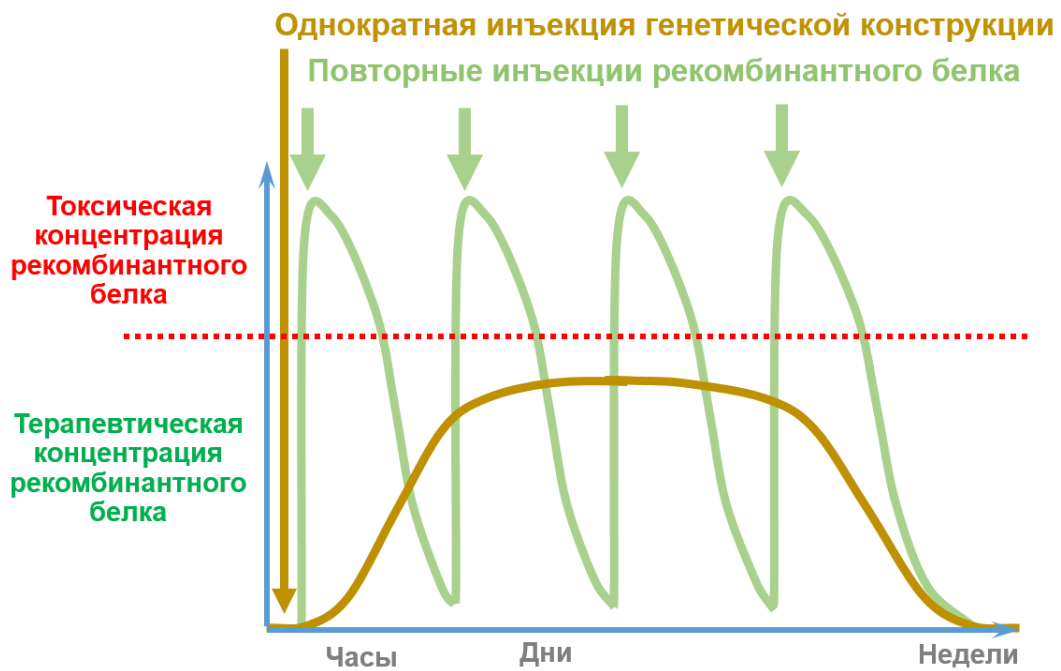


Рисунок 3.2 - Динамика концентраций рекомбинантного белка в очаге повреждения при его прямом введении (салатовый) и при введении в виде генетической конструкции, его кодирующей (золотой). Прямые инъекции рекомбинантного белка позволяют быстрее достичь его терапевтических концентраций, но с большей вероятностью сопряжены с созданием его локальных токсических концентраций.

Более продолжительной экспрессии целевого белка можно добиться с помощью введения в клетки исследуемого компартмента организма гена, который его кодирует (генотерапевтический подход) [High et al, 2019]. Особенности данного подхода являются ограниченная проникающая способность генетической конструкции в целевые клетки (и невозможность ее работы вне клетки *in vivo*) и задержка в достижении целевой концентрации белкового фактора, обусловленная необходимостью транспорта генетической конструкции в ядро, времени на ее транскрипцию, синтез и секрецию белка (Рисунок 3.2). Эти ограничения генотерапевтического подхода не позволяют рассматривать его в качестве возможного способа доставки исследуемой молекулы с целью защиты поврежденной ткани при острых состояниях, например, повреждениях нейронов центральной системы, вызванных острыми отравлениями, травмами или острыми нарушениями мозгового

кровообращения. Важными преимуществами генотерапевтического подхода являются: продукция целевого белка нужным типом клеток, что позволяет имитировать его природную динамику экспрессии (но с достижением больших концентраций и в выбранный момент времени) и создавать природоподобный градиент его концентрации (с максимумом в окружении клеток-продуцентов) без создания пиковых локальных токсичных концентраций, а также большая продолжительность экспрессии целевого белка (дни-недели), что позволяет оценивать его активность в развернутых во времени биологических процессах (ангиогенез, нейрогенез, миграция, пролиферация, дифференцировка клеток и пр.) (Рисунок 3.2).

Поскольку в основе генотерапевтического подхода лежит доставка гена целевого белка в клетку, то на эффективность такой доставки могут значительно повлиять условия (рН, наличие протеаз и нуклеаз, крови и т.п.) и состояние клеток в области повреждения. В ряде исследований было показано, что гипоксические условия в мышечной ткани могут увеличивать проницаемость мембран миоцитов и способствовать захвату введенных плазмидных генетических конструкций [Traktuev et al, 2007], однако, сохраняется ли эта тенденция в нервной ткани, непосредственно в очаге повреждения, остаётся неясным, что не позволяет предсказать эффективность генной терапии при введении векторов непосредственно в область повреждения, например, в модели интрацеребральной посттравматической гематомы. Среди методов доставки генов в целевые клетки наиболее эффективным считается использование лентивирусных частиц (ЛВЧ), способных инфицировать даже покоящиеся терминально дифференцированные клетки (в т.ч. нейроны в модели *in vivo*) [Naldini et al, 1996]. По этой причине мы рассматриваем ЛВЧ, как один из возможных способов доставки генов BDNF и uPA в клетки мозга в условиях повреждения.

Для блокирования активности целевых белков с целью изучения их функций также могут быть использованы различные подходы: подавление трансляции их мРНК (например, через «нокаутирование генов целевых белков

с помощью системы редактирования генома или экспрессию малых интерферирующих РНК (siRNA/shRNA) или же прямая нейтрализация их активности на уровне белков с помощью нейтрализующих антител или специфических ингибиторов» [Karagyaour et al, 2022]. Динамика подавления активности целевых белков через прямое введение ингибиторов/нейтрализующих молекул и через воздействие на систему экспрессии целевых генов подобна той, что наблюдается при повышении концентрации нужной молекулы в определенном компартменте организма (Рисунок 3.3), но с противоположным знаком.

Одной из модификаций генотерапевтического подхода является редактирование генома, технология, которая позволяет манипулировать активностью природных аллелей генов (в противоположность введению дополнительных копий генов при генной терапии), через «активацию/подавление их экспрессии или через конститутивную модификацию нуклеотидной последовательности кодирующих или регуляторных элементов (в их природном окружении)» [Karagyaour et al, 2022; Doudna, 2020]. Технологии редактирования генома являются высокопрецизионным инструментом, однако по причине того, что они представляют собой достаточно крупные молекулы: ~150 кДа в виде белка и более 4200 п.н. в виде кДНК или РНК, основным ограничением их использования является отсутствие эффективных систем доставки в первичные клетки тканей *in vivo*. Особенности динамики экспрессии нужного белка и его распределенности в тканях (при условии успешной доставки и функционирования систем редактирования) подобны таковым при использовании классического генотерапевтического подхода (Рисунок 3.3). Поскольку необходимые системы доставки редакторов генома в клетки *in vivo* нам не были доступны, мы не применяли их в моделях *in vivo*.

Некоторые из этих подходов были применены для изучения роли и терапевтического потенциала «мозгового нейротрофического фактора (BDNF) и урокиназного активатора плазминогена в процессах

нейропротекции и регенерации центральной и периферической нервной ткани после повреждения» [Karagyaur et al, 2020; Dzhauari et al, 2022].

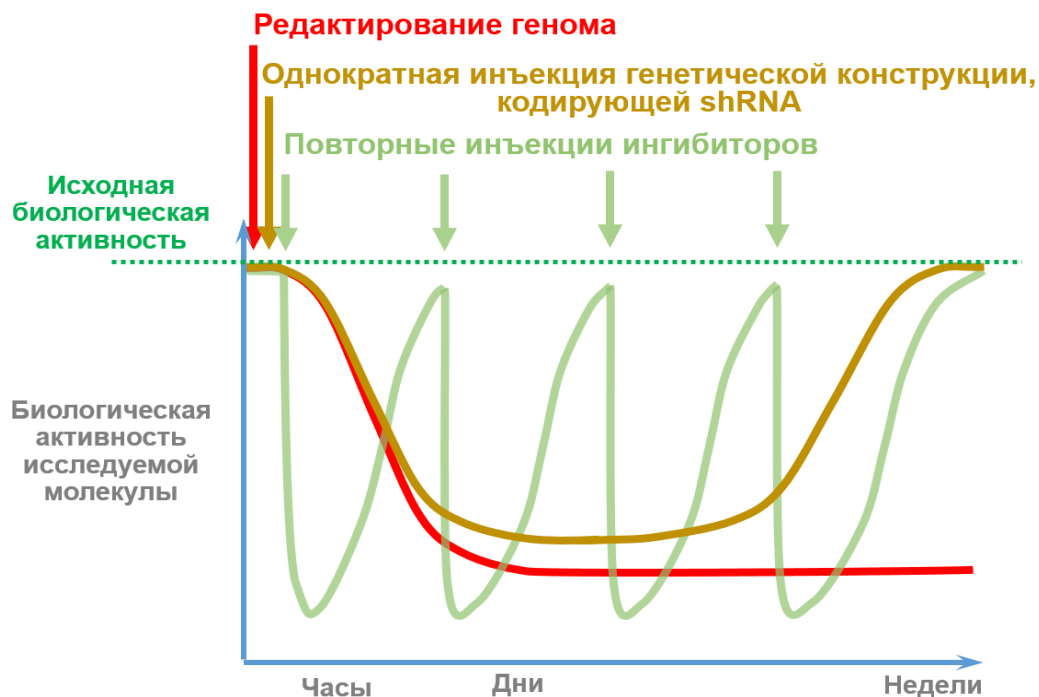


Рисунок 3.3 - Динамика биологической активности белковой молекулы в зависимости от способа ее подавления: редактирование генома (красный), введение генетической конструкции, кодирующей малую шпилечную РНК (shRNA) (золотой), прямое введение ингибитора (салатовый).

3.2.1 Разработка и создание бицистронной генетической конструкции, кодирующей BDNF и uPA

Для изучения нейропротективной активности комбинации BDNF и uPA в моделях повреждения и продолжительной регенерации центральной и периферической нервной системы на основе вектора pVax1 был разработан бицистронный плазмидный вектор, кодирующий кДНК BDNF и uPA человека. Дизайн конструкции предполагает одновременную экспрессию BDNF и uPA в одной и той же клетке. Мы предположили, что это будет способствовать более эффективному созреванию pro-BDNF и смещению его активности в сторону нейропротекции в условиях гиперэкспрессии. При дизайне бицистронной генетической конструкции предполагалось, что трансляция BDNF и uPA в

целевых клетках будет идти одновременно: BDNF транслироваться по кЭП-зависимому, а uPA – по IRES-зависимому механизмам [Lukavsky, 2009; Karagyaur et al, 2020]. Такая последовательность генов факторов «роста/цитокинов в структуре бицистронной генетической конструкции pVax1m-hBDNF-IRES-huPA объясняется тем, что, согласно литературным данным, нейротрофические факторы являются основными нейропротекторами и стимуляторами процессов регенерации поврежденной нервной ткани» [Карагяур, 2013; Boyd et al, 2003; Гомазков, 2006; Gordon et al, 2009], а также возможным токсическим действием uPA в случае его гиперпродукции [Koziol et al, 1975; Unal et al, 2000]. В качестве IRES (Internal Ribosome Entry Site, сайт внутренней посадки рибосомы) при разработке плазмиды был использован IRES вируса гепатита С (HCV), который, согласно данным литературы [Jubin et al., 2000], обеспечивает экспрессию подконтрольного белка (uPA) в количестве на порядок меньшем (~в 10 раз), чем количество белка, транслируемого по кЭП-зависимому механизму (BDNF).

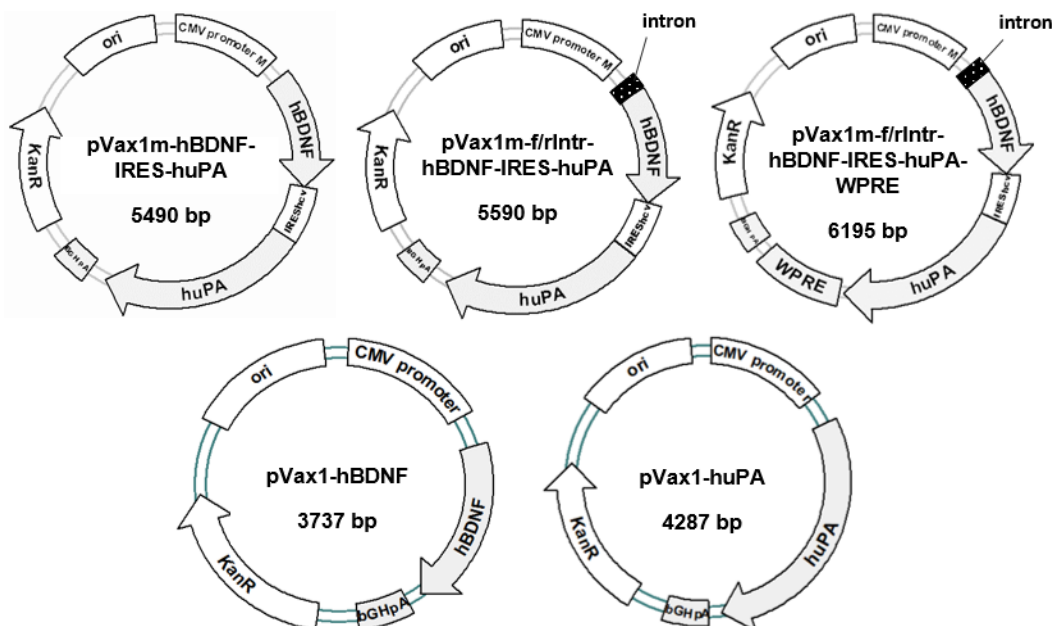


Рисунок 3.4 - Карты бицистронных (вверху) и моноцистронных (внизу) генетических конструкций, кодирующих гены BDNF и uPA человека, использованные в ходе изучения нейропротективной активности генов BDNF и uPA в моделях повреждения центральной и периферической нервной системы.

Для увеличения продуктивности плазмиды были сконструированы и изучены четыре дополнительных ее варианта с синтетическим интроном и последовательностью посттранскрипционного регуляторного элемента вируса гепатита сурка (WHV) – WPRE, как описано в разделе 2.4. Карты полученных генетических конструкций приведены на Рисунке 3.4.

Вариант генотерапевтической конструкции pVax1m-fIntr-hBDNF-IRES-huPA обладает оптимальным соотношением продуктивности целевых белков к размеру молекулы. Анализ экспрессии рекомбинантных BDNF и uPA человека в клетках HEK293, трансфицированных различными вариантами бицистронной плазмиды pVax1m-hBDNF-IRES-huPA (pBU), «показал, что вариант плазмиды, содержащий синтетическую интронную последовательность в прямой ориентации pVax1m-fIntr-hBDNF-IRES-huPA (pBU-fIntr), продуцировал несколько более высокий уровень BDNF человека, чем базовая плазида pVax1m-hBDNF-IRES-huPA» [Karagyaur et al, 2020]: 69.3 ± 9.1 против 53.3 ± 7.3 нг/мл ($n = 4$), хотя статистически достоверных различий между этими группам установлено не было (ANOVA, тест Сидака-Холма), повидимому в виду относительно небольшой выборки (Рисунок 3.5). Продукция uPA человека существенно не отличалась между исходным вариантом плазмиды pVax1m-hBDNF-IRES-huPA и вариантом, содержащим синтетический интрон в прямой ориентации, pVax1m-fIntr-hBDNF-IRES-huPA: 9.2 ± 1.4 против 9.0 ± 2.5 нг/мл ($n = 4$) (Рисунок 3.5). «Добавление элемента WPRE (варианты pVax1m-fIntr-hBDNF-IRES-huPA-WPRE и pVax1m-rIntr-hBDNF-IRES-huPA-WPRE, или pBU-fIntr-WPRE и pBU-rIntr-WPRE, соответственно) значительно увеличило продукцию рекомбинантных белков ($p = 0.004$, $n \geq 3$, ANOVA, тест Сидака-Холма) и при том увеличивало размер плазмиды на 10%, что, согласно данным литературы, может существенно снижать эффективность проникновения генотерапевтической конструкции в ткани [Maucksch et al, 2013]. По этой причине для в дальнейших исследования было принято решение не использовать варианты плазмиды, содержащие WPRE» [Karagyaur et al, 2020]. Эффективность экспрессии

hBDNF при использовании плазмиды pVax1m-fIntr-hBDNF-IRES-huPA была практически эквивалентна таковой для плазмиды pVax1-hBDNF -показано ранее [Karagyaur et al., 2015]. Поскольку вариант плазмиды pVax1m-fIntr-hBDNF-IRES-huPA обладал оптимальным соотношением продуктивности к размерам, то для последующих исследований было принято решение использовать именно его. Для краткости ему было присвоено название pNCure (plasmid for nervous tissue cure, «плазмида для лечения нервной ткани»).

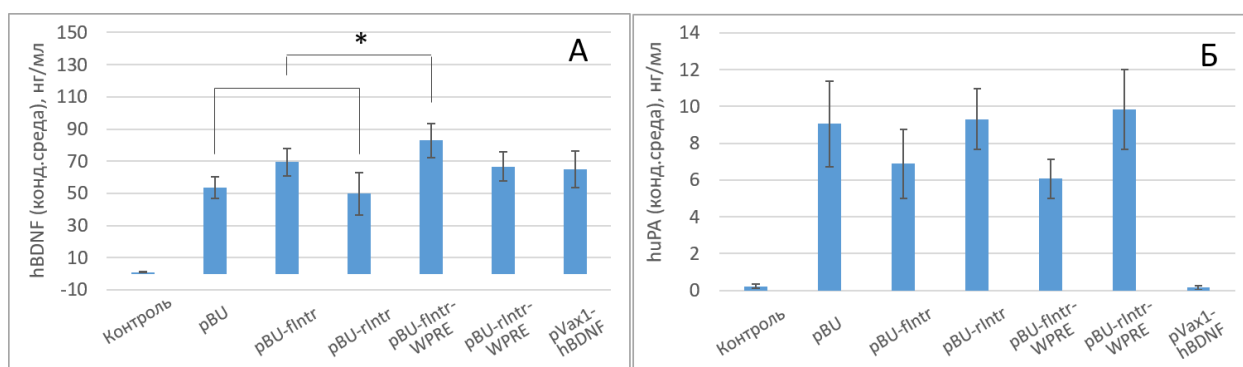


Рисунок 3.5 - Сравнительный анализ продуктивности различных вариантов плазмиды pBU в культуре HEK293T по уровню BDNF (А) и uPA (Б) человека. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. * – $p = 0.004$, $n \geq 3$ (ANOVA, тест Сидака-Холма).

Плазмида pNCure стимулирует рост нейритов клеток нейробластомы Neuro2a. «Для оценки биологической активности плазмиды pNCure и закодированных в ней рекомбинантных белков сравнивали способность кондиционированной среды, собранной с клеток HEK293T, трансфицированных pNCure, стимулировать рост» [Karagyaur et al, 2020] нейритов в сравнении со средой от клеток HEK293T, трансфицированных pVax1-hBDNF и pVax1m. Было установлено, что кондиционированная среда стимулировала рост нейритов во всех группах по сравнению с группой отрицательного контроля (DMEM с добавлением 10% FBS).

«Однако, наиболее выраженный эффект наблюдался в группах pVax1-hBDNF и pNCure, в которых 29.4 ± 2.5 % и 34.3 ± 3.5 % клеток имели нейриты, соответственно. Разница была значимой по сравнению с группами

отрицательного контроля» [Karagyaour et al, 2020], положительного контроля и pVax1m, в которых 8.2 ± 1.4 , 22.9 ± 2.7 и 18.3 ± 2.1 % клеток имели нейриты, соответственно ($n = 20$, * – $p < 0.05$, ANOVA: тест Ньюмена-Кейлса) (Рисунок 3.6).

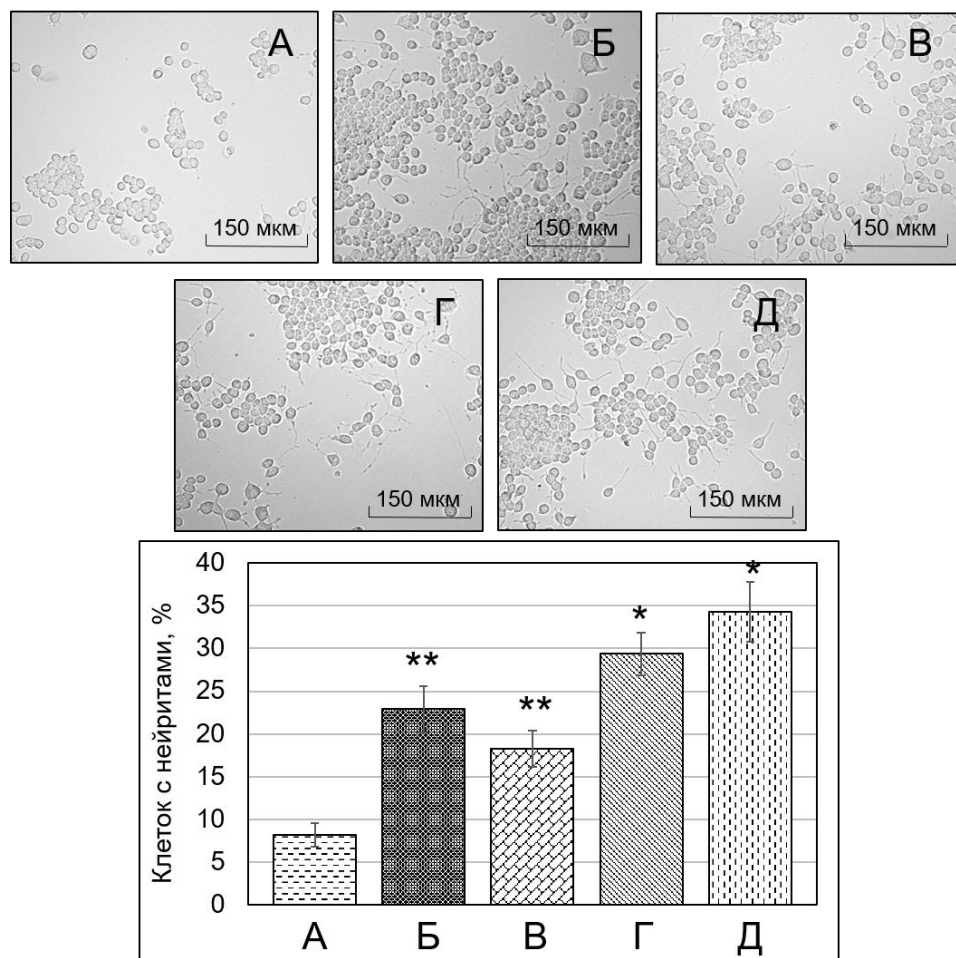


Рисунок 3.6 - Кондиционированная среда клеток HEK293T, трансфицированных плазмидами pVax1-hBDNF и pNCure, стимулирует рост нейритов в клеточной модели Neuro2a. На снимках - культуры клеток Neuro2a через 72 часа после индукции нейритогенеза. А - отрицательный контроль (DMEM 10% FBS), Б - положительный контроль (DMEM 1% FBS), В, Г и Д- кондиционированные среды из клеток HEK293T, трансфицированные плазмидами pVax1m, pVax1-hBDNF или pNCure, соответственно (Увеличение 100х). График демонстрирует процент клеток с нейритами в каждой из групп. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. *, ** - $p < 0.05$ против группы отрицательного контроля, $n = 20$ (ANOVA, тест Ньюмена-Кейлса).

Количество нейритов в группах положительного контроля и pVax1m значительно отличалось от группы отрицательного контроля ($n = 20$, $p < 0.05$, ANOVA: тест Ньюмена-Кейлса). Между группами pVax1-hBDNF и pNCure не наблюдалось существенной разницы, однако в группе pNCure была отмечена тенденция к более выраженному нейритогенезу.

Таким образом, была получена бицистронная генетическая конструкция, позволяющая обеспечить одновременную экспрессию функциональных молекул, обладающих нейропротективной и прорегенераторной активностью, – BDNF и uPA. По имеющимся у нас данным разработанная бицистронная плазмидная генетическая конструкция, кодирующая BDNF и uPA, является первым генотерапевтическим препаратом для комплексной стимуляции нейропротекции и регенерации нервной ткани после повреждения.

3.2.2 Разработка и создание лентивирусных векторов, кодирующих гены β -Gal, BDNF и uPA

Изучение эффективности доставки генов β -Gal, BDNF и uPA в нейральные клетки при введении плазмидных генетических конструкций в область повреждения мозговой ткани показало, что последние практически не захватываются поврежденными нейральными клетками, и, соответственно, закодированные в них терапевтические гены не могут быть эффективно экспрессированы.

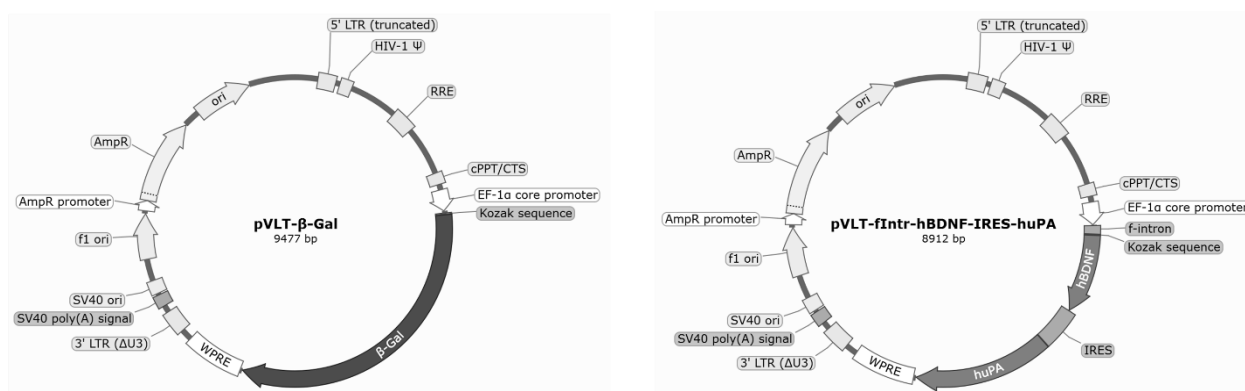


Рисунок 3.7 - Карты векторов переноса для сборки лентивирусных частиц, несущих гены β -Gal (слева) и комбинацию генов BDNF и uPA человека (справа)

Для увеличения эффективности доставки генов β -Gal, BDNF и uPA в ткань мозга были собраны лентивирусные генетические конструкции (вектор переноса), кодирующие их гены (Рисунок 3.7). На основе полученных векторов переноса были собраны ЛВЧ, которые концентрировали в 6 раз и затем тестировали на культуре НЕК293Т. Окраска трансдуцированных НЕК293Т показала, что в ЛВЧ несут функциональную копию гена β -Gal, а использованный подход к концентрированию ЛВЧ увеличивает их титр без видимой утраты инфицирующей и функциональной активности (Рисунок 3.8). Аналогичные результаты были получены при анализе среды культивирования клеток НЕК293Т, трансдуцированных бицистронной лентивирусной конструкцией pVLT-BDNF-IRES-uPA, кодирующей гены BDNF и uPA, было установлено содержание BDNF – 62 ± 12 и 257 ± 43 нг/мл для культур трансдуцированных ЛВЧ с титром 600 тыс./мл и 3.6 млн/мл, соответственно ($n = 3$), и uPA – 7.1 ± 0.8 и 27.5 ± 5.3 нг/мл для культур трансдуцированных ЛВЧ с титром 600 тыс./мл и 3.6 млн/мл, соответственно ($n = 3$).

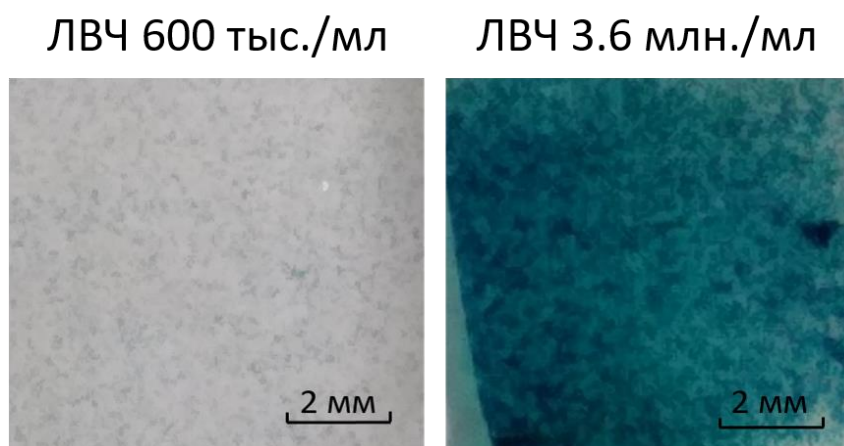


Рисунок 3.8 - Макроскопическая картина окраски пласта клеток линии НЕК293Т, трансдуцированных ЛВЧ, кодирующих ген β -Gal, в титре 600 тыс./мл и 3.6 млн./мл

3.2.3 Разработка и создание иммортализованной линии МСК

Мозговой нейротрофический фактор (BDNF) был ранее идентифицирован нами, как один из основных факторов роста, обуславливающих нейропротективные свойства секрета МСК. Это

подтверждается результатами исследований и других авторов [Drago et al, 2013; Cunningham et al, 2018; Kim et al, 2021]. Полученные данные свидетельствуют также и о том, что нейропротективная активность одного BDNF уступает сочетанному действию широкого спектра нейропротективных и прорегенераторных факторов, входящих в состав секрета МСК. Несмотря на то, что содержание BDNF в неконцентрированном секрете МСК составляет всего 0.81 ± 0.63 нг/мл ($n = 16$), его сочетание с другими факторами (в т.ч. и uPA) в составе секрета потенцирует его нейротрофическую активность. Во «множестве работ была продемонстрирована способность МСК стимулировать процессы регенерации, и, как было установлено, паракринная секреция факторов роста, противовоспалительных цитокинов и других защитных молекул является одним из основных механизмов их прорегенераторной активности» [Caplan et al, 2006; Kalinina et al, 2015]. Ввиду этого секретом МСК, как основных стимуляторов процессов регенерации, можно рассматривать как сложную нейропротективную композицию, содержащую не только BDNF, но и множество других факторов с проангиогенными, противовоспалительными и прорегенераторными свойствами.

Источником получения МСК служат ткани доноров-добровольцев, и, ввиду индивидуальных различий между донорами, свойства МСК, состав и свойства их секрета могут значительно отличаться от донора к донору. Выделенные культуры МСК достаточно быстро стареют и к 7-8 пассажу утрачивают свои свойства. Все это значительно затрудняет проведение фундаментальных исследований биологии МСК и изучение свойств их секрета. Помимо этого, такие особенности культивирования МСК практически полностью исключают возможность использования их секрета в качестве основы для разработки перспективных лекарственных препаратов для стимуляции процессов регенерации (в т.ч. регенерации центральной нервной системы), ввиду сильной ограниченности базы доноров МСК, необходимости характеристики биологических и микробиологических

свойств каждого из поступающих образцов МСК, а также практической невозможности стандартизовать состав такого препарата.

Одним из возможных подходов к преодолению указанных ограничений является получение иммортализованных культур МСК, способных сохранять свою пролиферативную активность до 40 и более пассажей. Поскольку каждый пассаж представляет собой рассаживание клеточной культуры 1:3, то способность расти до 40 пассажей теоретически позволяет получить в $3^{(40-8)}$ или в 3^{32} большее количество клеток и секрета, чем при культивировании до 8 пассажа, при этом источником полученного секрета будет одна, всесторонне охарактеризованная клеточная линия. Согласно данным литературы, иммортализация посредством гиперэкспрессии теломеразы (TERT) позволяет клеточным культурам сохранять функциональные p53 и pRB чек-поинты в митозе, нормальный контроль за клеточным циклом, свойственный им кариотип и фенотип, чувствительность к контактному торможению, зависимость от факторов роста и адгезии к поверхности [Ouellette et al, 2000], чем радикально отличаются от трансформированных (опухолевых) клеток. Упрощенно говоря, иммортализованные клеточные культуры являются первично выделенными нетрансформированными клетками с пролонгированным пролиферативным потенциалом. Однако влияние процесса иммортализации на стабильность состава и свойств (в т.ч. нейропротективных и прорегенеративных) секрета МСК изучено плохо, что подталкивает нас к изучению этого вопроса, как с точки зрения решения фундаментальных проблем (установление функциональной значимости отдельных компонентов секрета в процессах регенерации), так и с точки зрения создания универсальной платформы для последующей разработки перспективных лекарственных кандидатов для стимуляции процессов регенерации.

В ходе иммортализации культур МСК было получено несколько клеточных культур, проявляющих свойства иммортализованных. После завершения селекции на пуромicine иммортализованные культуры МСК

переводили в среду роста DMEM/F12 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 1x L-Gln (при необходимости) и 1x смесью антибиотика-антимикотика. Полученные клеточные культуры вели до 30-44 пассажа в зависимости от линии с криоконсервацией части образца через пассаж.

Оценка уровня экспрессии и активности теломеразы в иммортализованных клетках в динамике. После процедуры иммортализации в полученных клеточных культурах необходимо было подтвердить экспрессию и активность теломеразы. Экспрессию мРНК TERT в генетически модифицированных клетках подтверждали с помощью ПЦР в реальном времени (Рисунок 3.9).

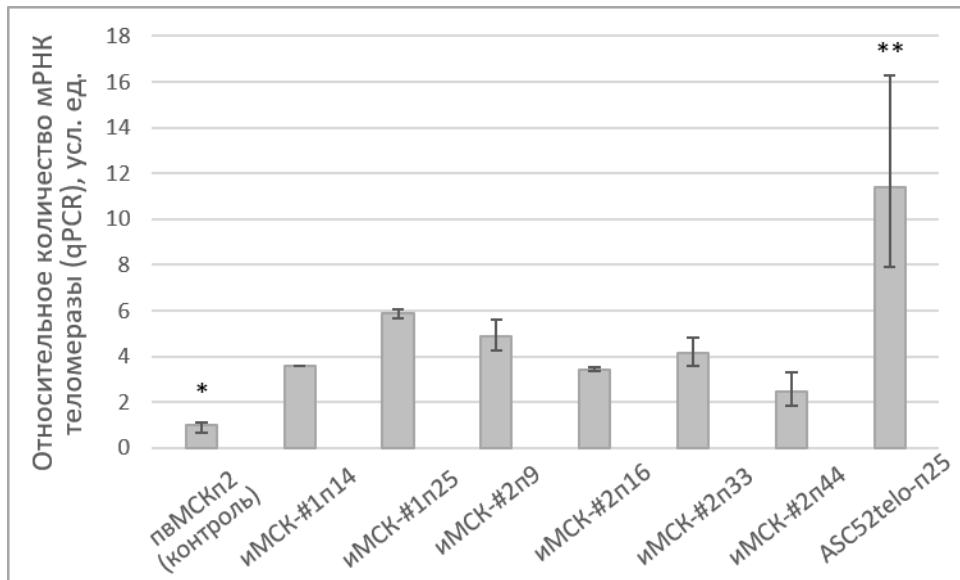


Рисунок 3.9 - Относительный уровень экспрессии мРНК теломеразы в иммортализованных МСК в динамике. пвМСКп2 - первично выделенные МСК пассаж 2, иМСК-#1п14 - иммортализованные МСК линия 1 пассаж 14 и т.д., ASC52telo-п25 - коммерческая линия иммортализованных МСК пассаж 25. *,** - $p < 0.05$ (по сравнению с другими группами), $n = 3$ (ANOVA, тест Ньюмена-Кейлса).

Согласно полученным результатам в иммортализованных клеточных культурах содержалось в 2.5-6 раз больше мРНК гена TERT, чем в первично выделенных немодифицированных МСК, причем от пассажа к пассажи (с 9 до 44) уровень мРНК TERT существенно не менялся, что подтверждает

стабильность экспрессии гена TERT в ходе длительного культивирования клеточной культуры. В качестве группы положительного контроля выступала коммерчески доступная линия МСК жировой ткани человека ASC52telo (ATCC, США, #SCRC-4000). Стоит отметить, что согласно данным ПЦР в реальном времени, а также результатам иммуноблоттинга (Рисунок 3.10), в «первичных немодифицированных МСК на ранних пассажах культивирования также содержится мРНК и белок теломеразы, причем достоверных различий по содержанию белка TERT человека между первично выделенными МСК» [Primak et al., 2024] и иммортализованными МСК выявлено не было (Рисунок 3.10).

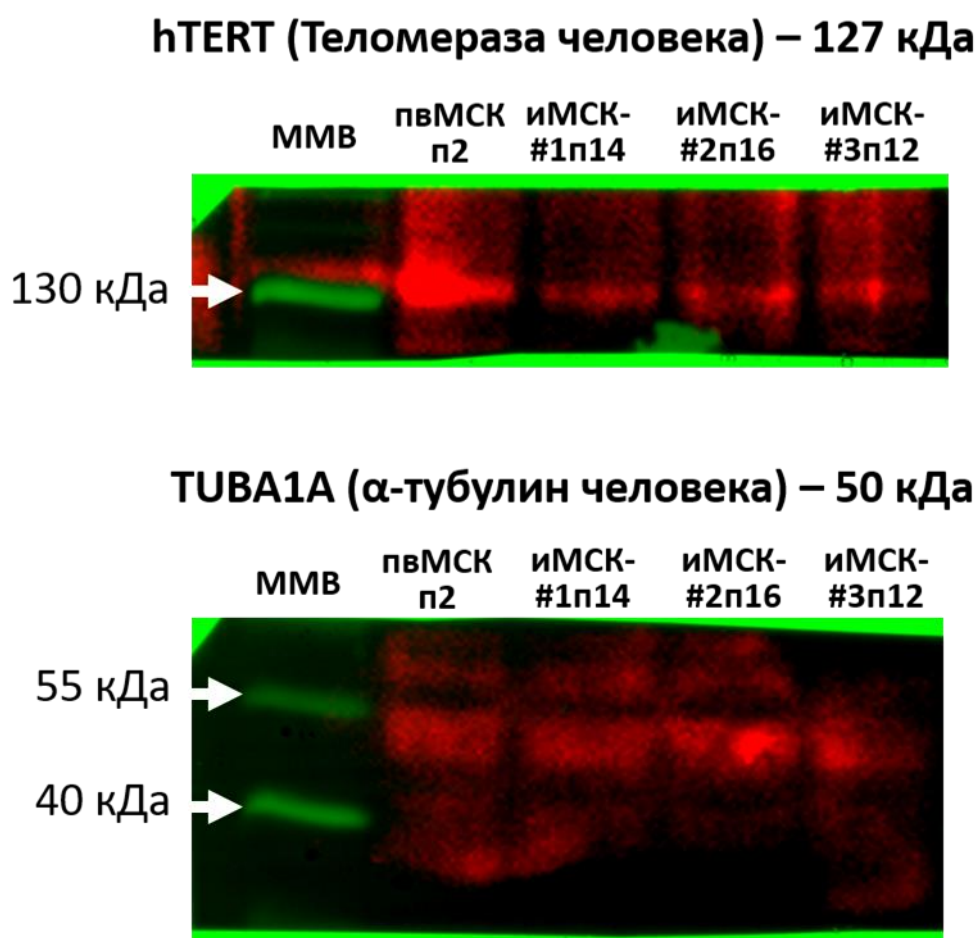


Рисунок 3.10 - Иммуноблоттинг лизатов МСК человека антителами на теломеразу человека (вверху) с нормировкой на α -тубулин человека (внизу). ММВ - маркер молекулярного веса (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa, ThermoFisher Scientific, #26616), пвМСКп2 - первично

выделенные МСК пассаж 2, иМСК-#1п14 - иммортализованные МСК линия 1 пассаж 14 и т.д.

Функциональную активность теломеразы подтверждали «с помощью наборов Telomerase Activity Quantification qPCR Assay Kit (Sciencell, США, #8928) и Relative Human Telomere Length Quantification qPCR Assay Kit (Sciencell, США, #8908)» [Primak et al., 2024]. Анализ теломеразной активности клеточных лизатов до и после иммортализации показал, что, несмотря на относительно небольшие различия в количестве мРНК/белка TERT до и после иммортализации, активность теломеразы в клетках МСК после иммортализации возрастала более, чем в 150 раз (Рисунок 3.11). Предположительно, это может свидетельствовать о том, что теломераза в первично выделенных немодифицированных МСК находится в неактивном состоянии, что согласуется с ранее опубликованными данными [Zvereva et al, 2010; Wojtyla et al, 2011]. В одной из линий иммортализованных МСК была обнаружена тенденция к возрастанию активности теломеразы с пассажем (от 9 к 44), причем наблюдаемое возрастание теломеразной активности не коррелировало с уровнем мРНК TERT в культурах МСК на соответствующих пассажах, что также косвенно свидетельствует о наличии механизмов контроля активности теломеразы.

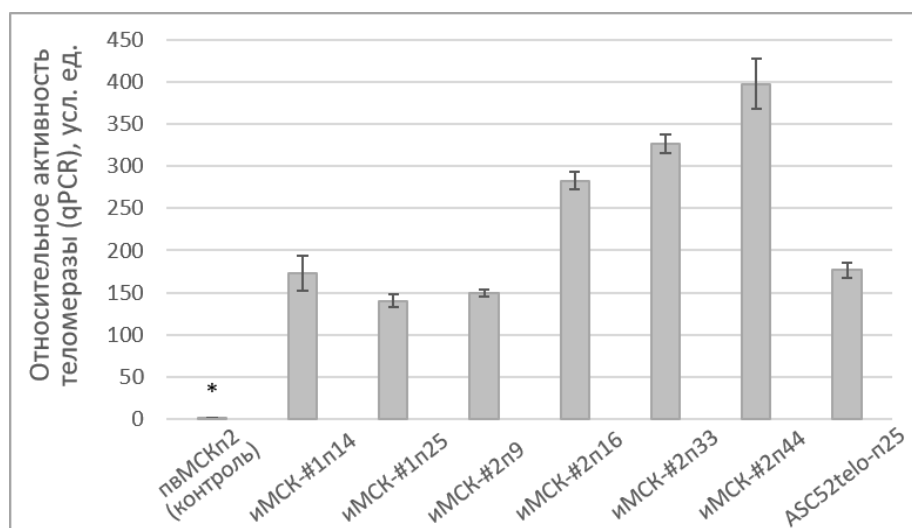


Рисунок 3.11 - Относительный уровень активности теломеразы в иммортализованных МСК в динамике. пвМСКп2 - первично выделенные МСК пассаж 2, иМСК-#1п14 - иммортализованные МСК линия 1 пассаж 14 и т.д., ASC52telo-п25 - коммерческая линия иммортализованных МСК пассаж

25. * - $p < 0.05$ (по сравнению с другими группами), $n = 3$ (ANOVA, тест Ньюмена-Кейлса).

Сравнительный анализ длины теломер между иммортализованными и первично выделенными клеточными культурами показал, что в иммортализованных МСК длина теломер в 2-5 раз длиннее, чем в первично выделенных МСК, причем существенных различий в длине теломер с увеличением пассажа культивирования (с 9 по 44 пассажи) в иммортализованных МСК не выявлено. В коммерчески доступной линии МСК ASC52telo длина теломер составила в среднем в 3.3 ± 1.2 раза больше, чем в первично выделенной культуре МСК.

Имунофенотипирование иммортализованных МСК в динамике.

Клеточные культуры характеризуются по совокупности признаков, одним из которых является наличие определенного паттерна поверхностных маркеров. «МСК, согласно рекомендациями Международного общества клеточной терапии (ISCT) [Dominici et al, 2006; Viswanathan et al, 2019], характеризуются по наличию маркеров CD73, CD90 и CD105, а также отсутствию поверхностных маркеров, свойственных для гематопоэтических и эндотелиальных клеток» [Primak et al., 2024]: CD14, CD19, CD20, CD34, CD45 и HLA-DR. Для того, чтобы оценить влияние процесса иммортализации на свойства культуры МСК и способность сохранять ими экспрессию свойственного им паттерна поверхностных маркеров было проведено иммунофенотипирование первично выделенных и иммортализованных культур МСК на различных пассажах с использованием коммерческого набора MSC Phenotyping Cocktail Kit, anti-human, REAfinity (Miltenyi Biotec, США, #130-125-285) на наличие МСК-специфичных маркеров: CD73, CD90 и CD105, и отсутствие гематопоэтических и эндотелиальных поверхностных маркеров: CD14, CD20, CD34 и CD45. Результаты исследования показали (Рисунок 3.12), что первично выделенная культура МСК достаточно быстро (со 2 по 6 пассаж) утрачивает свойственный МСК паттерн поверхностных маркеров, в частности, экспрессия CD90 с 90.1% снижается до 48.4% (отражает

процентное содержание клеток, окрашивающихся антителами к данному поверхностному маркеру), а экспрессия CD105 с 98.9% снижается до 68.6% (образцы пвМСК-#3п2 и пвМСК-#3п6). В то же время, иммортализованные культуры МСК до 24 пассажа включительно сохраняют свойственный МСК паттерн иммунопрофилирования (иМСК-#2п9, иМСК-#2п24), однако начиная с 24 пассажа (иМСК-#2п24) по 44 пассаж (иМСК-#2п44) происходит постепенная утрата экспрессии ими МСК-специфичных маркеров. Так, с 7 по 44 пассаж экспрессия CD73 снижается с 99.2% до 93.6%, экспрессия CD90 снижается с 99.1% до 96%, а экспрессия CD105 снижается с 96.1% до 65.4%.

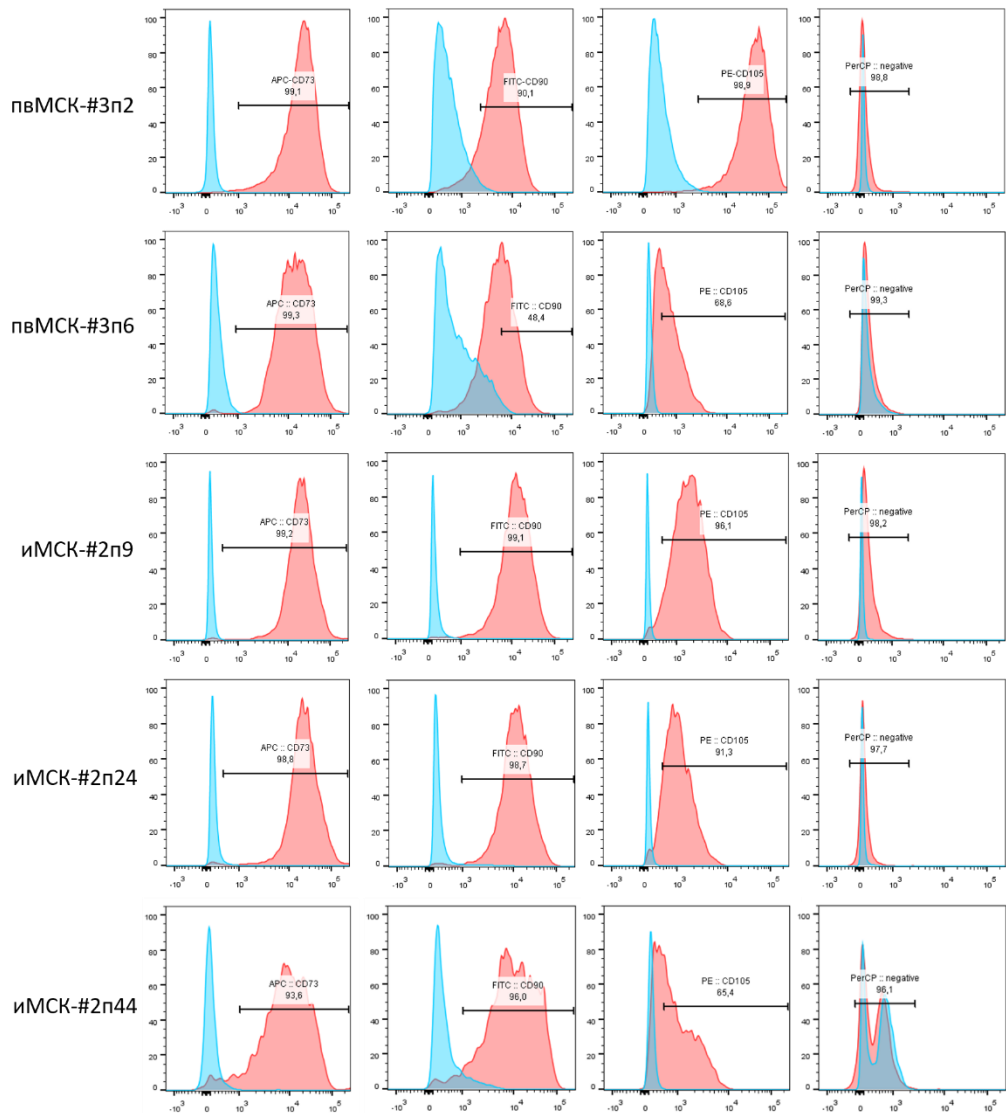


Рисунок 3.12 - Результаты иммунопрофилирования первично выделенных и иммортализованных МСК в динамике. пвМСК-#3п2 - первично выделенные

МСК образец 3 пассаж 2 и т.д., иМСК-#2п9 - иммортализованные МСК линия 2 пассаж 9 и т.д.

Прямой сравнительный анализ первично выделенной культуры МСК на 2-6 пассаже и полученной из нее иммортализованной культуры МСК на 7 пассаже демонстрирует, что процедура иммортализации (через гиперэкспрессию гена TERT) сама по себе не приводит к изменению профиля экспрессии МСК-специфичных поверхностных маркеров, более того, иммортализованные МСК значительно дольше сохраняют свойственный им фенотип, чем первично выделенная культура МСК, в которой к 6 пассажу уже 50% клеток утратили экспрессию одного из МСК-специфичных маркеров CD90 (Рисунок 3.13). При этом на всех пассажах как первично выделенные, так и иммортализованные культуры МСК, окрашиваются негативно антителами к гематопозитическим и эндотелиальным поверхностным маркерам: CD14, CD20, CD34 и CD45.

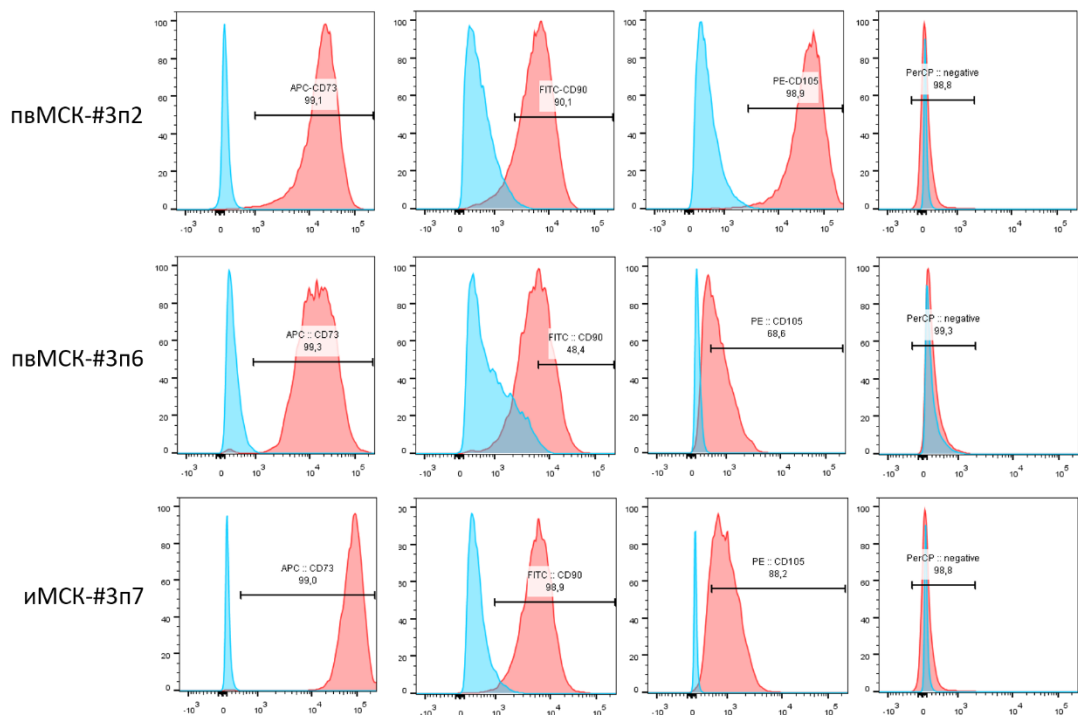


Рисунок 3.13 - Результаты прямого сравнения иммунного профиля первично выделенных и иммортализованных МСК на 6-7 пассажах. пвМСК-#3п2 - первично выделенные МСК образец 3 пассаж 2, иМСК-#3п7 - иммортализованные МСК линия 3 пассаж 7.

Профиль иммунопрофилирования полученных иммортализованных культур МСК с 7 по 24 пассаж соответствует таковому для коммерчески доступной линии МСК ASC52telo, а также полностью соответствует требованиям, предъявляемым к МСК Международным обществом клеточной терапии (ISCT) [Dominici et al, 2006; Viswanathan et al, 2019]. Таким образом, иммортализация клеточной культуры МСК не приводит к изменению иммунофенотипа первично выделенных МСК, но способствует его поддержанию в течение более длительного времени (до 24 пассажа и более) по сравнению с таковым в первично выделенной культуре (до 6 пассажа), хотя и наблюдается постепенная утрата экспрессии МСК-специфичных маркеров иммортализованными МСК с 24 по 44 пассажи.

Оценка пролиферативного потенциала иммортализованных культур МСК в динамике. Одним из ограничений применения первично выделенной культуры МСК для фундаментальных исследований и в качестве платформы для разработки перспективных лекарственных кандидатов для регенеративной медицины является их ограниченный пролиферативный потенциал, который начинает существенно снижаться к 10-11 пассажам культивирования. Иммортализация клеточной культуры замедляет клеточное старение и потенциально может быть решением и этого ограничения, свойственного для первично выделенных культур МСК. Анализ пролиферативной активности первично выделенных и иммортализованных МСК показал, что и в тех, и других культурах с пассированием постепенно снижается пролиферативный потенциал (Рисунок 3.14), однако, в иммортализованных культурах такое снижение происходит значительно позже. Так, в первично выделенных МСК с 5 по 11 пассаж скорость пролиферации падает в 1.7 раза, а время удвоения клеточной популяции возрастает с 61.5 ± 20.6 ч до 87.6 ± 24.0 ч. В то же время, на этом периоде пассирования (с 5 пассажа по 11 пассаж) скорость пролиферации иммортализованной культуры МСК практически не меняется относительно более ранних пассажей, а среднее время удвоения составляет

57.6 ± 12.1 ч. На 10-11 пассажах наблюдается достоверное различие в среднем времени удвоения культур первично выделенных и иммортализованных МСК: 87.6 ± 24.0 ч и 50.5 ± 9.8 ч, соответственно ($p < 0.05$, $n \geq 6$, ANOVA: тест Сидака-Холма). С 24 по 44 пассаж наблюдается снижение скорости пролиферации иммортализованной культуры МСК в 2.4 раза, и увеличение времени удвоения клеточной популяции возрастает в 3 раза с 59.1 ± 11.7 ч до 117.8 ± 15.8 ч ($n = 3$).

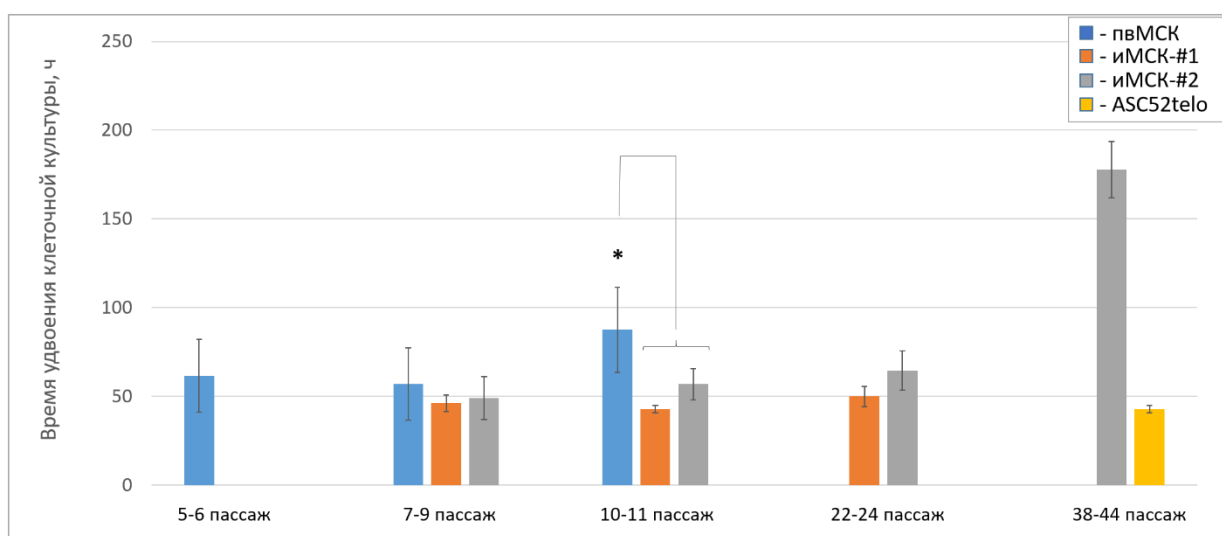


Рисунок 3.14 - Результаты оценки скорости пролиферации первично выделенных и иммортализованных МСК на различных пассажах: динамика роста плотности клеточной культуры (верхняя панель), время удвоения клеточной культуры (нижняя панель). пвМСК - первично выделенные МСК, иМСК-#1- иммортализованные МСК линия 1 и т.д., ASC52telo - коммерчески доступная линия иммортализованных МСК, 7-9п - 7-9 пассажи и т.д. * - $p < 0.05$, $n \geq 4$ (ANOVA, тест Сидака-Холма).

Полученные данные позволяют утверждать, что иммортализация клеточной культуры МСК не обеспечивает безграничной пролиферации культуры МСК, но позволяет замедлить ее старение и сохранить пролиферативный потенциал в течение более длительного времени по сравнению с первичной культурой МСК. Все это увеличивает эффективное время для проведения фундаментальных исследований культур МСК и ее секретомы, а также многократно (по нашим подсчетам минимум в 1000 раз)

увеличивает количество секрета, который потенциально может быть получен с одной такой культуры (для исследования или создания лекарственного кандидата). При прямом сравнении полученных иммортализованных культур МСК с коммерчески доступной культурой ASC52telo было установлено, что скорость пролиферации полученных нами иммортализованных клеточных культур сильно зависит от плотности конфлюента (т.е., иммортализованные МСК сохраняют способность к контактному торможению), в то время как линия ASC52telo практически не изменяет скорости своей пролиферации даже в плотном монослое (Рисунок 3.14), что свидетельствует о снижении в ней сигнальных каскадов, ответственных за контактное торможение, что в совокупности с другими признаками (сниженная потребность в ростовых факторах) может свидетельствовать о ее частичной трансформированности.

Оценка стабильности качественных и количественных характеристик секрета иммортализованных МСК. Поскольку способность МСК стимулировать процессы регенерации органов и тканей во многом обусловлена действием их секрета, а качественный и количественный состав секрета определяет его терапевтические свойства (в т.ч. способность оказывать нейропротективное и прорегенераторное действие), то критически важной задачей было установить, каким образом иммортализация клеточной культуры МСК может повлиять на качественный и количественный состав продуцируемых ими секрета.

Для качественного анализа состава секрета МСК и оценки возможных его изменений, произошедших вследствие иммортализации, был проведен протеомный анализ секретов первично выделенных и иммортализованных культур МСК. Всего было идентифицировано 1338 белков: в составе секрета первично выделенных МСК – 1207 белков, а в составе секрета иммортализованных МСК – 1214 белков. Перекрытие (идентичность) по качественному составу секретов первично выделенных и иммортализованных МСК составило 94.5%. Среди общих для секретов

первично выделенных и иммортализованных МСК «белков были идентифицированы нейротрофические факторы и нейропоэтические цитокины (**BDNF**, GDNF, IL-6); проангиогенные факторы (**VEGF-A**, **uPA**, tPA, PlGF, PDGF, ангиопоэтин» [Карагяур, 2013], ангиопоэтин-подобные белки-2/-4, фоллистатин, ингибин А, мидкин, MMP-2/-9, TIMP-1/-2, лептин, VASN); противовоспалительные цитокины (TGFb); факторы роста и белки, обладающие нейропротективной активностью, которые не могут быть отнесены к классическим нейротрофическим факторам (bFGF, EGF, IGF-I, KGF, SDF-1, нейрегулины, TCN2, NEGR1, GMFB, HDGF, CTGF, PEDF, NENF, а также белки, связывающие инсулиноподобный фактор роста); белки матрикса, стимулирующие процессы нейропротекции и регенерации нервной ткани (фибронектин, коллаген-1a1/-4a1, ламинин-a2/b2, периостин, нейролигин-2, нидоген-1/-2); белки теплового шока (HSP70, HSP74, HSP90B1 и др.), некоторые из которых, согласно ряду исследований, обладают нейропротективной активностью [Kim et al, 2020], а также молекулы, вовлеченные в процесс сортировки и упаковки микроРНК (в т.ч. нейропротективных) во внеклеточные везикулы (HNRNPU) [Zietzer et al, 2020; Zietzer et al, 2020a]. Ряд белков, идентифицированных в составе секретомов как первично выделенных, так и «иммортализованных МСК, представляет собой внутриклеточные белки МСК (цитоплазматические, ядерные, рибосомальные, митохондриальные и мембранные белки), содержание которых в секретоме, по-видимому, обусловлено как гибелью МСК в процессе кондиционирования, так и их включением в состав внеклеточных везикул, являющихся неотъемлемой частью клеточного секретомы» [Басалова и др., 2023]. Их значение для процессов нейропротекции и регенерации нервной ткани на сегодняшний день однозначно не установлено.

В секретоме МСК первично выделенных и иммортализованных МСК не было обнаружено ряда описанных ранее молекул с нейротрофической функцией (NGF), проангиогенных молекул (HGF), противовоспалительных молекул (IDO, IL-4, IL-10 и IL-13), впрочем, не было обнаружено и

провоспалительных цитокинов (IL-1A, IL-8, IL-12, TNF α , G-CSF, M-CSF), за исключением IL-6, для которого были показаны нейропротективные функции [Perígo-lo-Vicente et al, 2014]. Между секретами первично выделенных и иммортализованных МСК по содержанию молекул с доказанной нейропротективной и прорегенераторной активностью были обнаружены минорные различия: так только в секрете первично выделенных МСК были обнаружены LIF и VEGF-C, в то время как уникальными для секрета иммортализованных клеток оказались RFTN1 (белок внеклеточных везикул) и OLFML3 (olfactomedin like 3) – секретируемый белок матрикса, обладающий проангиогенными свойствами. Важным результатом исследования является отсутствие в протеоме секрета иммортализованных МСК детектируемых количеств теломеразы, которая потенциально могла бы передаваться с секретом клеток, и, возможно, могла бы индуцировать иммортализацию клеток, подвергнутых действию такого секрета. Более тщательный анализ потенциальной трансформирующей активности секрета иммортализованных МСК освещен в разделе 3.7.

Таким образом, сравнительный качественный анализ секретов первично выделенных и иммортализованных МСК не позволил выявить между ними значимых различий. Секретом МСК после иммортализации продолжает содержать широкий спектр нейропротективных (в т.ч. **BDNF**, bFGF, EGF, IGF-I, KGF, SDF-1, NEGR1, GMFB, HDGF, CTGF, PEDF, NENF HSP70), ангиогенных (в т.ч. VEGF и **uPA**), противовоспалительных (TGFb) молекул, а также белков матрикса (ламинин-a2/b2, нидоген-1/-2), необходимых для стимуляции нейропротекции и регенерации нервной ткани.

Важным параметром свойств секрета является стабильность его количественного состава при пассировании иммортализованных клеток, что и было в дальнейшем изучено с помощью комбинации иммуоферментного анализа (для доступных наборов ИФА) и с помощью методов ПЦР в реальном времени (для более широкого спектра мишеней). Так, результаты иммуоферментного анализа секретов (с нормировкой на 10^6 клеток)

показали, что иммортализация культуры МСК (на примере образца 3 первично выделенных МСК пвМСК-#3 и полученно из него линии иммортализованных МСК иМСК-#3) значимым образом не изменяет содержание BDNF, VEGF, uPA и HGF в кондиционированной среде (Рисунок 3.15, $n \geq 3$). Так, содержание BDNF в среде кондиционирования МСК составило 0.93 ± 0.29 нг/мл и 1.06 ± 0.57 нг/мл – до и после иммортализации, соответственно. Содержание VEGF в среде кондиционирования МСК до и после иммортализации составило 0.53 ± 0.06 нг/мл и 0.66 ± 0.19 нг/мл, соответственно. Содержание HGF в среде кондиционирования МСК до и после иммортализации составило 3.9 ± 0.37 нг/мл и 2.8 ± 0.78 нг/мл, соответственно. Содержание uPA в среде кондиционирования МСК до и после иммортализации составило 1.63 ± 0.24 нг/мл и 2.41 ± 0.56 нг/мл, соответственно. Пассирование иммортализованных культур МСК с 9 по 42 пассаж также не выявило значимых различий в содержании BDNF, VEGF, uPA и HGF в их среде кондиционирования (Рисунок 3.15, $n \geq 3$).

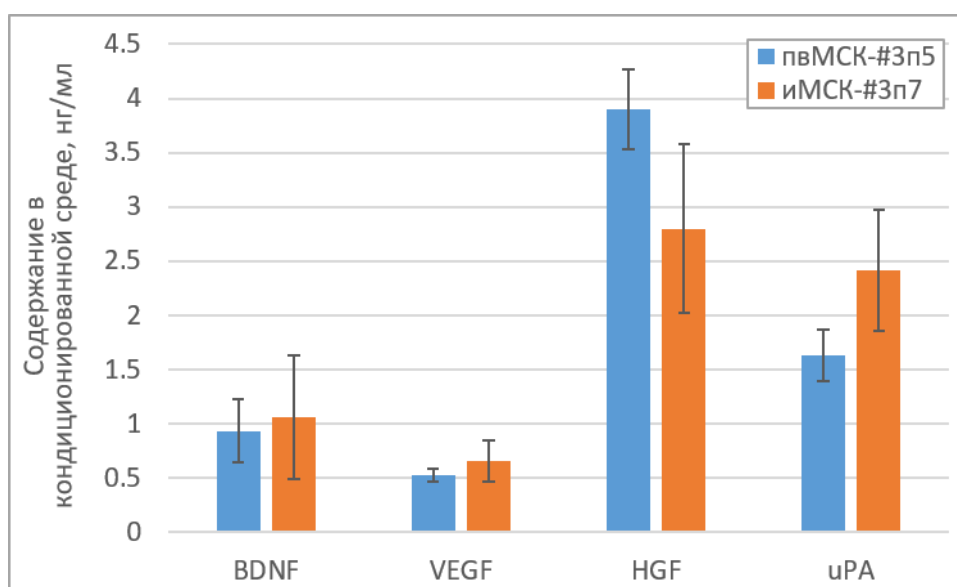


Рисунок 3.15 - Влияние иммортализации культуры МСК на продукцию основных нейропротективных и ангиогенных факторов. пвМСК-#3п5 - первично выделенные МСК образец 3 пассаж 5, иМСК-#3п7 - иммортализованные МСК линия 3 пассаж 7 (ИФА), $n \geq 3$ (ANOVA, тест Сидака-Холма).

Таким образом, полученные данные позволяют утверждать, что процесс иммортализации МСК значимым образом не влияет на качественный и количественный состав секрета МСК. Более того, по данным иммуноферментного анализа содержание ключевых нейротрофических, проангиогенных и прорегенеративных молекул (BDNF, VEGF, uPA и HGF) в секрете остается на относительно постоянном уровне в ходе пассирования клеток с 9 по 42 пассаж (Рисунок 3.16).

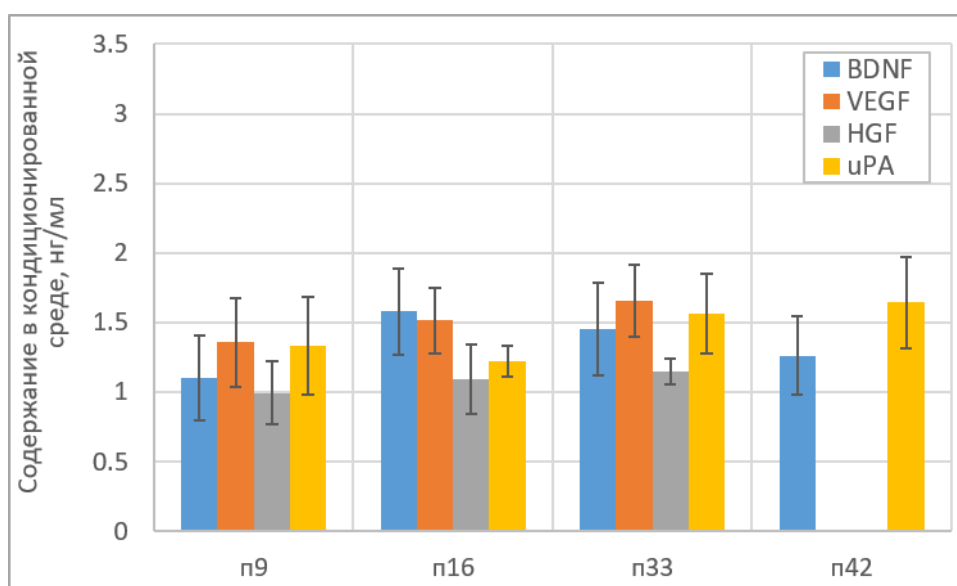


Рисунок 3.16 - Продукция основных нейротрофических и ангиогенных факторов культурой иммортализованных МСК (иМСК-#2) в динамике (ИФА). п9 - пассаж 9 и т.д., n = 3 (ANOVA, тест Ньюмена-Кейлса).

Анализ более широкого спектра мишеней, включающих нейротрофические и проангиогенные молекулы (BDNF, IL-6, uPA, VEGF, HGF), основные провоспалительные (IL-1A, TNF α) и противовоспалительные (IL-4, IL-10, IL-13, TGF β 1, IDO) цитокины, с помощью методов ПЦР в реальном времени также показал, что иммортализация культуры МСК практически не меняет уровня экспрессии мРНК основных протестированных нейротрофических, проангиогенных, провоспалительных и противовоспалительных молекул - различия статистически недостоверны (Рисунок 3.17, n = 3).

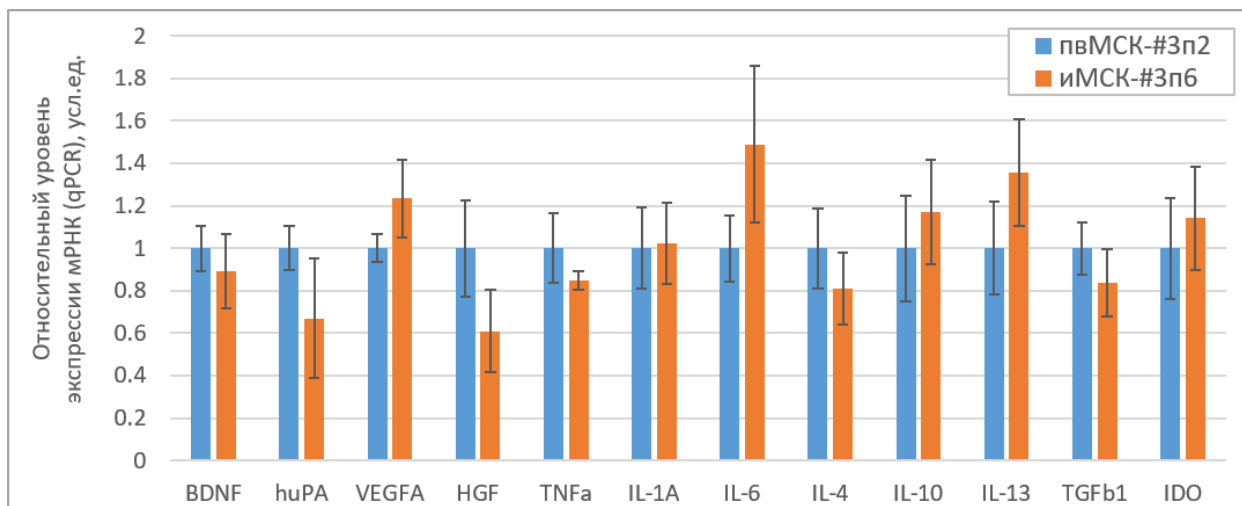


Рисунок 3.17 - Сравнение уровней экспрессии мРНК основных нейропротективных и проангиогенных факторов, провоспалительных и противовоспалительных молекул в культурах МСК до иммортализации (пвМСК-#3п2 - первично выделенные МСК образец 3 пассаж 2) и после нее (иМСК-#3п6 - иммортализованные МСК линия 3 пассаж 6) - ПЦР в реальном времени. п2 - пассаж 2 и т.д., n = 3 (ANOVA, тест Ньюмена-Кейлса).

Анализ уровня экспрессии мРНК данных молекул в ходе пассирования иммортализованных клеточных культур с 9 по 44 пассаж не выявил достоверного изменения уровня экспрессии мРНК для всех исследованных факторов - нормировка осуществлена на уровень экспрессии соответствующей белковой молекулы в образце первого проанализированного пассажа для данной иммортализованной линии - пассаж 14 для иМСК-#1 и пассаж 9 для иМСК-#2 (Рисунок 3.18, n = 3). Полученные результаты по большинству факторов хорошо соотносятся с выше описанными результатами иммуноферментного анализа, однако, существует небольшое расхождение по результатам ИФА и ПЦР в реальном времени для HGF на 16 и 33 пассажах: согласно результатам ПЦР в реальном времени количество мРНК HGF на 16 и 33 пассажах возрастает в 2.7 и 3.2 (по сравнению с пассажем 9), соответственно, при этом уровень HGF, согласно данным ИФА с 9 по 33 пассаж практически не меняется. Статистический анализ показывает отсутствие достоверных различий в уровне экспрессии мРНК HGF между

группами иМСК-#2 с 9 по 44 пассажи (one way ANOVA, попарное множественное сравнение, метод Холма-Сидака), а наблюдаемое расхождение объясняется небольшой мощностью выборки ($n = 3$).

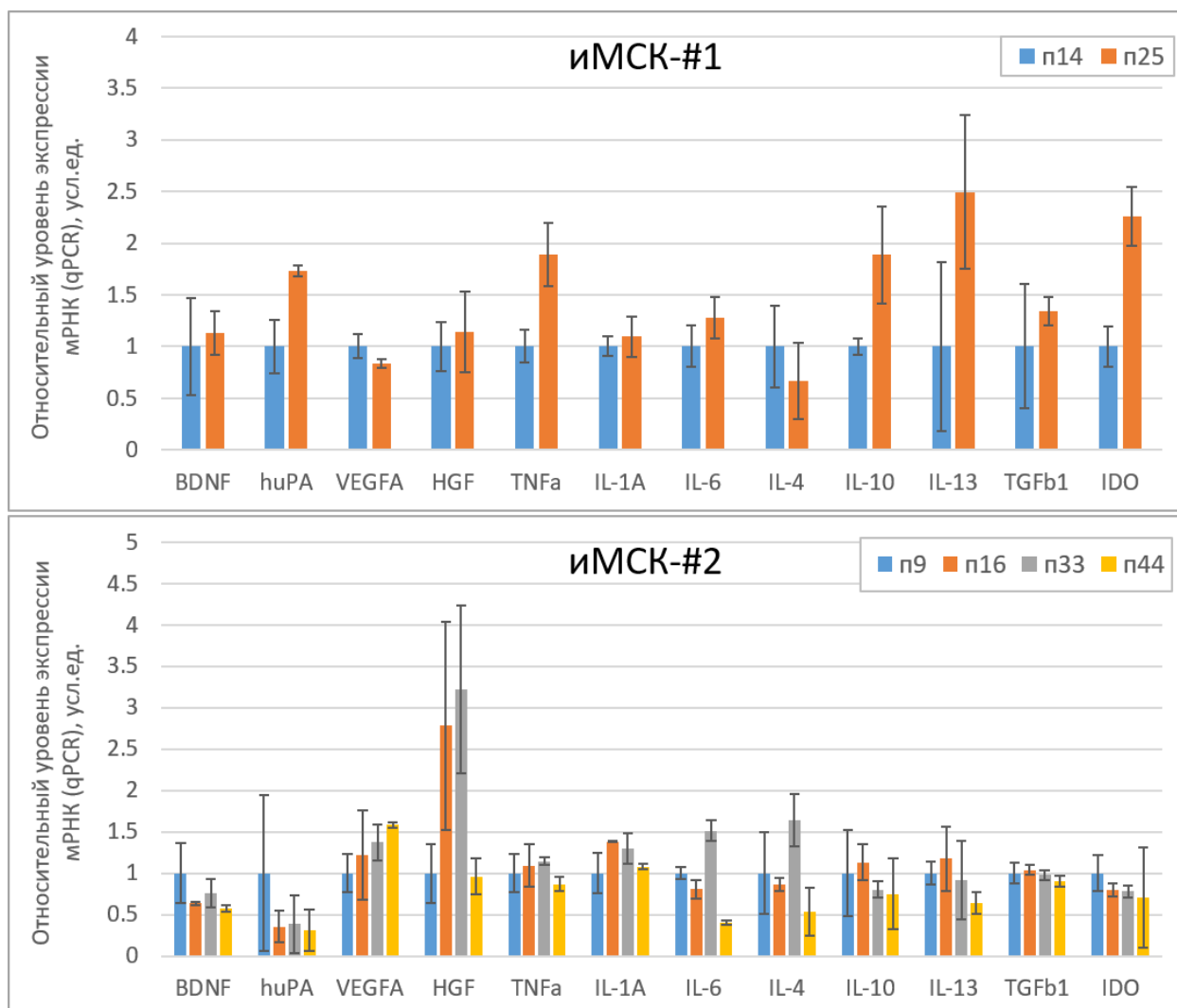


Рисунок 3.18 - Относительный уровень экспрессии мРНК основных нейропротективных и ангиогенных факторов, провоспалительных и противовоспалительных молекул в immortalized линиях МСК иМСК-#1 и иМСК-#2 в динамике (ПЦР в реальном времени). п14 - пассаж 14 и т.д., $n = 3$ (ANOVA, тест Ньюмена-Кейлса).

Благодаря стабильности своих свойств immortalized МСК и их секретом могут быть использованы в качестве модельных объектов для изучения механизмов их нейропротективного и прорегенераторного действия, а также рассмотрены в качестве платформы для разработки перспективных

лекарственных кандидатов, направленных на стимуляцию процессов регенерации. По имеющимся у нас данным, такие всеобъемлющие результаты характеристики секреторной активности immortalized MCK (с анализом качественного и количественного состава секрета, данных о стабильности состава секрета после immortalization и в процессе пассирования) являются новыми и получены впервые.

3.2.4 Разработка и создание линий MCK, конститутивно или индуцируемо экспрессирующих BDNF и uPA

Immortalization MCK замедлила их старение и значительно увеличила промежуток времени (минимум с 8 до 24 пассажа) продукции секрета с относительно стандартным качественным и количественным составом. Забегая вперед, отметим, что неконцентрированный секретом первично выделенных MCK обладает слабо выраженной нейропротективной активностью в модели интрацеребральной посттравматической гематомы, и для потенциации его активности необходимо осуществлять концентрирование секрета в 5-25 раз (подробнее будет показано далее), что, с одной стороны, может изменять соотношение его компонентов, а, с другой, при разработке потенциального лекарственного кандидата для стимуляции процессов регенерации увеличивать трудозатраты и стоимость фармакологического производства при общем снижении выхода терапевтической субстанции. Поскольку immortalization существенным образом не изменила качественный и количественный состав секрета MCK, то логично предположить, что ограничения, свойственные для секрета первично выделенных MCK, будут характерны и для секрета immortalized MCK.

Мы предположили, что данное ограничение может быть преодолено путем создания генетически модифицированных клеточных культур MCK (на базе immortalized MCK), способных гиперэкспрессировать нейропротективные и прорегенераторные факторы роста и цитокины в составе

секретом МСК. В качестве генов для повышенной экспрессии были выбраны гены BDNF и uPA (по причинам, подробно описанным в разделе 3.1), а также проангиогенные молекулы, как класс. Гиперэкспрессию BDNF и uPA предполагалось моделировать путем непосредственного введения генов, их кодирующих, в клетки immortalized культуры МСК.

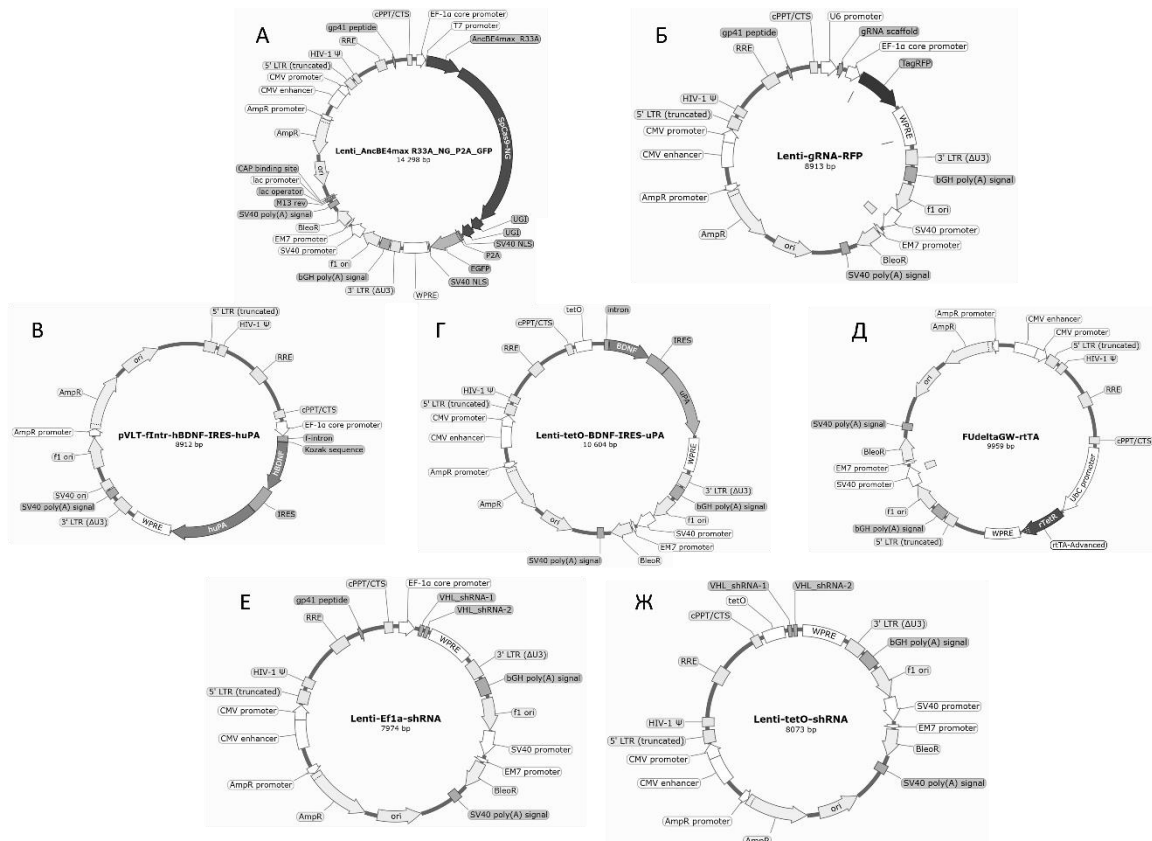


Рисунок 3.19 - Карты генетических лентивирусных конструкций, использованных для повышения уровня экспрессии BDNF, uPA и проангиогенных факторов роста методами редактирования генома и экспрессии трансгена. А и Б - вектора для редактирования гена VHL: редактор оснований (Lenti-AncBE4max-R33A_NG_P2A_GFP) и ген gRNA (Lenti-gRNA-RFP), В - вектор для конститутивной экспрессии комбинации белков BDNF и uPA, Г - вектор для индуцируемой экспрессии комбинации белков BDNF и uPA, Д - вектор, кодирующий сенсор для тетрациклина (Addgene, #19780), Е - вектор для конститутивной экспрессии shRNA к VHL, Ж - вектор для индуцируемой экспрессии shRNA к VHL.

Для повышения экспрессии широкого спектра проангиогенных факторов предполагалось задействовать HIF-индуцируемый механизм их экспрессии

через снижение трансляции мРНК VHL – одного из супрессоров НИФ. Для этого был применен 2 альтернативных подхода: выключение гена VHL с помощью модификации системы CRISPR/Cas9 и подавление его активности на уровне мРНК с помощью коротких шпилечных РНК (shRNA – short hairpin RNA). Поскольку постоянная гиперпродукция факторов роста или малых интерферирующих РНК может негативно сказываться на пролиферации и свойствах клеточной культуры [Kabekkodu et al, 2018], для выполнения этой задачи бы разработаны системы конститутивной и индуцируемой (индукция тетрациклином/доксициклином) [Das et al, 2016] экспрессии BDNF + uPA, а также shRNA к мРНК VHL. Карты использованных генетических конструкций приведены на Рисунке 3.19.

Для подтверждения работоспособности индуцируемой системы экспрессии BDNF + uPA и установления оптимальных концентраций индуктора (доксициклина) было проведено титрование концентраций доксициклина (0, 20, 80, 200 и 500 нг/мл) в среде культивирования клеточной культуры МСК, трансдуцированной вирусными частицами, кодирующими гены BDNF и uPA под индуцируемым тетрациклином/доксициклином промотором tetO, с последующим анализом среды культивирования на содержание BDNF и uPA с помощью иммуноферментного анализа, аналогично тому, как описано в разделе 2.5.

Результаты тестирования индуцируемой системы экспрессии и определения оптимальной концентрации индуктора в среде культивирования позволяют утверждать, что предложенная система экспрессии обеспечивает высокий уровень продукции целевых нейропротективных молекул BDNF и uPA. При концентрации доксициклина в среде культивирования в диапазоне 80-500 нг/мл концентрации BDNF и uPA человека в среде кондиционирования достигают «плато» и статистически достоверных различий между их концентрациями в этих группах не наблюдается. Доксициклиновая система индукции является модульной и в использованном варианте содержит 6 сайтов

связывания трансаактиватора. Эффективность индукции определяется количеством сайтов связывания, окупированных трансаактиватором.

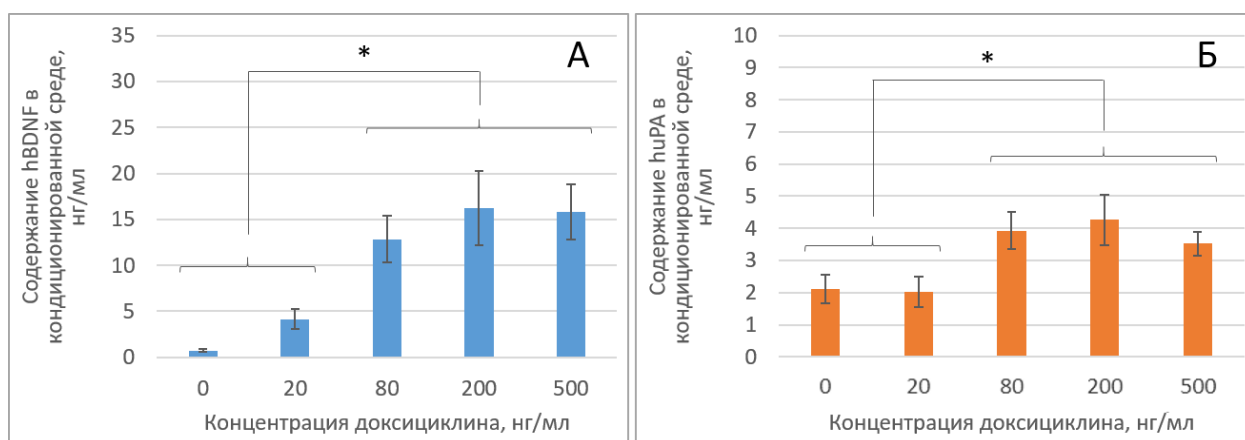


Рисунок 3.20 - Подбор оптимальной концентрации доксициклина для индуцируемой экспрессии BDNF (А) и uPA (Б) человека в культуре МСК, генетически модифицированной векторами Lenti-tetO-BDNF-IRES-uPA и FuDeltaGW-rtTA (Addgene, #19780). * - $p < 0.05$, $n = 3$ (ANOVA, тест Ньюмена-Кейлса).

Для того, чтобы обеспечить и поддерживать супрамаксимальный уровень продукции рекомбинантных белков (с учетом периода полураспада доксициклина в 24 часа при использованных условиях культивирования) нами была выбрана концентрация доксициклина 200 нг/мл, которая согласно результатам предварительного тестирования обеспечивала несколько большую продукцию рекомбинантного BDNF по сравнению с концентрацией 80 нг/мл, хотя статистически достоверных различий в концентрациях BDNF и uPA между этими группами зафиксировано не было (Рисунок 3.20). Концентрация доксициклина в 200 нг/мл была в дальнейшем использована для наработки секрета в генетически модифицированных МСК с индуцируемой системой экспрессии BDNF + uPA, а также shRNA к мРНК VHL. При концентрации доксициклина в среде культивирования 200 нг/мл содержание BDNF в секрете возрастало ~ в 22 раза с 0.74 ± 0.14 нг/мл до 16.22 ± 4.07 нг/мл (* - $p < 0.05$, $n = 3$, ANOVA: тест Ньюмена-Кейлса), а содержание uPA

возрастало ~ в 2 раза с 2.11 ± 0.44 нг/мл до 4.26 ± 0.78 нг/мл (* - $p < 0.05$, $n = 3$, ANOVA: тест Ньюмена-Кейлса).

Редактирование гена VHL с помощью системы редактирования CRISPR/Cas9 (модификация редактор оснований) позволило подавить около 75% аллелей в популяции иммортализованных МСК и это привело к увеличению содержания VEGF в кондиционированной среде в 2 раза с 0.57 ± 0.12 нг/мл до 1.12 ± 0.21 нг/мл ($n = 3$), однако скорость пролиферации такой клеточной культуры после редактирования гена VHL визуально снизилась в 3-4 раза, что не позволило набрать достаточное количество клеточной массы для наработки секрета с целью изучения его нейропротективных свойств *in vivo*. Уровень экспрессии мРНК VHL в отредактированных клетках не оценивали, поскольку согласно литературным и нашим собственным данным уровень мРНК целевого белка при точечных мутациях в ДНК в большинстве случаев не является показателем успешности редактирования [Karagaur et al, 2018].

Сравнительный уровень экспрессии мРНК целевых нейропротективных молекул (BDNF, uPA, VEGF и HGF), а также их концентрация в среде культивирования генетически модифицированных МСК с конститутивной и индуцируемой экспрессией BDNF + uPA и shRNA к мРНК VHL приведена на рисунке 3.21. По результатам сравнения различных систем экспрессии можно утверждать, что и конститутивная, и индуцируемая система экспрессии обеспечивают продукцию искомым белков и shRNA, однако наибольший уровень экспрессии BDNF, uPA и VEGF наблюдается при использовании индуцируемой системы экспрессии.

Стоит отметить, что дополнительная генетическая модификация иммортализованных культур МСК (и конститутивной и индуцируемой системами экспрессии), также привела к замедлению скорости их пролиферации, причем наиболее значимое снижение наблюдалось в культуре конститутивно экспрессирующих BDNF + uPA и shRNA, что вносит определенные ограничения на возможность ее практического использования в

дальнейшем. Кондиционированные среды от генетически модифицированных культур МСК были собраны и подготовлены (как это писано в разделе 2.9) для тестирования их нейропротективной активности в модели интрацеребральной посттравматической гематомы.

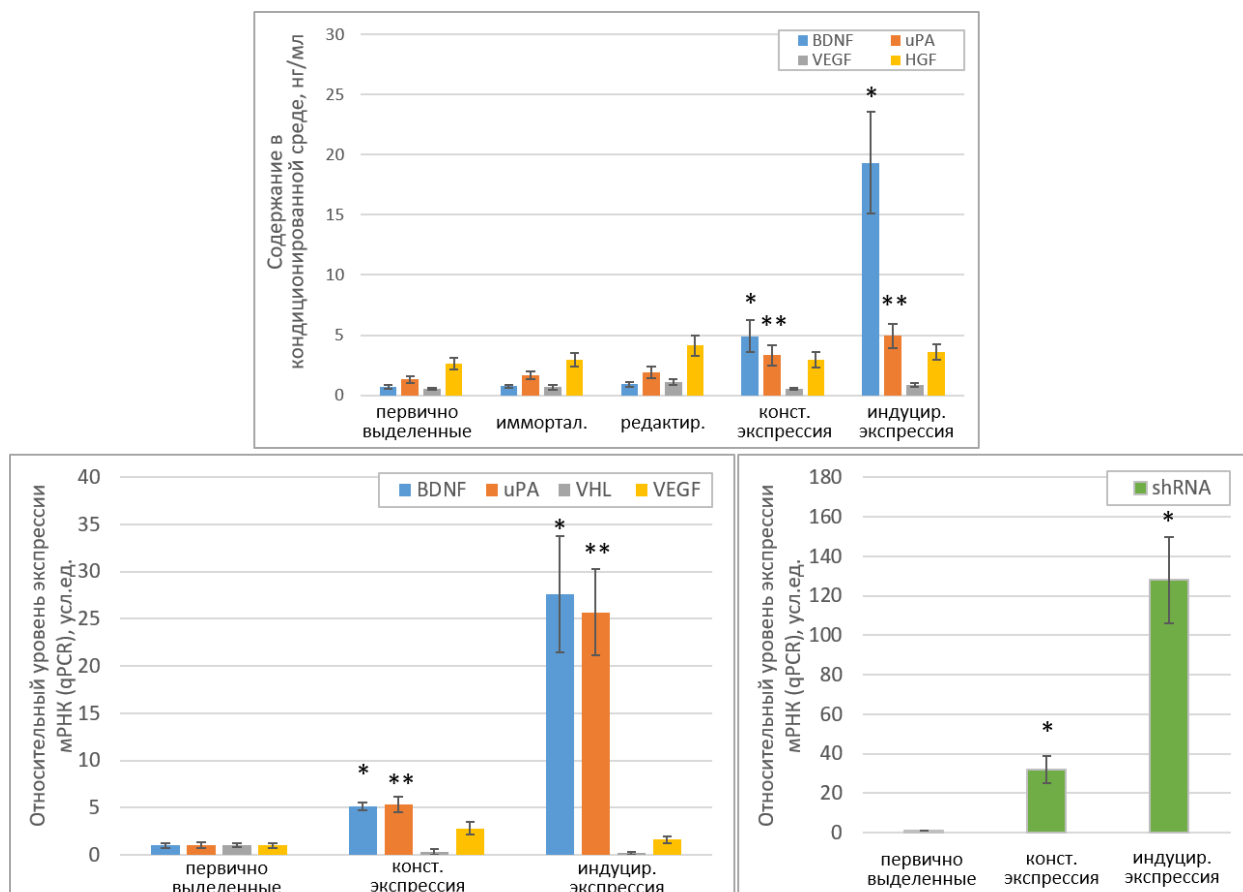


Рисунок 3.21 - Сравнение продуктивности конститутивной и индуцируемой систем экспрессии по уровню продукции рекомбинантных белков (ИФА): BDNF, uPA и проангиогенных факторов (VEGF, HGF), и по относительному уровню экспрессии мРНК BDNF, uPA, VHL, VEGF, shRNA (qPCR) в иммортализованной культуре МСК и МСК-#3. *,** - $p < 0.05$ против соответствующих значений в группе «первично выделенные», $n = 3$ (ANOVA, тест Ньюмена-Кейлса).

Секретом МСК содержит не только «белковые молекулы (факторы роста, цитокины и белки матрикса), но и внеклеточные везикулы, переносящие внутриклеточные белки, кодирующие и некодирующие РНК, которые, как было ранее показано, способны проходить через гематоэнцефалический

барьер» [Басалова и др., 2023] и изменять транскрипционную программу целевых клеток [Saint-Pol et al, 2020; Ramos-Zaldívar et al, 2022]. Другими словами, секретом МСК можно рассматривать, как комбинированный препарат, сочетающий в себе сильные стороны терапии рекомбинантными белками (немедленная активация антиапоптотических сигнальных каскадов в очаге острого повреждения, что особенно важно в рамках стимуляции нейропротекции) и генотерапевтическими конструкциями (природоподобные динамика экспрессии и градиент концентраций терапевтических молекул), что позволяет комплексно стимулировать процесс регенерации. Согласно современным представлениям о «механизмах сортировки биологических молекул во внеклеточные везикулы, большая часть молекул попадает в них случайным образом, путем захвата их из цитоплазмы, причем вероятность захвата определенных белков (в основном цитоплазматических), мРНК» [Басалова и др., 2023] или микроРНК многократно возрастает при гиперэкспрессии кодирующих их генов [Guduric-Fuchs et al, 2012; Ridder et al, 2015]. Мы проанализировали содержание мРНК BDNF, uPA и shRNA к гену VHL в секретоме иммортализованных МСК и МСК, генетически модифицированных соответствующими индуцируемыми системами экспрессии, с помощью ПЦР в реальном времени. Результаты анализа показали, что при индуцированной доксициклином гиперэкспрессии BDNF, uPA и shRNA их количество в секретоме (по-видимому, в составе внеклеточных везикул) возрастает в среднем в 4.8, 3.3 и 22.7 раза, соответственно, по сравнению с их содержанием в секретоме иммортализованных, но генетически не модифицированных МСК (Рисунок 3.22). В секретоме иммортализованных МСК количество мРНК BDNF и uPA находится на уровне предела чувствительности метода. Поскольку shRNA к гену VHL в секретоме иммортализованных МСК не детектируется, в качестве точки отсчета был взят средний уровень сигнала, детектируемый на 45 цикле ПЦР в реальном времени соответствующих образцов. Влечет ли такое повышение содержания мРНК нейропротективных факторов и shRNA к гену

VHL в секрете МСК изменение транскрипционной программы целевых клеток в очаге повреждения в модели *in vivo* остается неустановленным.

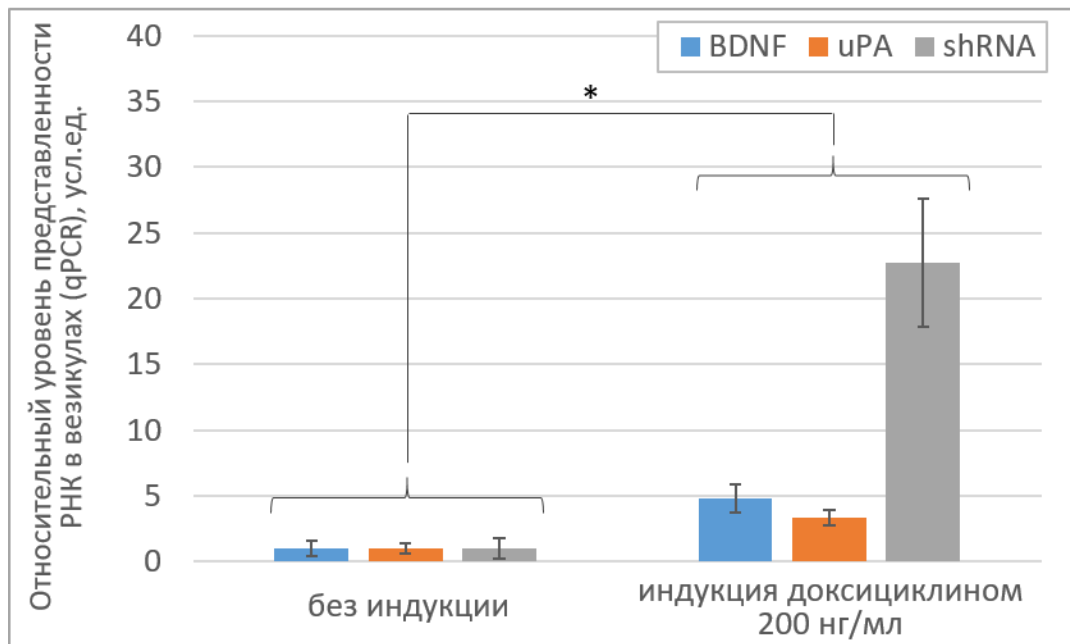


Рисунок 3.22 - Относительный уровень представленности мРНК BDNF и uPA, а также shRNA к VHL в составе секретома (предположительно, во внеклеточных везикулах) при индукции их экспрессии в иммортализованной культуре МСК и МСК-#3. (* - $p < 0.05$ против соответствующих значений в группе «без индукции», $n = 3$, t-критерия Стьюдента).

Таким образом, анализ лизатов и кондиционированных сред от геномодифицированных клеточных культур МСК показал, что конститутивная и индуцируемая экспрессия генов BDNF, uPA и shRNA к гену VHL, приводит к повышению уровня содержания их РНК в лизате модифицированных клеток и повышению целевых белков BDNF, uPA и VEGF в среде культивирования. Более высокий уровень экспрессии и по уровню РНК и по уровню целевого белка позволили обеспечить индуцируемые системы экспрессии. Более того, в системах индуцированной экспрессии BDNF, uPA или shRNA было отмечено наличие соответствующих РНК в составе секретома (предположительно, в составе внеклеточных везикул). Конститутивная генетическая модификация (в т.ч. с помощью системы редактирования генома) привела к значительному снижению

пролиферативного потенциала МСК, что ограничивает возможность практического использования такого рода модификаций с целью создания промышленно-значимых линий клеток-продуцентов. По имеющимся у нас данным, результаты прямого сравнения эффективности конститутивной и индуцируемой систем экспрессии целевых белков и некодирующих РНК в МСК получены впервые.

3.3 Изучение нейропротективной и прорегенераторной активности плазмидной бицистронной генетической конструкции, кодирующей гены BDNF и uPA, на модели травматической денервации задней конечности мыши

Состояние проблемы на момент исследования. Функциональная регенерация органов и тканей требует восстановления их кровоснабжения и иннервации. При этом сам процесс регенерации является сложным и многоэтапным процессом и для успешной регенерации требует воздействия на различные его стадии и компоненты [McGinn et al, 2016; Marklund et al, 2019]. Во множестве доклинических и клинических исследований было показано, что моногенная терапия при стимуляции регенеративных процессов значительно уступает по своей эффективности комплексному подходу, причем наиболее выраженным эффектом обладают комбинации терапевтических молекул с различными модальностями, функционально дополняющими друг друга [Gupta et al, 2009; Makarevich et al, 2015].

Вопросы регенерации нервной ткани и ее защиты после повреждения изучены недостаточно, что не позволяет разрабатывать эффективные подходы для стимуляции регенерации периферической и центральной нервной системы после повреждения. Из данных литературы известно, что нейротрофические факторы играют ключевую роль в процессах выживания, функционирования и регенерации нервной системы [Boyd et al, 2003; Гомазков, 2006; Gordon et al, 2009]. Основываясь на результатах собственных исследований и данных мировой литературы была «разработана генетическая конструкция pVax1-

hBDNF, кодирующая ген мозгового нейротрофического фактора человека, которая стимулировала нейропротекцию, структурную и функциональную регенерацию волокон периферического нерва после травмы» [Karagyaur et al, 2015]. Однако, сравнительный анализ результатов исследования рVax1-hBDNF с таковыми для мезенхимных мультипотентных стромальных клеток (МСК, которые считаются одним из основных стимуляторов и регуляторов регенеративных процессов [Sagaradze et al, 2020]) на аналогичной модели, показал, что МСК обладают более выраженным эффектом [Loratina et al, 2011; Karagyaur et al, 2015], обусловленным способностью продуцировать широкий спектр факторов роста, цитокинов, ферментов, белков матрикса и микроРНК, многие из которых обладают нейропротективной и прорегенераторной активностью [Caplan et al, 2006; Kalinina et al, 2015].

Для того, чтобы функционально дополнить активность BDNF (как одной из основных нейропротективных молекул [Boyd et al, 2003; Гомазков, 2006]) в процессах регенерации нервной ткани был выбран урокиназный активатор плазминогена (uPA), обладающий широким спектром биологической и терапевтической активности: способностью активировать противосвертывающую систему крови, запускать процессы ремоделирования внеклеточного матрикса и активации факторов роста (в т.ч., и BDNF), индуцировать ангиогенез, прорастание нейритов, миграцию эндотелиоцитов и глиальных клеток [Naldini et al, 1995; Traktuev et al, 2007; Semina et al, 2016a]. Для сочетанной экспрессии BDNF и uPA была создана бицистронная генетическая конструкция рNCure, которая «обеспечивала высокий уровень продукции функционально активных BDNF и uPA, что было подтверждено в модели стимуляции роста нейритов в культуре клеток нейробластомы мыши Neuro2a» [Karagyaur et al, 2020] (см. раздел 3.2.1). По имеющимся у нас данным разработанная бицистронная плазмидная генетическая конструкция, кодирующая BDNF и uPA, является первым генотерапевтическим препаратом для комплексной стимуляции нейропротекции и регенерации нервной ткани после повреждения. Полученная конструкция рNCure была использована для

повышения экспрессии комбинации факторов BDNF и uPA с целью изучения их нейропротективной и прорегенераторной активности *in vivo* на модели травматической денервации задней конечности мыши.

3.3.1 Изучение эффективности доставки генотерапевтических конструкций в мышечные волокна путем множественной инъекции

В наших предшествующих исследованиях [Karagyaur et al, 2015] для доставки генотерапевтических плазмидных конструкций в мышечные волокна был использован подход, сочетающий в себе гидродинамический удар и электропорацию [Manthorpe et al., 1993]. Хотя он увеличивал эффективность доставки целевой плазмиды в мышечные волокна, он был сопряжен с существенным уровнем некроза в мышечной ткани (в среднем 10-30%), что влияло на чистоту эксперимента и снижало вероятность потенциальной клинической трансляции данной разработки (гидродинамический удар и электропорация в клинических условиях не применяются, так как вызывают боль и значительные травмирующие эффекты). С учетом этих фактов протокол введения плазмидной конструкции был модифицирован, и инъекция ударной дозы раствора плазмиды в одну точку мышцы с последующей электропорацией была заменена несколькими внутримышечными инъекциями плазмиды без электропорации.

Многочисленные внутримышечные инъекции небольших количеств раствора плазмиды (обкалывание мышц) более клинически релевантны, однако было неясно, обеспечивают ли они приемлемый уровень экспрессии рекомбинантного белка. Используя маркерную плазмиду pVax1m- β -Gal, мы «показали, что обкалывание мышц обеспечивает доставку плазмиды в мышечные волокна с такой же эффективностью, как и одномоментное введение большого объема раствора плазмиды, сопровождающееся гидродинамическим ударом, в одну точку мышцы. Инъекции в шесть различных точек передней большеберцовой мышцы обеспечили трансфекцию» [Karagyaur et al, 2020] 68.3 ± 12.7 мышечных волокон (β -

галактозидаза-позитивные), в то время как единомоментная инъекция раствора плазмиды pVax1m- β -Gal, сопровождающаяся гидродинамическим ударом, в одну точку мышцы привела к трансфекции только 52.8 ± 11.5 мышечных волокон (различие не является статистически достоверным, $n = 3$) (Рисунок 3.23).

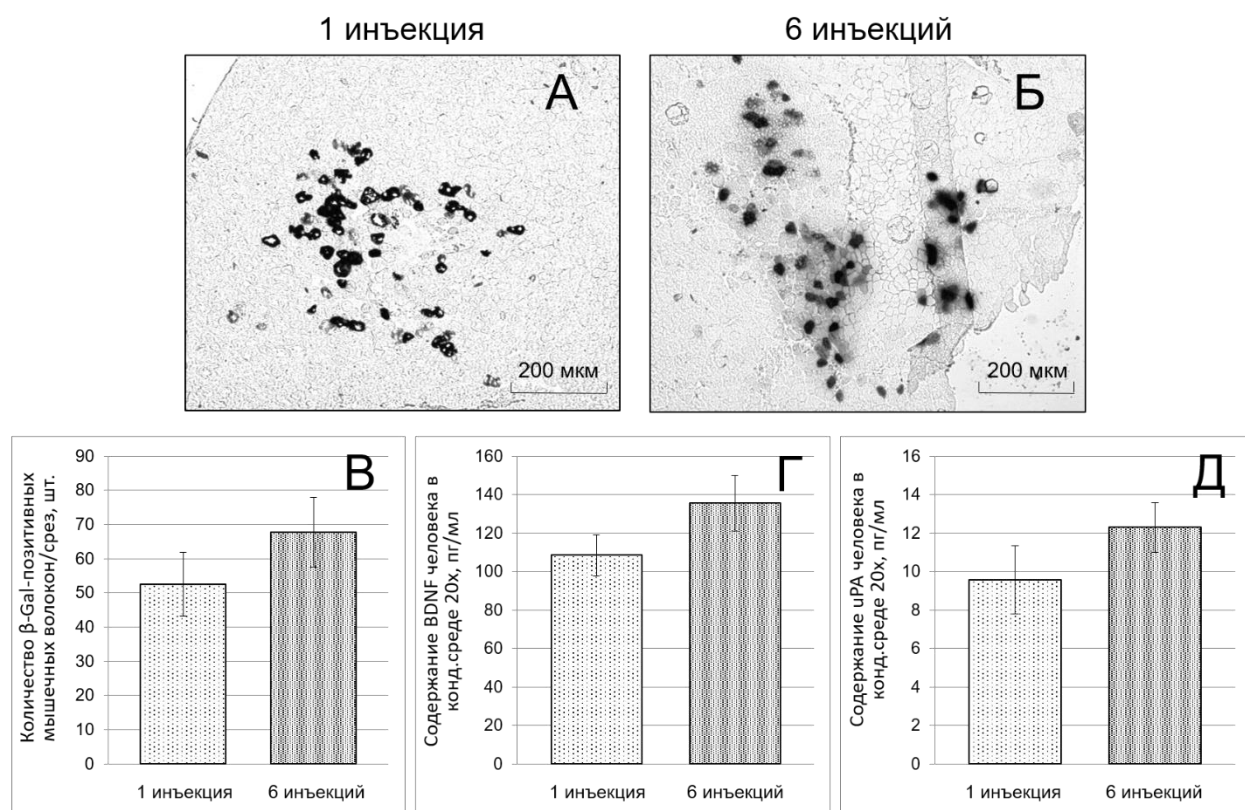


Рисунок 3.23 - Сравнительный анализ эффективности различных подходов к доставке плазмидных генотерапевтических конструкций в мышечные волокна: 1 инъекция с гидродинамическим ударом или обкалывание мышцы (6 инъекций). А, Б - криосрезы передней большеберцовой мышцы мыши, специфически окрашенные на β -Gal; В - подсчет количества β -Gal-позитивных мышечных волокон при различных способах введения pVax1m- β -Gal; Г, Д - количество рекомбинантных BDNF и uPA человека, в среде культивирования (20x) мышечных эксплантов при различных способах введения pNCure. $n = 3$.

Анализ экспрессии рекомбинантных BDNF и uPA человека в сконцентрированной кондиционированной культуральной среде от мышечных эксплантов показал, что обкалывание мышц небольшими объемами раствора плазмиды pNCure обеспечивает такой же уровень продукции рекомбинантного белка, как и единомоментная инъекция,

сопровождающаяся гидродинамическим ударом. Шесть инъекций pNCure в различные точки передней большеберцовой мышцы обеспечивали продукцию мышечным эксплантом 136.5 ± 18.4 пг/мл BDNF и 12.3 ± 1.7 пг/мл uPA, а единомоментная внутримышечная инъекция pNCure в одну точку передней большеберцовой мышцы обеспечила продукцию 107.3 ± 12.5 пг/мл BDNF и 9.6 ± 2.0 пг/мл uPA. Различия между двумя группами являются статистически недостоверными, но было отмечено увеличение экспрессии рекомбинантных белков BDNF и uPA в группе, где осуществляли обкалывание мышц небольшими количествами плазмиды ($n = 3$) (Рисунок 3.23).

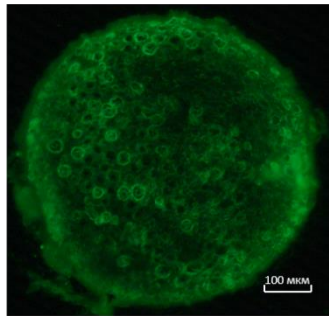
По имеющимся у нас данным, полученные результаты прямого сравнения различных подходов к инъекции генотерапевтических конструкций в мышечные волокна являются оригинальными и получены впервые.

3.3.2 Изучение нейропротективной и прорегенераторной активности бицистронной генетической конструкции, кодирующей комбинацию BDNF и uPA человека, на модели травматической денервации задней конечности мыши

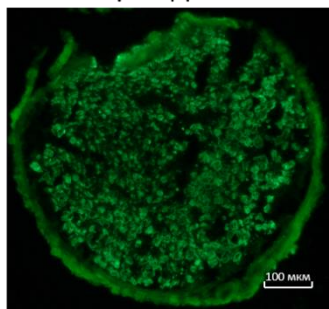
Для изучения нейропротективной активности комбинации BDNF и uPA в составе бицистронной генетической конструкции pNCure на модели травматической денервации задней конечности была использована описанная ранее модель травмы общего малоберцового нерва мыши [Karagyaour et al., 2015]. Для моделирования денервации конечности общий малоберцовый нерв на соответствующей стороне тела раздавливали, что вызывало нарушение проведения нервных импульсов по нерву, что подтверждалось снижением амплитуды суммарного потенциала действия нерва (СПДН), снижением скорости его проведения (увеличение продолжительности латентного периода) в ходе электрофизиологического исследования, а также нарушением иммуногистохимической картины криосрезов нерва, окрашенных антителами к белку миелина или аксонов (Рисунок 3.24).

Окрашивание криосрезов нерва антителами к МВР (основной белок миелина)

до повреждения

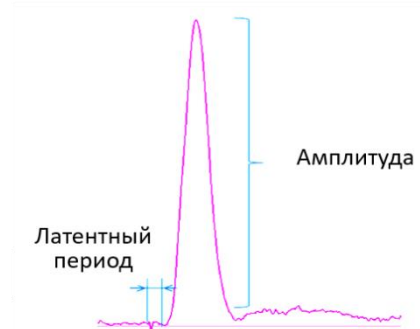


через 4 суток после
повреждения



Проводимость периферического нерва

до повреждения



через 7 суток после повреждения

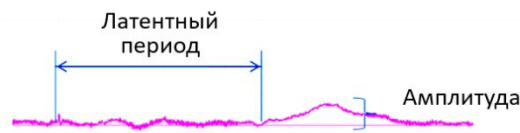


Рисунок 3.24 - Раздавливание периферического нерва приводит к нарушению его структуры (иммуногистохимическое окрашивание) и функции (проводимость периферического нерва).

«Внутримышечные инъекции генетической конструкции, кодирующей комбинацию BDNF и uPA, стимулировали функциональное и структурное восстановление раздавленного нерва» [Karagyaur et al, 2020]. Так, через 18 суток после повреждения нерва амплитуда СПДН у животных из групп pNCure1 (доза 60 мкг/мышь) и pNCure2 (доза 120 мкг/мышь) была в 1.7 и 2.2 раза выше по сравнению с животными группы отрицательного контроля, которым вводили пустой вектор pVax1m: 0.475 (0.338; 0.612) и 0.627 (0.506; 0.832) мВ против 0.285 (0.245; 0.353) мВ соответственно ($n = 10$, $p < 0.001$ по сравнению с группой отрицательного контроля, ANOVA по рангам: критерий Данна) (Рисунок 3.25). В группах BDNF и uPA, которым вводили моноцистронные генотерапевтические конструкции pVax1-hBDNF и pVax1-huPA, соответственно, амплитуда СПДН составила 0.461 (0.311; 0.565) мВ ($n = 10$, $p < 0.05$ по сравнению с группой отрицательного контроля) и 0.319 (0.286;

0.413) мВ ($n = 10$, $p < 0.05$ по сравнению с группой отрицательного контроля), соответственно (ANOVA по рангам: критерий Данна). Сопоставимое увеличение амплитуды СПДН наблюдалось и в группе положительного контроля, где осуществляли ежедневные инъекции витамина В12 – 0.457 (0.329; 0.573) мВ ($n = 10$; $p < 0.05$ по сравнению с группой отрицательного контроля, ANOVA по рангам: критерий Данна).

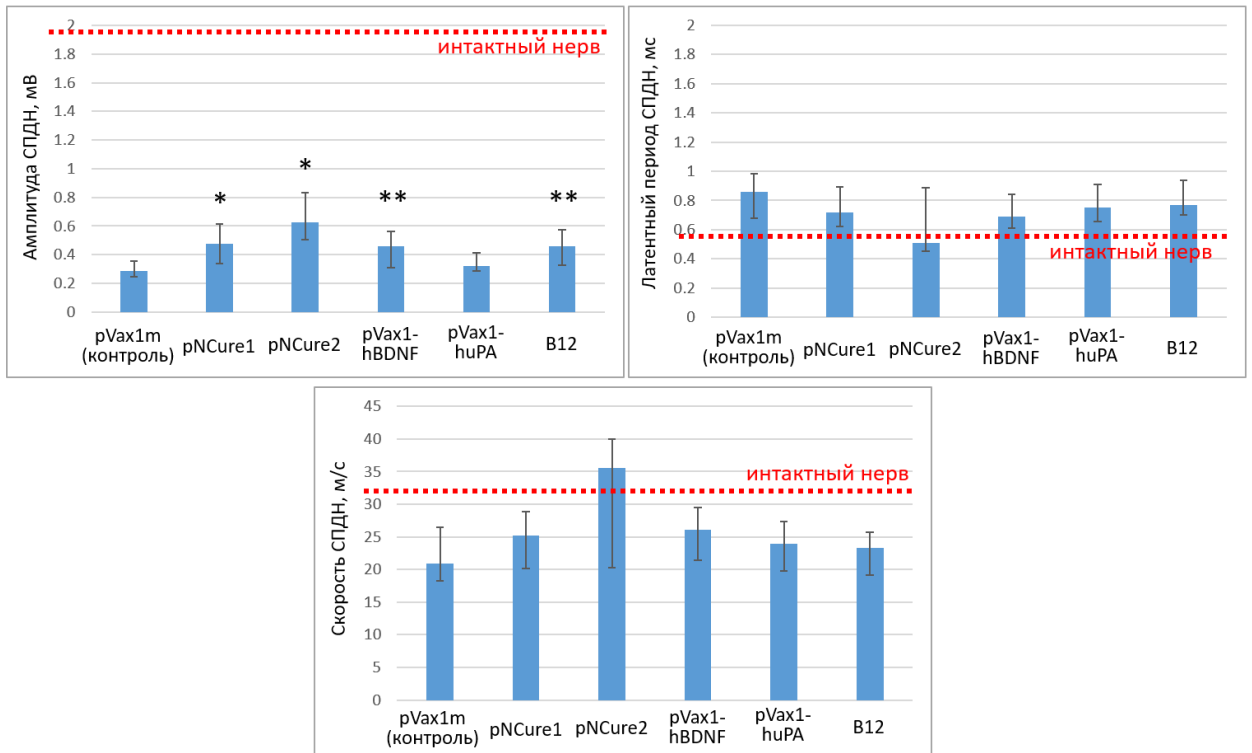


Рисунок 3.25 - Результаты оценки восстановления проводимости периферического нерва (электрофизиологическое исследование) после курса применения бицистронной плазмидной генотерапевтической конструкции, кодирующей BDNF и uPA. Результаты представлены в виде медиана (25%; 75%). * - $p < 0.001$ и ** - $p < 0.05$ по сравнению с pVax1m (контроль), $n = 10$ (ANOVA по рангам, критерий Данна).

Прямое сравнение величины амплитуды СПДН между группами pNCure1, pNCure2, BDNF и uPA позволило установить наличие статистически достоверных различий между парами групп pNCure2 и BDNF ($n = 10$, $p < 0.001$), pNCure2 и uPA ($n = 10$, $p < 0.001$), pNCure1 и uPA ($n = 10$, $p < 0.001$), BDNF и uPA ($n = 10$, $p < 0.01$) в то время как статистически достоверных

различий между парами pNCure1 и pNCure2, pNCure1 и BDNF обнаружено не было (ANOVA по рангам, критерий Данна). Поскольку «параметр амплитуды СПДН прямо пропорционален количеству нервных волокон, участвующих в проведении нервного импульса» [Карагяур, 2013; Fugleholm et al, 2000; Vleggeert-Lankamp et al, 2007], можно утверждать, что во всех экспериментальных группах и в группе положительного контроля происходило восстановление большего числа функциональных нервных волокон, чем в группе отрицательного контроля. Важным результатом стали данные о статистически значимо лучшем восстановлении электрической проводимости нерва у экспериментальных животных, которым делали инъекцию бицистронной генетической конструкции pNCure, кодирующей комбинацию BDNF и uPA, по сравнению с инъекциями моноцистронных генотерапевтических конструкций pVax1-hBDNF и pVax1-huPA (при одинаковых дозах введения). Дозовая зависимость амплитуды СПДН, наблюдаемая между группами pNCure1 и pNCure2, является важным подтверждением специфичности действия бицистронной генетической конструкции.

Латентный период СПДН (показатель проводимости нервных волокон, обратно пропорционален скорости проведения нервного импульса) поврежденного нерва достоверно не различался между группами, но в группах BDNF, pNCure1 и pNCure2 наблюдалась тенденция к его уменьшению, которая возрастала с увеличением дозы (Рисунок 3.25). Продолжительность латентного периода в группе pNCure1 составила 0.715 (0.622; 0.893) мс (соответствует скорости проведения нервного импульса 25.2 (20.2; 28.9) м/с), в группе pNCure2 – 0.507 (0.45; 0.887) мс (соответствует скорости проведения нервного импульса 35.5 (20.3; 40) м/с), в группе BDNF – 0.688 (0.611; 0.843) мс (соответствует скорости проведения нервного импульса 26.1 (21.4; 29.5) м/с), в группе uPA – 0.754 (0.657; 0.909) мс (соответствует скорости проведения нервного импульса 23.9 (19.8; 27.4) м/с), тогда как в группе отрицательного контроля pVax1m и в группе B12 (положительный контроль)

его продолжительность составила 0.861 (0.68; 0.983) и 0.771 (0.7; 0.94) мс, соответственно (соответствует скорости проведения нервного импульса 20.9 (18.3; 26.5) и 23.3 (19.1; 25.7) м/с). Продолжительность латентного периода характеризует степень зрелости нервных волокон: он уменьшается (а скорость проведения нервного импульса увеличивается) при утолщении безмиелиновых нервных волокон и утолщении миелиновой оболочки у миелинизированных [Salzer et al, 2016], верно и обратное. Полученные данные позволяют отметить, что несмотря на отсутствие статистически достоверной разницы между экспериментальными и контрольными группами, можно отметить тенденцию более полноценному восстановлению миелиновой оболочки поврежденных/регенерирующих нервных волокон в группах BDNF, pNCure1 и, особенно, pNCure2, кодирующей комбинацию молекул с нейропротективной и прорегенераторной активностью BDNF и uPA, что проявляется в сокращении продолжительности латентного периода и в увеличении скорости проведения нервного импульса.

Анализ криосрезов поврежденных нервов, окрашенных на маркеры промежуточных филаментов NF200 зрелых аксонов, показал, что бицистронная генетическая конструкция pNCure стимулировала восстановление структуры нерва. «Количество и толщина NF200-положительно окрашенных структур на срезах периферических нервов в группах BDNF, pNCure1 и pNCure2 были больше по сравнению с такими показателями на срезах нервов животных из группы отрицательного контроля» [Карагяур, 2013]. Через 18 суток после повреждения нерва срезы нервов из групп BDNF, pNCure1 и pNCure2 содержали 513 (426; 568), 573 (489; 619) и 554 (518; 633) NF200-положительно окрашенных структур (нервных волокон) соответственно ($n > 5$, $p < 0.05$ по сравнению с группой отрицательного контроля, ANOVA по рангам: критерий Данна), в то время как в группе отрицательного контроля, в группе uPA и в группе положительного контроля (B12) количество NF200-положительных структур составило 276 (234; 311), 342 (267; 403) ($n > 5$, $p = 0.222$ по сравнению с группой

отрицательного контроля) и 461 (407; 545) ($n > 5$, $p < 0.05$ по сравнению с группой отрицательного контроля, ANOVA по рангам: критерий Данна) (Рисунок 3.26).

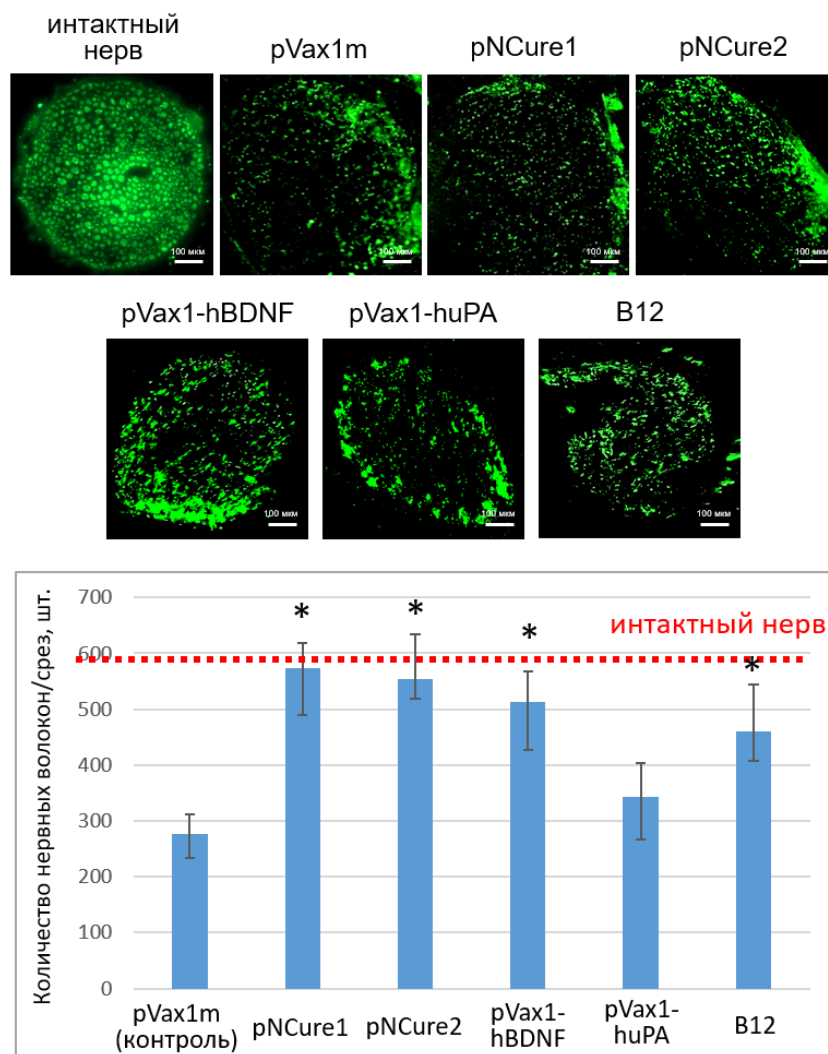


Рисунок 3.26 - Результаты оценки восстановления структуры периферического нерва (иммуногистохимическое исследование) после курса применения бицистронной плазмидной генотерапевтической конструкции, кодирующей BDNF и uPA. Результаты представлены в виде медиана (25%; 75%). * - $p < 0.05$ по сравнению с pVax1m (контроль), $n \geq 5$ (ANOVA по рангам, критерий Данна).

Достоверной разницы между группами pNCure1, pNCure2, BDNF и B12 не наблюдалось, хотя в группах pNCure1, BDNF и, особенно, pNCure2 была отмечена тенденция к восстановлению большего числа нервных волокон. «Стоит отметить, что интактный общий малоберцовый нерв мыши включает в

среднем ~600 нервных волокон и отсутствие статистически достоверных различий в количестве нервных волокон между группами» [Карагяур, 2013] pNCure1, pNCure2, BDNF и B12 можно объяснить достаточно быстрым их восстановлением и приближением к «плато» и относительно малой выборкой ($n = 5$). Полученные данные иммуногистохимического исследования хорошо соотносятся с описанными выше результатами электрофизиологического исследования, и свидетельствуют о том, что моноцистронная генотерапевтическая конструкция pVax1-hBDNF и, в особенности, бицистронная генетическая конструкция pNCure, кодирующая комбинацию факторов BDNF и uPA, обладают выраженной нейропротективной и прорегенераторной активностью в модели травматической денервации задней конечности мыши.

Результаты исследования подтверждают ранее полученные данные о том, что более быстрой и полной регенерации поврежденных органов и тканей можно добиться использованием именно комбинаций молекул, функционально взаимно дополняющих друг друга, чем при использовании монофункциональных молекул. Созданная и изученная бицистронная конструкция pNCure ввиду своей высокой способности стимулировать восстановление поврежденных нервных волокон может рассматриваться в качестве платформы для разработки генотерапевтического препарата для нейропротекции и стимуляции регенерации нервной ткани. По имеющимся у нас данным, разработанная бицистронная генетическая конструкция является уникальной, а результаты ее исследования – новыми и оригинальными.

3.4 Изучение нейропротективной и прорегенераторной активности бицистронных генетических конструкций (плазмидных и лентивирусных), кодирующих гены BDNF и uPA, на модели интрацеребральной посттравматической гематомы

Состояние проблемы на момент исследования. Среди вопросов нейропротекции и регенерации нервной ткани особенно остро стоит вопрос защиты и восстановления именно центральных отделов нервной системы (в

частности, тканей головного мозга). Это обусловлено, с одной стороны, крайне высоким энергопотреблением головного мозга (~20% от общего энергопотребления организма), что необходимо для поддержания работоспособности молекулярных переносчиков и транспортеров, и, с другой, особенностями метаболизма в нейронах (высокая потребность в кислороде ввиду преобладания дыхания над гликолизом) [Watts et al, 2018]. Нарушение адекватного кровоснабжения нейронов достаточно быстро (в течение минут или часов в зависимости от степени нарушения) отражается на их метаболизме, что может привести к их гибели и может запустить каскад вторичного повреждения мозговой ткани [Lazaridis et al, 2019]. Более того, нейроны ввиду особого липидного состава своей мембраны крайне чувствительны к токсическому действию компонентов излившейся крови (через механизмы ферроптоза) [Snyder et al, 2023]. Высокая восприимчивость клеток головного мозга к повреждению сочетается с достаточно низкой его регенераторной способностью, что обусловлено сложностью его архитектоники, большими размерами и большим количеством ингибирующих сигналов в зрелом мозгу [Fitch et al, 2008]. Указанные причины в основном и обуславливают высокую восприимчивость (или низкую устойчивость) ткани мозга к повреждению и его ограниченный регенераторный потенциал. Более подробно с особенностями процессов повреждения и регенерации нервной ткани можно ознакомиться в разделе 1.1 Литературного обзора.

Понимание молекулярных и клеточных участников этого процесса дает возможность им управлять, что открывает перспективы разработки новых терапевтических подходов к профилактике и лечению широкого спектра острых и хронических заболеваний центральной нервной системы различного генеза, большая часть из которых на сегодняшний день так и остается острой и нерешенной медико-социальной проблемой [WHO, 2023].

«Роль мозгового нейротрофического фактора (BDNF) достаточно подробно изучена в процессах развития, функционирования и регенерации нервной ткани [Boyd et al, 2003; Гомазков, 2006;]. С другой стороны,

множество экспериментальных данных указывает на то, что одного лишь BDNF для полноценной регенерации нервной ткани недостаточно» [Карагяур, 2013; Lopatina et al, 2011; Karagyaur et al, 2015]. Крайне важным для понимания процессов регенерации (в т.ч. регенерации нервной ткани) во всей их сложности и комплексности представляется изучение действия комбинаций функционально комплиментарных природных молекул, участвующих в процессах нейропротекции и регенерации нервной ткани. Результаты мировой литературы и наших собственных исследований позволяют предположить, что такой комбинацией может являться сочетание нейротрофического фактора с проангиогенным или противовоспалительным [Lopatina et al, 2011; Karagyaur et al, 2015; Rao et al, 2020], к примеру мозгового нейротрофического фактора (BDNF) и урокиназного активатора плазминогена (uPA). Доводы в пользу важности uPA в процессах регенерации и выбора uPA в качестве функционально комплиментарной молекулы для BDNF приведены в разделе 3.1. В разделе 3.3 мы «показали, что бицистронная генотерапевтическая конструкция, кодирующая BDNF и uPA, стимулирует более быстрое и полноценное восстановление структуры и функции травмированных» [Karagyaur et al, 2020] нервных волокон периферического нерва. Ввиду значительного сходства молекулярных механизмов нейропротекции и регенерации нервной ткани на периферии и в центральной нервной системе (раздел 1.1 Литературного обзора), мы предположили, что данная комбинация может стимулировать процессы регенерации после повреждения в головном мозге и для изучения этого вопроса использовали модель интрацеребральной посттравматической гематомы на крысах.

3.4.1 Изучение способности плазмидных генетических конструкций проникать в клетки головного мозга в очаге интрацеребральной посттравматической гематомы

Обязательным условием функционирования генотерапевтических конструкций является их проникновение в ядро целевой клетки, где они

запускают экспрессию закодированных генов. Генно-инженерные конструкции, оставшиеся в межклеточном пространстве, нефункциональны. Однако доставка в клетки плазмидных конструкций, как наиболее безопасной разновидности генотерапевтических препаратов, представляет собой определенную проблему – первичные клетки высокоустойчивы к трансфекции, в особенности *in vivo*, где спектр методов трансфекции крайне ограничен.

Поскольку на эффективность доставки генетического материала в клетки в высокой степени влияет размер генетической конструкции, в качестве маркерной была использована плазида pVax1m- β -Gal. Размер ее вставки β -Gal (около 3000 п.н.) наиболее близок к таковому бицистронной генетической конструкции pNCure, кодирующей кассету hBDNF-IRES-huPA (около 2500 п.н.), что делает ее более адекватным маркером для оценки эффективности доставки генетических конструкций схожего размера (5.5-6 тыс. п.н.) по сравнению с более короткими плазидами, кодирующими флуоресцентные белки (размер вставки около 700 п.н.). β -Gal (бета-галактозидаза) представляет собой «бактериальный фермент β -галактозидазу, определение локализации которой в тканях возможно благодаря» [Karagyaur et al, 2020] микроскопии препаратов, окрашенных с помощью гистохимической реакции, в проходящем свете, что позволяет избежать регистрации фонового сигнала, что неизбежно при детекции флуоресцентных белков с помощью флуоресцентной микроскопии. Гистохимическая реакция на β -галактозидазу высокоспецифична и не окрашивает интактные ткани человека/мыши/крысы, в которые не вводили данный фермент в виде рекомбинантного белка или генетической конструкции. В «клетках млекопитающих существует митохондриальная β -галактозидаза, но pH, необходимый для протекания качественных реакций на нее и бактериальную» [Karagyaur et al, 2020] β -галактозидазу, существенно различается.

Для оценки эффективности доставки плазмидных генетических конструкций в клетки в очаге повреждения плазмиду pVax1m- β -Gal (раствор

на стерильном физ. растворе) вводили в область интрацеребральной посттравматической гематомы мозга, как это описано в разделе 2.10 (группа 1): 10 мкг или 40 мкг pVax1m- β -Gal вместе с кровью (ВК) или после крови (ПК).

На пятые сутки после операции (ожидаемый пик экспрессии трансгена – β -галактозидазы) у животных, которым делали инъекцию pVax1m- β -Gal, производили оценку неврологического статуса по шкале Stroke-index McGraw, (модифицированной для грызунов И.В. Ганнушкиной) [McGraw et al, 1976; Ганнушкина, 2000], после чего животных забивали выдерживанием в атмосфере углекислого газа, декапитировали, мозг извлекали и замораживали в среде для криоконсервации гистологических образцов Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura). Из полученных образцов приготавливали криосрезы головного мозга в области повреждения. Полученные криосрезы с помощью стандартных протоколов окрашивали гематоксилином (для получения гистологических подтверждений повреждения ткани мозга, оценки степени лимфоидной инфильтрации и т.п.) [Feldman et al, 2014] или при помощи качественной реакции на β -галактозидазу (с целью оценки эффективности доставки генетической конструкции) [Ma et al, 2002].

Результаты исследования неврологического статуса на 5 сутки показали, что введение плазмидной конструкции pVax1m- β -Gal, кодирующей маркерный белок β -Gal, в количестве 10 или 40 мкг на животное, введенной вместе с кровью или после нее, само по себе не влияет на тяжесть неврологического дефицита (Рисунок 3.27). В ряде групп наблюдалась гибель экспериментальных животных в срок до 5 суток, вызванная постоперационными осложнениями – их мозг для приготовления криосрезов не использовали.

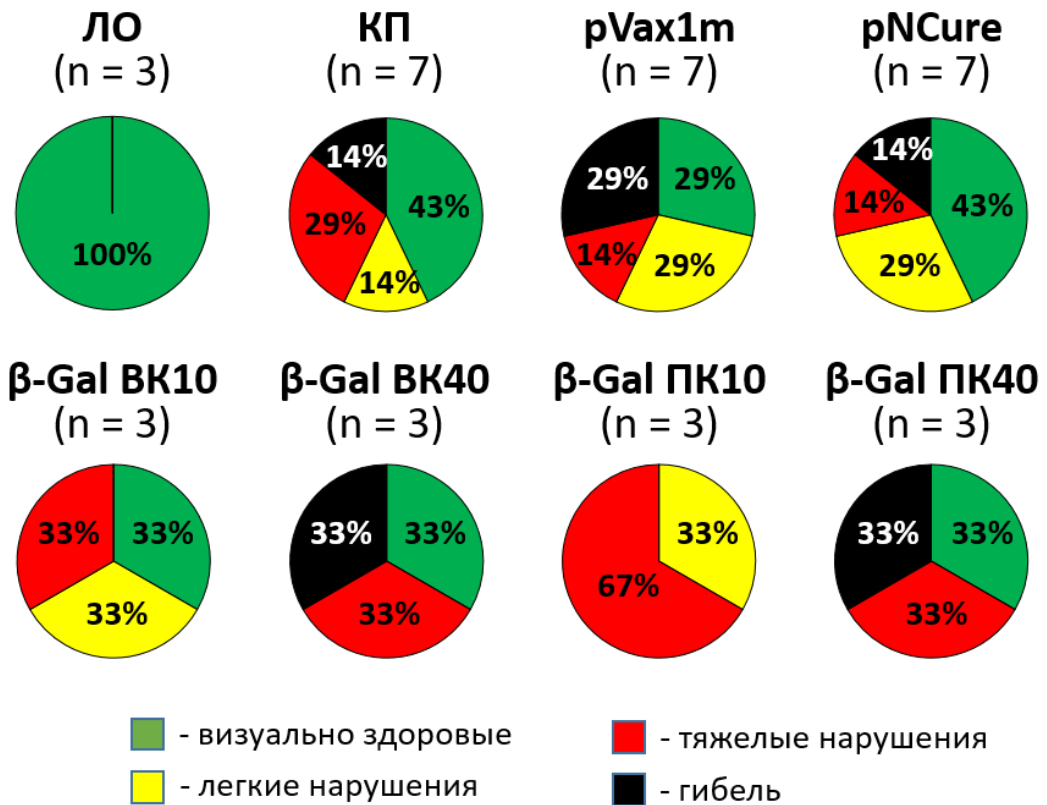


Рисунок 3.27 - Результаты оценки неврологических нарушений (по McGraw в модификации И.В. Ганнушкиной) у крыс через 5 суток после моделирования интрацеребральной посттравматической гематомы и инъекции плазмидной конструкции pVax1m- β -Gal, кодирующей маркерный ген β -Gal. ЛО - ложно оперированные животные, КП - контроль повреждения (без лечения), β -Gal BK10 - инъекция 10 мкг плазмидной ДНК pVax1m- β -Gal вместе с кровью, β -Gal BK40 - инъекция 40 мкг плазмидной ДНК pVax1m- β -Gal вместе с кровью, β -Gal ПК10 - инъекция 10 мкг плазмидной ДНК pVax1m- β -Gal после введения крови, β -Gal ПК40 - инъекция 40 мкг плазмидной ДНК pVax1m- β -Gal после введения крови.

Гистологическое окрашивание криосрезов головного мозга в области повреждения гематоксилином позволило однозначно идентифицировать области повреждения (Рисунок 3.28). Так в данных областях криосрезов четко визуализируются след от мандрен-ножа/иглы и остаточные количества введенной крови. В самой области повреждения клетки окрашены в ржаво-коричневый цвет, что, по-видимому, связано с пропитыванием клеток продуктами деградации гемоглобина, а ядра клеток в области повреждения не визуализируются. В то же время область повреждения окружена зоной высокой плотности ядер, что является типичным маркером лейкоцитарной

инфильтрации, окружающей область повреждения. В криосрезках, полученных от ложно оперированных животных таких морфологических изменений не наблюдается. Наблюдаемая гистологическая картина была достаточно воспроизводимой от образца к образцу, что, предположительно, позволит использовать визуализируемые данные (площадь области повреждения, степень лейкоцитарной инфильтрации), как гистологические параметры оценки нейропротекторной активности генно-терапевтического препарата в дальнейших исследованиях.

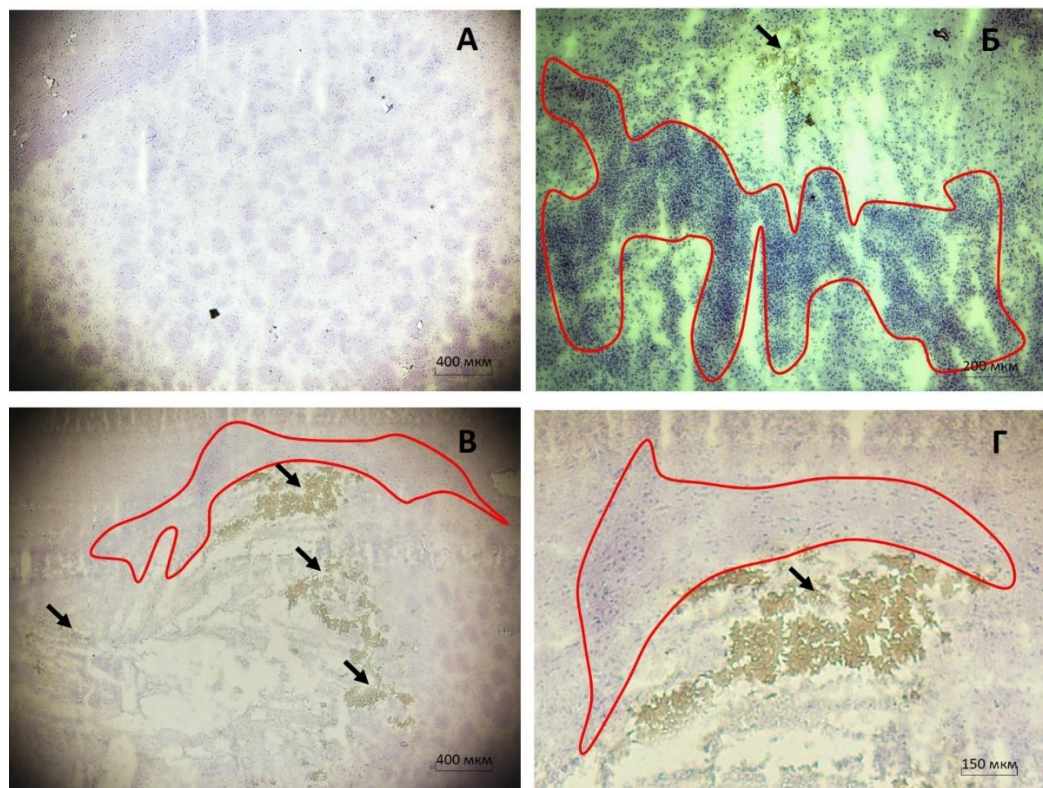


Рисунок 3.28 - Криосрезы головного мозга ложно оперированных (А), животных из группы КП (контроль на повреждение) (Б) и экспериментальных животных (В,Г), окрашенные гематоксилином. На криосрезках Б-Г видны участки дезорганизации мозговой ткани, отложения гемосидерина (продукт деградации гемоглобина) – показаны стрелками, очаги лейкоцитарной инфильтрации, прилегающие к области повреждения (обведены красным цветом).

Гистохимическая окраска криосрезков головного мозга с помощью качественной реакции на β -галактозидазу показала, что плазмидная ДНК в

солевом растворе вне зависимости от концентрации и способа введения практически не проникает в клетки головного мозга. При изучении криосрезов мозга окраску, специфичную для β -галактозидазы удалось обнаружить только на криосрезах от 2 экспериментальных животных (Рисунок 3.29).

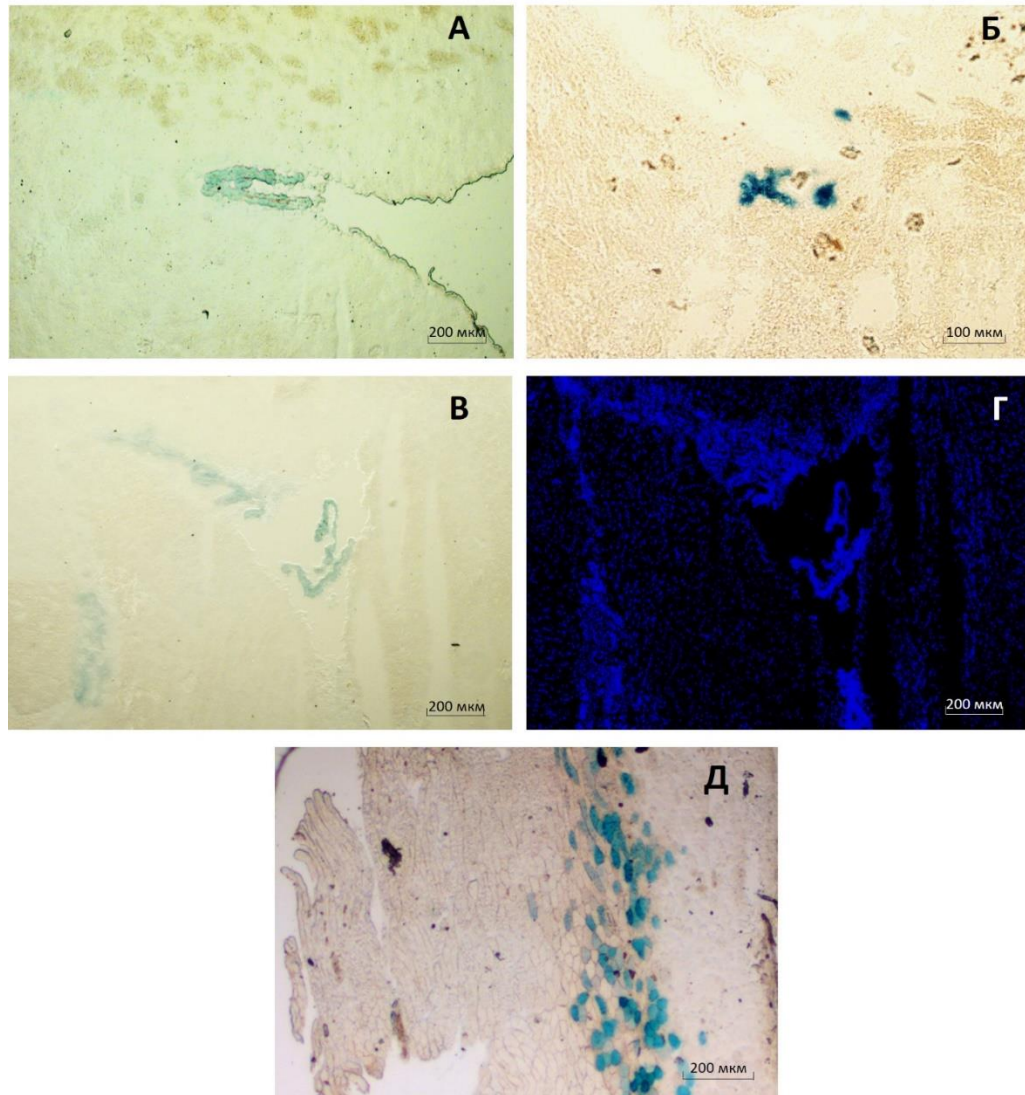


Рисунок 3.29 - Криосрезы головного мозга (А-Г) и поперечно-полосатой мышцы (Д) (положительный контроль), окрашенные на экспрессию маркерного гена β -галактозидазы. Видно, что отдельные структуры мозга и мышечные волокна окрашиваются в различные оттенки синего цвета, что соответствует разным уровням экспрессии β -галактозидазы. А, В – β -галактозидаза-позитивно окрашенная эпиндима сосудистого сплетения крысы из группы ПК10. Б – β -галактозидаза-позитивные клетки крысы из группы ВК40. Г – окраска среза В DAPI для визуализации ядер – крыса из группы ПК10.

На криосрезах головного мозга крысы из группы ВК40 было отмечено всего несколько β -галактозидаза-позитивных клеток (Рисунок 3.29Б), а на криосрезах головного мозга крысы из группы ПК10 на β -галактозидазу специфично окрашивалась эпиндима сосудистого сплетения на стороне повреждения (Рисунок 3.29А и 3.29В).

В случае окрашивания эпиндимы на β -Gal, по-видимому, произошел прорыв вводимого раствора плазмиды pVax1m- β -Gal в полость бокового желудочка, что впоследствии привело к захвату излившейся генетической конструкции клетками эпиндимы, что согласуется с данными мировой литературы [Bleier et al, 1975]. В качестве положительного контроля на окраску β -галактозидазы использовались криосрезы передней большеберцовой мышц, полученные ранее в процессе отработки «доставки генетических конструкций в мышечные волокна» [Karagyaur et al, 2020].

В результате проведенного исследования удалось установить, что выбранный способ доставки плазмидных генетических конструкции длиной 5-6 тыс. п.н. не позволяет обеспечить эффективную экспрессию трансгена в области интрацеребральной посттравматической гематомы. Наблюдаемая низкая эффективность трансфекции, по-видимому, обусловлена высокой устойчивостью первичных клеток мозговой ткани к трансфекции, относительно большим размером генетической конструкции, а также агрессивными условиями в очаге повреждения (низкий pH, нуклеазы, сеть фибриновых волокон, клетки воспаления).

Окрашивание эпиндимы свидетельствует о высокой трансфицируемости этого типа клеток. Возможно, это связано с их функцией удаления детрита из цереброспинальной жидкости. Данный факт можно использовать для манипуляции нейральными стволовыми клетками, которые в субвентрикулярной зоне непосредственно прилежат к эпиндимоцитам [Stolp et al, 2015] или модификации состава цереброспинальной жидкости для коррекции ряда хронических нейродегенеративных заболеваний.

Несмотря на полученные результаты, было решено продолжить эксперимент по оценке нейропротективной и прорегенераторной активности плазмидной бицистронной генетической конструкции pNCure, кодирующей комбинацию BDNF и uPA человека, в модели интрацеребральной посттравматической гематомы (раздел 3.4.2). В качестве альтернативного способа доставки генов факторов, обладающих нейропротективной и прорегенераторной активностью, было предложено использовать лентивирусные частицы (раздел 3.4.3).

3.4.2 Изучение нейропротективной и прорегенераторной активности плазмидной бицистронной генетической конструкции, кодирующей комбинацию BDNF и uPA человека, на модели интрацеребральной посттравматической гематомы

Ранее в нашей лаборатории было показано, что способность мышечных волокон захватывать плазмидные генотерапевтические конструкции в условиях ишемии повышается более, чем в 50 раз. Мы предположили, что повреждение ткани мозга, сопровождающееся ишемией (что наблюдается и при геморрагическом инсульте), также приведет к увеличению проницаемости мембран нейрональных и глиальных клеток, и обеспечит приемлемый уровень доставки бицистронной терапевтической конструкции pNCure, кодирующей комбинацию BDNF и uPA человека, в клетки мозга. Для проверки данного предположения было проведено исследование по изучению потенциальной нейропротективной активности бицистронной генетической конструкции в модели интрацеребральной посттравматической гематомы. Очевидно, что генотерапевтический препарат ввиду задержки экспрессии рекомбинантных белков не способен осуществлять нейропротекцию головного мозга в острейшем периоде, однако потенциально он может препятствовать развитию вторичного повреждения ткани мозга [Lazaridis et al, 2019], что мы и решили проверить.

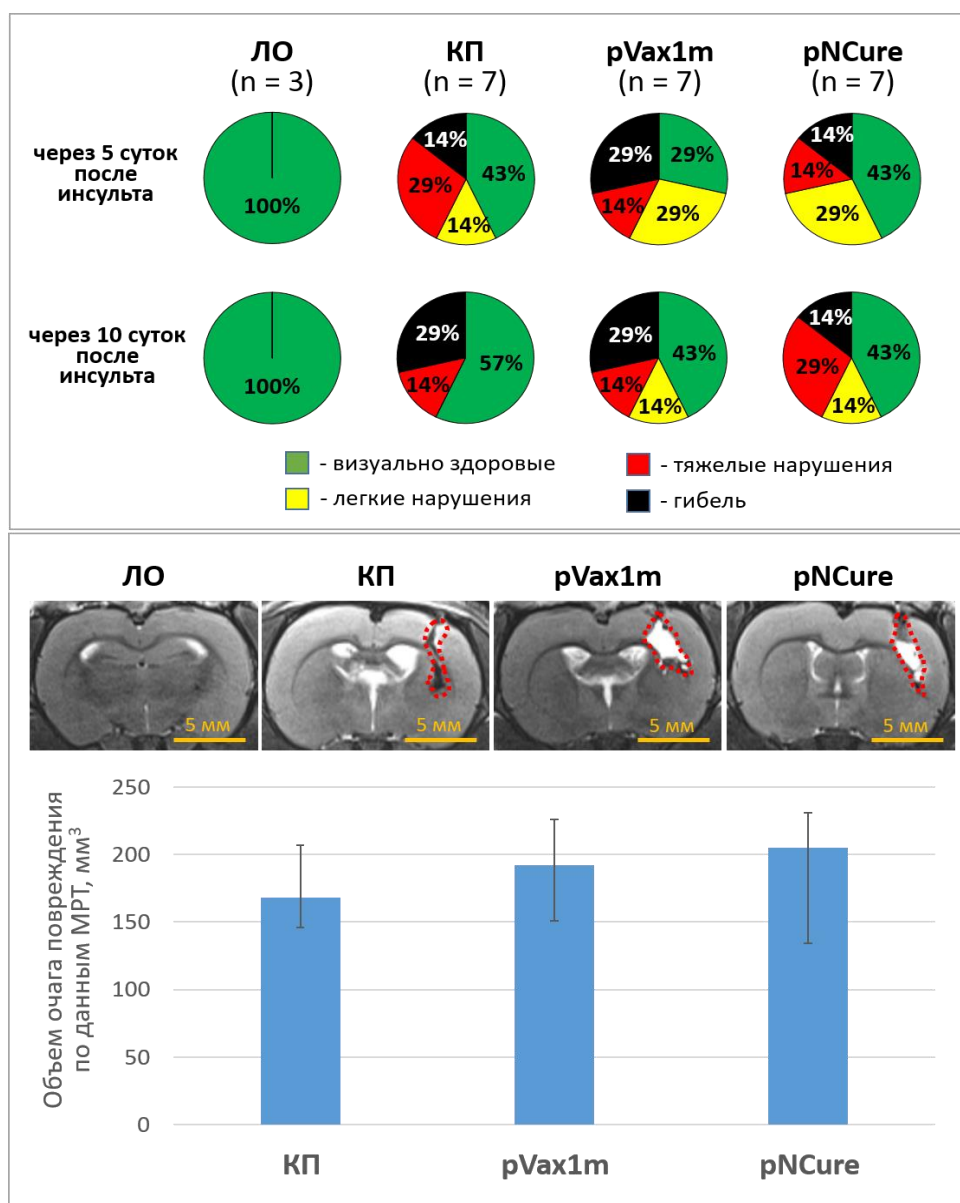


Рисунок 3.30 - Результаты оценки нейропротективной активности бицистронной генетической конструкции pNCure, кодирующей комбинацию BDNF и uPA, в модели интрацеребральной посттравматической гематомы на крысах: Вверху - результаты оценки неврологического статуса экспериментальных животных через 5 и 10 суток после моделирования инсульта; Внизу - результаты оценки объема повреждения головного мозга по данным МРТ через 11 суток после моделирования интрацеребрального кровоизлияния. Результаты представлены, как медиана (25%; 75%), $n \geq 3$.

В результате проведенного исследования достоверного влияния бицистронной генетической конструкции pNCure на восстановление ткани головного мозга в модели интрацеребральной посттравматической гематомы установлено не было. Так, «выживаемость животных в группе pNCure

составила 86% (6 животных из 7), в то время как в группах КП (контроль на повреждение или группа без лечения) и pVax1m выживаемость составила по 71%» [Dzhauari et al, 2022] (по 5 животных из 7). Аналогичным образом введение генетической конструкции pNCure в дозе 40 мкг не привело к улучшению неврологического статуса экспериментальных животных в группе pNCure по сравнению группами КП и pVax1m (Рисунок 3.30). МРТ-исследование также не позволило установить сколько-нибудь выраженный нейропротективный эффект бицистронной генетической конструкции pNCure на объем повреждения головного мозга: 205 (134; 231) мм³ в группе pNCure по сравнению с 168 (146; 207) мм³ и 192 (151; 226) мм³ в группах КП и pVax1m (Рисунок 3.30).

Отсутствие нейропротективной активности бицистронной плазмидной конструкции в модели интрацеребральной гематомы может быть обусловлено низким уровнем проникновения генетической конструкции в клетки мозга, недостаточной и несвоевременной экспрессией закодированных в ней терапевтических факторов или же агрессивностью среды в очаге повреждения. Полученные данные коррелируют с результатами, полученными при введении в очаг кровоизлияния репортерной плазмидной конструкции схожей длины pVax1m- β -Gal. По результатам исследований разделов 3.4.1 и 3.4.2 было решено отказаться от применения плазмидных генотерапевтических конструкций для доставки генов BDNF и uPA в клетки в очаге кровоизлияния в модели интрацеребральной посттравматической гематомы, ввиду крайне низкой эффективности плазмидной трансфекции целевых клеток. В качестве альтернативного способа доставки генов факторов, обладающих нейропротективной и прорегенераторной активностью, было предложено использовать лентивирусные частицы (раздел 3.4.3).

3.4.3 Изучение способности лентивирусных генетических конструкций проникать в клетки головного мозга в очаге интрацеребральной посттравматической гематомы

По результатам исследований разделов 3.4.1 и 3.4.2 плазмидный способ доставки генотерапевтических конструкций в очаг кровоизлияния в модели интрацеребральной посттравматической гематомы оказался крайне неэффективным. Мы предположили, что замена плазмидной системы доставки на лентивирусный вектор позволит добиться необходимого уровня трансфекции целевых клеток и оценить терапевтический эффект сочетанного нейропротективного действия hBDNF и huPA на восстановление мозга в модели интрацеребральной посттравматической гематомы. Для этого ген β -Gal и кассета hBDNF-IRES-huPA из векторов pVax1m- β -Gal и pNCure, соответственно, были переклонированы в вектор pVLT, разработанный в ЗАО Евроген (Россия).

Для оценки способности лентивирусных генетических конструкций проникать в клетки головного мозга в очаге интрацеребральной посттравматической гематомы на основе полученных векторов были собраны ЛВЧ, несущие ген β -Gal – 5 мл кондиционированной среды, титр – 600 тыс. ЛВЧ/мл. Для увеличения титра 3 мл препарата ЛВЧ были подвергнуты центрифугированию при 16000g и +4°C в течение 4 часов в соответствии с описанным ранее протоколом [Jiang et al, 2015]. Верхняя фракция в количестве 2.5 мл была удалена, а нижняя (0.5 мл), содержащая осевшие ЛВЧ была собрана. Таким образом титр ЛВЧ был увеличен приблизительно в 6 раз (3.6 млн ЛВЧ/мл).

Кондиционированная среда, содержащая ЛВЧ в титрах 600 тыс. или 3.6 млн ЛВЧ/мл, была введена крысам в область кровоизлияния при моделировании у них геморрагического инсульта (отработка методики геморрагического инсульта на крысах описана в отчете за 1-й год выполнения проекта). 12 крыс, участвующих в эксперименте, разделили на 3 группы: «К» (контроль), «ЛВЧ0.6» и «ЛВЧ3.6». В группе «К» крысам вводили 40 мкл стерильного физиологического раствора, а в группах «ЛВЧ0.6» и «ЛВЧ3.6» по

40 мкл кондиционированной среды, содержащей ЛВЧ в титрах 600 тыс. или 3.6 млн ЛВЧ/мл, соответственно. Параллельно для оценки инфицирующей активности ЛВЧ и эффективности процедуры концентрирования ЛВЧ часть кондиционированной среды, содержащей ЛВЧ в титрах 600 тыс. или 3.6 млн ЛВЧ/мл, была нанесена на клетки линии НЕК293Т, выращенные в 6-луночной планшете и находящиеся на момент трансдукции в конfluence 40-50% (реагентов, повышающих эффективность трансдукции (полибрен, протамина сульфат) не вносили). От момента получения кондиционированной среды, содержащей ЛВЧ, до момента их введения крысам и нанесения на клетки линии НЕК293Т прошло не более 48 часов. Все это время препарат хранился на льду и не замораживался, что, согласно литературным данным [Fumiko et al, 2001], позволяет сохранить титр ЛВЧ на исходном уровне до момента применения.

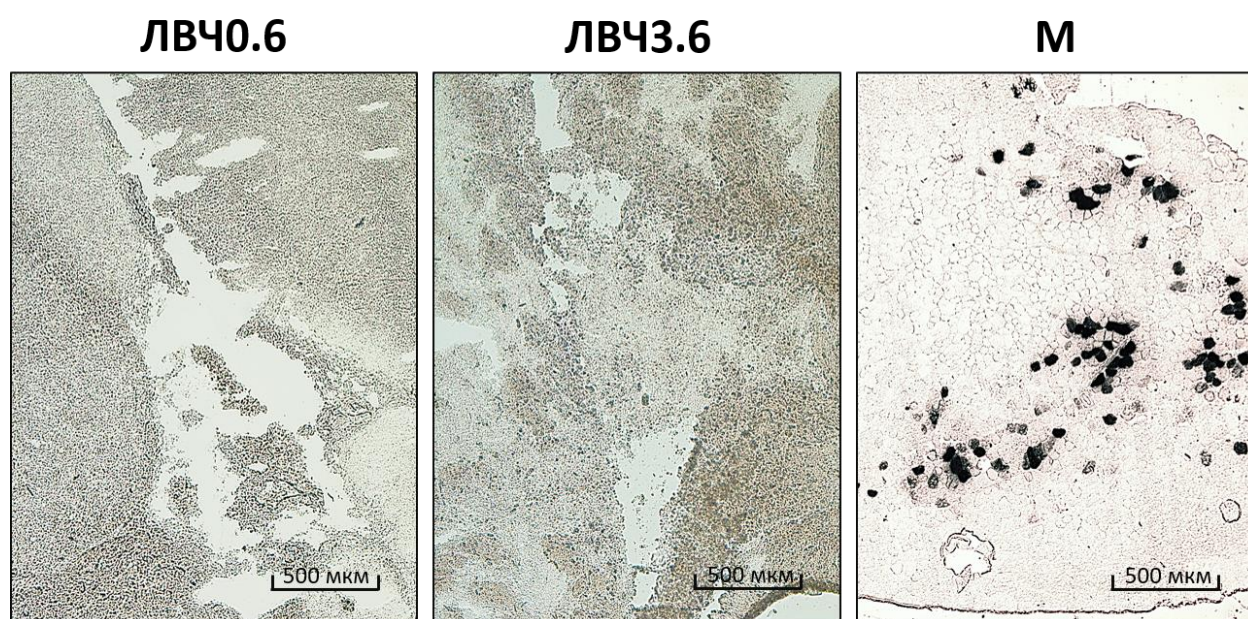


Рисунок 3.31 - Криосрезы головного мозга крыс, подвергнутых трансдукции ЛВЧ в титре 600 тыс («ЛВЧ0.6») и 3.6 млн («ЛВЧ3.6») ЛВЧ в мл, окрашенные с помощью качественной реакции на β -галактозидазу. На всех изученных криосрезах головного мозга не наблюдается ни одной клетки, окрасившейся на β -галактозидазу. В то же время мышечные волокна на криосрезе передней большеберцовой мышцы (М), в которую была инъецирована плаزمиды рVax- β -Gal, специфически окрашиваются на β -галактозидазу (положительный контроль).

Через 7 суток после инъекции ЛВЧ крыс забивали, мозг извлекали, из него готовили криосрезы, которые окрашивали при помощи качественной реакции на β -галактозидазу [Ma et al, 2002]. Для каждой из крыс из групп «ЛВЧ0.6» и «ЛВЧ3.6» «было окрашено по 6-7 срезов, пересекающих область повреждения, однако ни у одной из крыс вне зависимости от количества введенных ЛВЧ не было обнаружено ни одной клетки, окрашивающейся на β -Gal» [Dzhauari et al, 2022] (Рисунок 3.31).

В тоже время анализ трансдуцированных НЕК293Т (окраска на β -галактозидазу через 48 после трансдукции) показал, что ЛВЧ на момент введения крысам сохраняли свою инфицирующую активность, и что их титр, действительно, увеличился в несколько раз в результате процедуры концентрирования. Специфическая окраска на β -Gal в культуре НЕК293Т оказалась настолько яркой (серая, синяя), что заметна и на макрофотографиях (Рисунок 3.32).

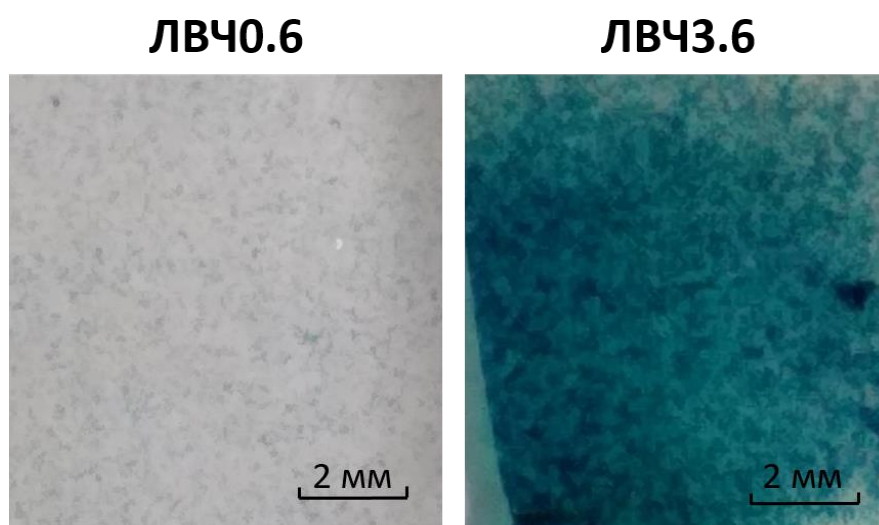


Рисунок 3.32 - Макроскопическая картина окраски пласта клеток линии НЕК293Т, трансдуцированных ЛВЧ в титре 600 тыс («ЛВЧ0.6») и 3.6 млн («ЛВЧ3.6») ЛВЧ/мл.

Анализ литературы позволил предположить возможное объяснение неудавшейся трансдукции *in vivo*. Возможно, причиной неудачной доставки гена β -Gal в ткани мозга с помощью ЛВЧ является недостаточный титр ЛВЧ.

В публикациях, демонстрирующих способность ЛВЧ доставлять ген в клетки мозга используют титр ЛВЧ 100 млн в мл, к тому же, описанное введение ЛВЧ осуществляют в интактную, а не поврежденную ткань мозга [Naldini et al, 1996]. Поскольку ЛВЧ в данном проекте представляют собой лишь инструмент для доставки необходимого гена в целевые клетки, и поскольку ЛВЧ представляют потенциальную опасность для экспериментатора и из соображений безопасности не могут в перспективе быть использованы в клинике, а также поскольку достижение такого титра ЛВЧ в рамках выполнения данной работы не представлялось технически и экономически возможным, было принято решение об отказе использования ЛВЧ для доставки маркерного (β -Gal) и терапевтических (hBDNF и huPA) генов в клетки мозга.

«Изучение способности плазмидных и лентивирусных генетических конструкций проникать в клетки головного мозга» [Dzhauari et al, 2022] в очаге интрацеребральной посттравматической гематомы показало практическую невозможность доставить искомые гены в целевые клетки. Это может быть обусловлено недостаточно высоким титром плазмидных и лентивирусных конструкций, низкой восприимчивостью целевых клеток в очаге повреждения, или агрессивностью среды в очаге кровоизлияния по отношению к вводимым конструкциям. По результатам проведенных исследований разделов 3.4.1-3.4.3 было решено отказаться от применения генотерапевтических конструкций для доставки генов BDNF и uPA в клетки в очаге кровоизлияния в модели интрацеребральной посттравматической гематомы, ввиду крайне низкой эффективности трансфекции/трансдукции целевых клеток. Для изучения нейропротективной и прорегенераторной активности комбинации BDNF и uPA в модели интрацеребральной посттравматической гематомы было решено использовать прямое введение рекомбинантных белков BDNF и uPA (раздел 3.5), тем более, что рекомбинантные белки при введении в очаг повреждения, предположительно, позволят достичь более эффективной нейропротекции, поскольку, согласно клиническим рекомендациям,

временное терапевтическое окно при инсультах (клинический аналог интрацеребральной посттравматической гематомы) составляет около 6 часов [Hawkes et al, 2018; Kim et al, 2022], а генотерапевтическим конструкциям для запуска экспрессии закодированных в них генов требуется 24-72 часа.

3.5 Исследование нейропротективной и нейротрофической активности комбинации рекомбинантных белков BDNF и uPA на модели интрацеребральной посттравматической гематомы

Состояние проблемы на момент исследования. Как уже было обсуждено в разделе 3.4, проблема защиты и восстановления центральных отделов нервной системы является особо острой, что обусловлено особенностями процессов нейропротекции и регенерации в центральной нервной системе, высокой «медико-социальной значимостью проблемы повреждения тканей головного мозга (острые нарушения мозгового кровообращения, травмы, инфекционные поражения) и отсутствием действенных патогенетических подходов к терапии такого рода повреждений. Понимание молекулярных и клеточных участников процессов повреждения, нейропротекции и регенерации мозговой ткани дает возможность управлять ими, что открывает перспективы разработки новых терапевтических подходов к их профилактике и лечению» [Басалова и др., 2023; McGinn et al, 2016; Marklund et al, 2019].

В разделе 3.3 мы «показали, что бицистронная генотерапевтическая конструкция, кодирующая BDNF и uPA, стимулирует более быстрое и полноценное восстановление структуры и функции травмированных» [Karagyaur et al, 2020] нервных волокон периферического нерва. Ввиду значительного сходства молекулярных механизмов нейропротекции и регенерации нервной ткани на периферии и в центральной нервной системе (раздел 1.1 Литературного обзора), мы предположили, что комбинация BDNF и uPA может стимулировать процессы регенерации после повреждения в головном мозге и для изучения этого вопроса использовали модель

интрацеребральной посттравматической гематомы на крысах. Доставка генов этих факторов в очаг кровоизлияния в виде плазмидной и лентивирусной генотерапевтических конструкций не увенчалась успехом, в связи с чем было решено оценить нейропротективный и прорегенераторный потенциал данной комбинации в виде рекомбинантных белков BDNF и uPA, тем более, рекомбинантные белки при таких острых состояниях, как интрацеребральные гематомы, предположительно, обладают более выраженным нейропротективным эффектом, поскольку, согласно клиническим рекомендациям, временное терапевтическое окно при инсультах (клинический аналог интрацеребральной посттравматической гематомы) для эффективной нейропротекции составляет около 6 часов [Hawkes et al, 2018; Kim et al, 2022].

3.5.1 Изучение нейропротективной и прорегенераторной активности комбинации рекомбинантных белков BDNF и uPA в модели интрацеребральной посттравматической гематомы крыс

В ходе исследования было установлено, что кондиционированная среда, содержащая 108 нМ рекомбинантного hBDNF (3 нг/мкл), несколько улучшала неврологические показатели у экспериментальных животных, но не влияла на их выживаемость. Внесение в кондиционированную среду, содержащую BDNF, 8 нМ рекомбинантного uPA «(0.4 нг/мкл) увеличивало выживаемость экспериментальных животных и уменьшало тяжесть неврологических нарушений (Рисунок 3.33), хотя зафиксированные различия не являлись статистически достоверными. В группе BU (BDNF + uPA) 65% и 79% животных не имели видимых неврологических нарушений (выглядели здоровыми) на 3 и 10 сутки после моделирования интрацеребральной посттравматической гематомы. В контрольной группе (DMEM) только 21% и 50% животных выглядели здоровыми через 3 и 10 суток после моделирования кровоизлияния. Однако статистических достоверных различий между группами BU и контрольной группой установлено не было: $p = 0.052$ через 3

суток и $p = 0.147$ через 10 суток после моделирования инсульта ($n = 14$; двусторонний точный критерий Фишера). В группе uPA наблюдали эффект, аналогичный действию BDNF: он стимулировал выживаемость экспериментальных животных (86% через 10 суток после моделирования внутримозгового кровоизлияния). В группе BU в течение первых трех суток гибели животных не наблюдали, а выживаемость животных в течение 14 суток эксперимента составила 93% (13 из 14 крыс)» [Karaguyaur et al, 2021], тогда как в контрольной группе выживаемость составила 71% (10 из 14 крыс).

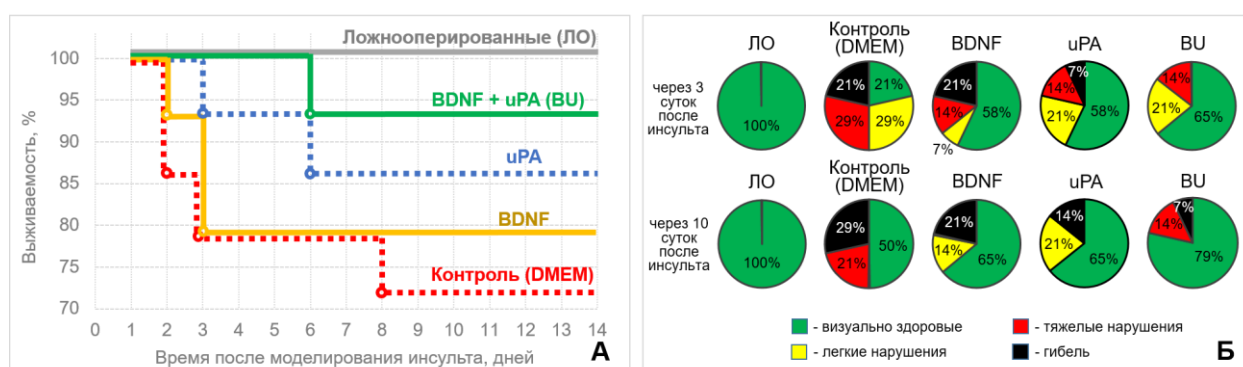


Рисунок 3.33 - Результаты оценки нейропротективной активности рекомбинантных BDNF и uPA в модели интрацеребральной посттравматической гематомы: А - выживаемость животных ($n = 14$, метод Каплана-Мейера); Б - структура неврологических нарушений в экспериментальных группах через 3 и 10 суток после моделирования гематомы ($n = 14$).

Данные выживаемости экспериментальных животных и неврологического тестирования коррелировали с результатами МРТ. В группе BU объем повреждения головного мозга был достоверно меньше, чем в группе контроля ($p = 0.001$): $48.5 (31.0; 86.7) \text{ мм}^3$ против $176.6 (133.8; 206.3) \text{ мм}^3$ (Рисунок 3.34). По данным МРТ, в группах BDNF и uPA объем повреждения головного мозга достигал $180.7 (136.1; 242.8)$ и $108.6 (96.1; 151.9) \text{ мм}^3$ соответственно, без статистически достоверных различий по сравнению с группой контроля.

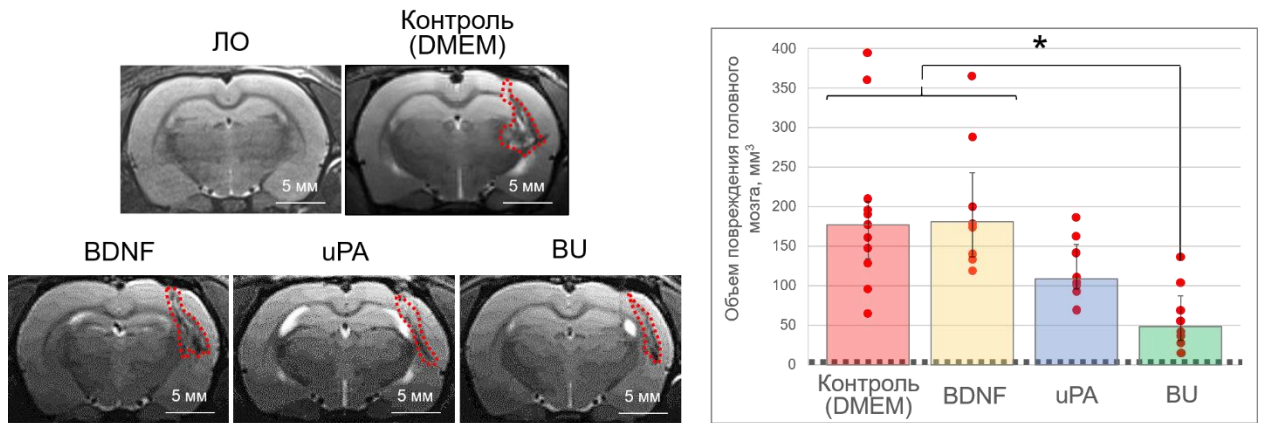


Рисунок 3.34 - Результаты магнитно-резонансной томографии головного мозга через 11 суток после внутримозгового кровоизлияния (очаг кровоизлияния ограничен красной пунктирной линией). На гистограмме пунктирная линия соответствует объему очага поражения головного мозга у ложнооперированных (ЛО) животных. Красные точки на диаграмме соответствуют результатам отдельных измерений. Результаты представлены как медиана (25%; 75%). * – $p = 0.001$, $n \geq 7$ (ANOVA по рангам, критерий Данна).

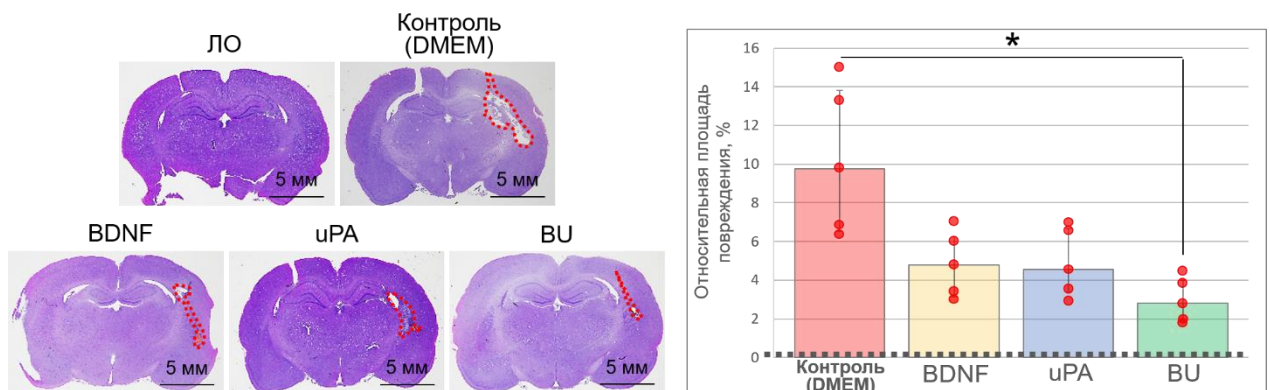


Рисунок 3.35 - Гистологическое исследование срезов головного мозга.

Окрашивание гематоксилин-эозином выявляет место повреждения (ограничено красной пунктирной линией). На гистограмме пунктирная линия соответствует зоне поражения головного мозга у ложнооперированных (ЛО) животных, красные точки – результаты индивидуальных измерений. Данные представлены в виде медиана (25%; 75%). * – $p = 0.011$, $n = 5$ (ANOVA по рангам, критерий Данна).

Окрашивание срезов головного мозга гематоксилин-эозином показало, что объем повреждения был достоверно меньше в группе BU, чем в группе контроля (DMEM) ($p = 0.011$): 2.8% (2.0%; 3.9%) против 9.8% (6.6%; 14.3%). В

группах BDNF и uPA объем очага повреждения составил «4.8% (3.1%; 6.7%) и 4.6% (3.5%; 6.8%) соответственно, без статистически достоверных различий по сравнению с контрольной группой (Рисунок 3.35). Полученные данные коррелируют с результатами МРТ и неврологическими данными.

Окраска срезов головного мозга гематоксилин-эозином (Рисунок 3.36) и по Нисслию (Рисунок 3.37) подтвердила наличие микроскопических признаков повреждения ткани головного мозга: некроза, ишемии, отека, глиального рубца, нейтрофильной инфильтрации и стаза крови в капиллярном русле. Признаки повреждения были более выражены в контрольной группе, однако количественный анализ не проводился» [Karagyaur et al, 2021].

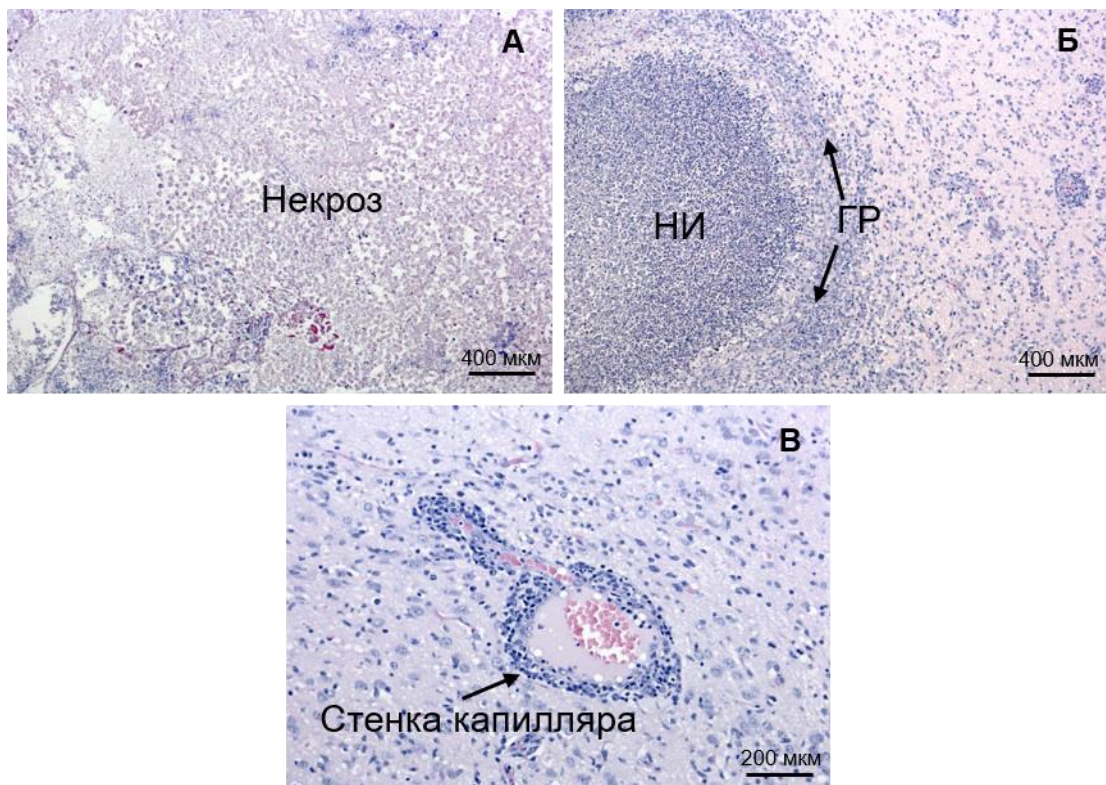


Рисунок 3.36 - Гистологические признаки поражения мозговой ткани в модели интрацеребральной посттравматической гематомы (гематоксилин-эозин): А, Б — очаг некроза, ограниченный нейтрофильной инфильтрацией (НИ) и глиальным рубцом (ГР); В - признаки застоя крови и миграции лейкоцитов через стенку капилляра.

«Окрашивание берлинским синим по Перлсу продемонстрировало наличие отложений гемосидерина (синего цвета) в ткани головного мозга,

прилегающей к очагу повреждения» [Karagyaur et al, 2021], во всех группах, кроме контрольной (Рисунок 3.37). Поскольку в группе контроля объем очага повреждения значительно больше, чем в других группах, и повреждение захватывает те области, где у других крыс наблюдаются отложения гемосидерина, мы предположили, что в контрольной группе очаг первичного поражения расширился и поглотил отложения гемосидерина.

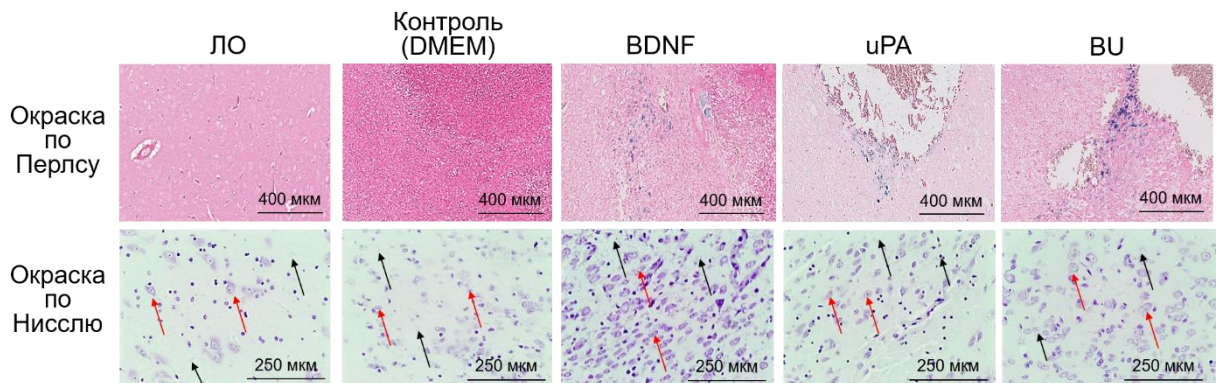


Рисунок 3.37 - Гистологическое исследование срезов головного мозга в области повреждения в модели интрацеребральной посттравматической гематомы. Окраска по Перлсу выявляет отложения гемосидерина (синие зерна). Окраска по Нисслию отражает функциональное состояние нейронов в области полутени: красные стрелки — живые нейроны, но находящиеся в гипоксических условиях, черные стрелки — погибшие нейроны (тени нейронов).

Таким образом, наибольший нейропротективный эффект (по параметрам выживаемости, тяжести неврологических дефицитов и объема очага повреждения) наблюдался именно у комбинации BDNF + uPA, чем при действии этих факторов по-отдельности, что подтверждает данные, полученные на модели травматической денервации задней конечности мыши (раздел 3.3.2), что BDNF и uPA потенцируют нейропротективную и прорегенераторную активность друг друга. Полученные данные также подтверждают более ранние наблюдения о том, что комбинации терапевтических молекул эффективнее стимулируют регенеративные процессы, чем монотерапия пусть эффективной, но одной единственной

молекулой [Gupta et al, 2009; Lopatina et al, 2011; Makarevich et al, 2015; Karagyaur et al, 2015]. По имеющимся у нас сведениям, результаты изучения нейропротективной активности комбинации BDNF и uPA в модели интрацеребральной посттравматической гематомы являются оригинальными и получены впервые.

3.5.2 Изучение клеточных механизмов нейропротективной и прорегенераторной активности комбинации рекомбинантных белков BDNF и uPA в моделях *in vitro*

Для изучения механизмов нейропротективной и прорегенераторной активности комбинации BDNF и uPA, выявленной в модели интрацеребральной посттравматической гематомы *in vivo*, были проведены дополнительные исследования. Поскольку ключевыми механизмами повреждения мозговой ткани являются гипоксия, токсическое действие компонентов гема, глутамат-индуцированная токсичность и нейровоспаление, а нейропротекция и регенерация ткани головного мозга обусловлена в основном снижением эффекта этих патологических процессов и перестройкой существующих межнейронных связей, мы решили изучить способность комбинации BDNF + uPA влиять на некоторые из этих процессов.

Для изучения механизмов нейропротекторной и прорегенераторной активности комбинации BDNF и uPA мы оценили их «способность предотвращать гибель нейральных клеток в токсических условиях (нейропротекция) и стимулировать рост нейритов (регенерация) в культуре клеток нейробластомы человека SH-SY5Y. Результаты исследования показали, что образцы среды, содержащие рекомбинантные hBDNF (108 нМ) и huPA (8 нМ) человека или их комбинацию, значительно эффективнее поддерживали выживаемость клеток SH-SY5Y (до 24-48 ч) в условиях глутамат-индуцированной нейротоксичности по сравнению с группой положительного контроля («K+», 100 мМ L-глутамат)» [Karagyaur et al, 2021] (* – $p = 0.001$; ** – $p = 0.001$; *** – $p = 0.001$; **** – $p = 0.001$) (Рисунки 3.38 и

3.39). В эксперименте также наблюдали спонтанную гибель клеток нейробластомы человека SH-SY5Y. Она значительно увеличивалась через 24 часа после начала эксперимента *in vitro*, особенно, в группе отрицательного контроля («К-», бессывороточная среда без L-глутамата).

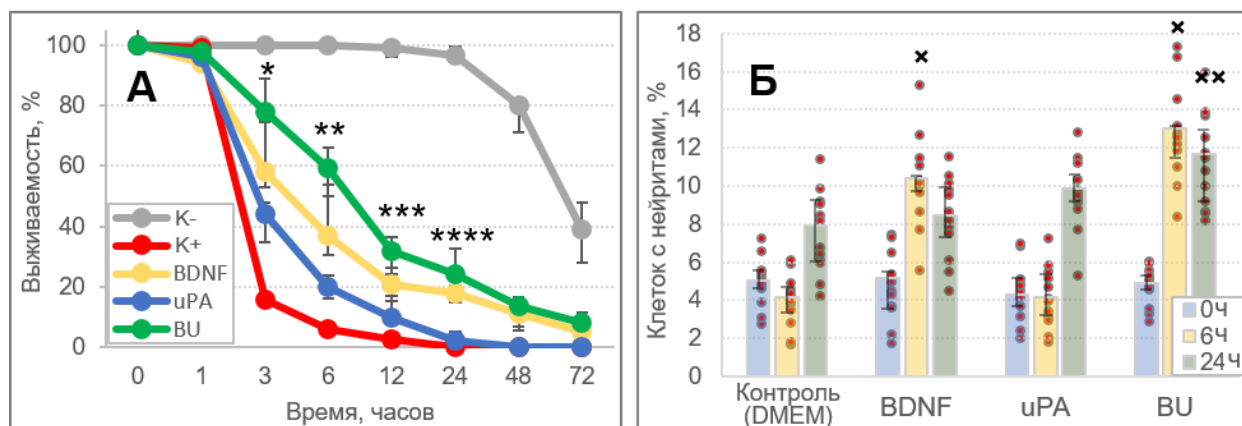


Рисунок 3.38 - Мозговой нейротрофический фактор (BDNF), урокиназный активатор плазминогена (uPA) и их комбинация поддерживают выживаемость клеток нейробластомы SH-SY5Y в условиях глутаматопосредованной токсичности (А) и стимулируют нейритогенез в клетках SH-SY5Y (Б). BDNF, uPA и их комбинация (BU) стимулируют выживание клеток нейробластомы SH-SY5Y статистически достоверно лучше, чем в группе положительного контроля (К+) в интервале времени 3-24 ч: (* – $p = 0.001$; ** – $p = 0.001$; *** – $p = 0.001$; **** – $p = 0.001$). В (Б) ×- $p = 0.001$; ××- $p = 0.005$. Данные представлены в виде медиана (25%; 75%). ANOVA по рангам, критерий Данна. Красные точки на диаграмме соответствуют результатам отдельных измерений. Все сравнения проводились со значением контрольной группы в соответствующий момент времени.

Изучение динамики роста нейритов SH-SY5Y в течение 24 ч показало спонтанный рост нейритов во всех экспериментальных группах. BDNF и BU стимулировали рост нейритов (нейритогенез) статистически достоверно лучше, чем образец контрольной среды, через 6 часов после начала эксперимента ($p = 0.001$) (Рисунки 3.38 и 3.40). Через 6 ч в группе BU у 13.0% (11.5%; 13.1%) клеток были нейриты, тогда как в контрольной группе только у 4.2% (3.4%; 4.7%) клеток были нейриты. Через 24 ч только группа BU статистически достоверно отличалась от контроля ($p = 0.005$), а остальные

группы – не отличались: 7.6% (6.2%; 9.2%) для контроля, 8.5% (7.2%; 9.9%) для BDNF, 9.7% (9.1%; 10.6%) для uPA и 11.2% (9.1%; 13.0%) для BU.

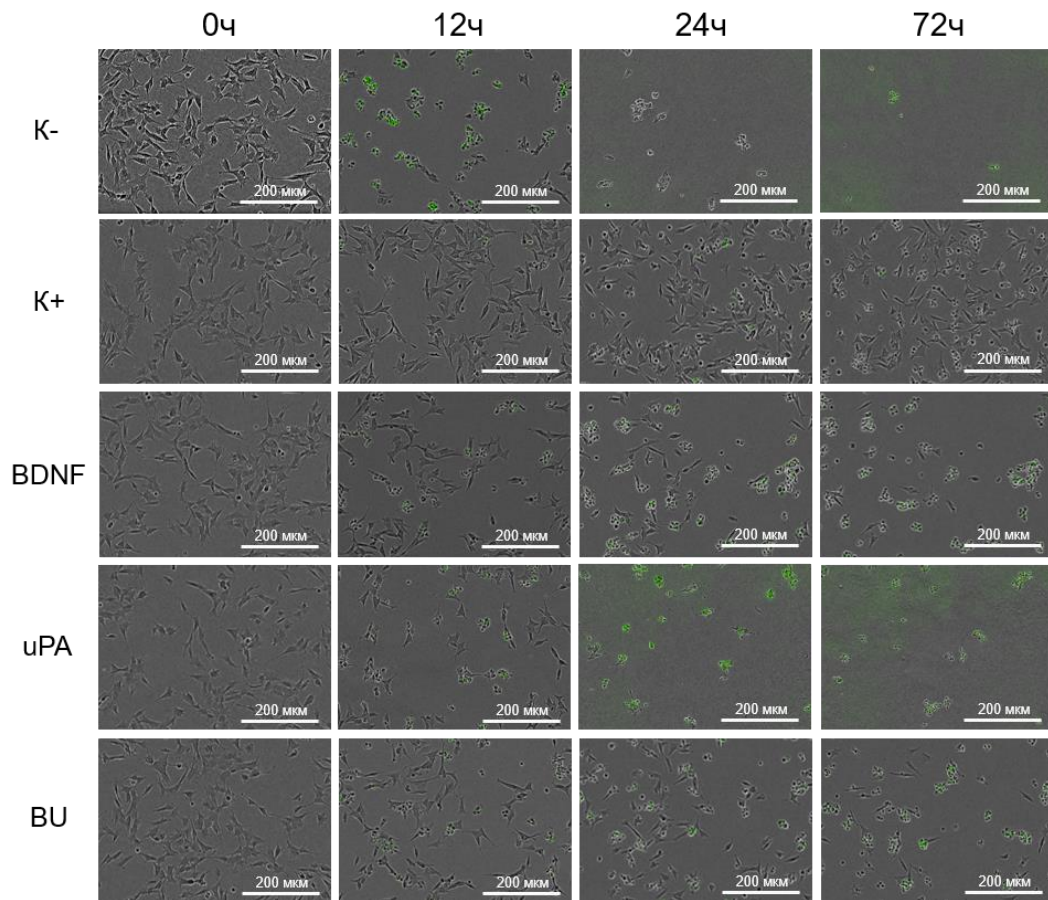


Рисунок 3.39 - Образцы изображений, полученные при исследовании прямой нейропротективной активности образцов сред BDNF, uPA и BU в модели глутамат-индуцированной нейротоксичности *in vitro* в культуре клеток нейробластомы SH-SY5Y. Зеленое окрашивание соответствует погибшим клеткам (апоптоз).

В исследовании предположительных механизмов нейропротективной активности комбинации BDNF и uPA на *in vitro* моделях впервые было показано, что BDNF в сочетании с uPA обладает статистически значимой прямой нейропротективной активностью в модели глутамат-индуцированной токсичности в культуре клеток нейробластомы человека SH-SY5Y (нейропротекция), а также статистически значимо стимулирует прорастание их нейритов (регенерация), причем установленный эффект оказался более выраженным при действии именно комбинации BDNF + uPA, чем при

действию каждой из этих молекул по-отдельности, т.е. BDNF и uPA потенцируют нейропротективную и прорегенераторную активность друг друга.

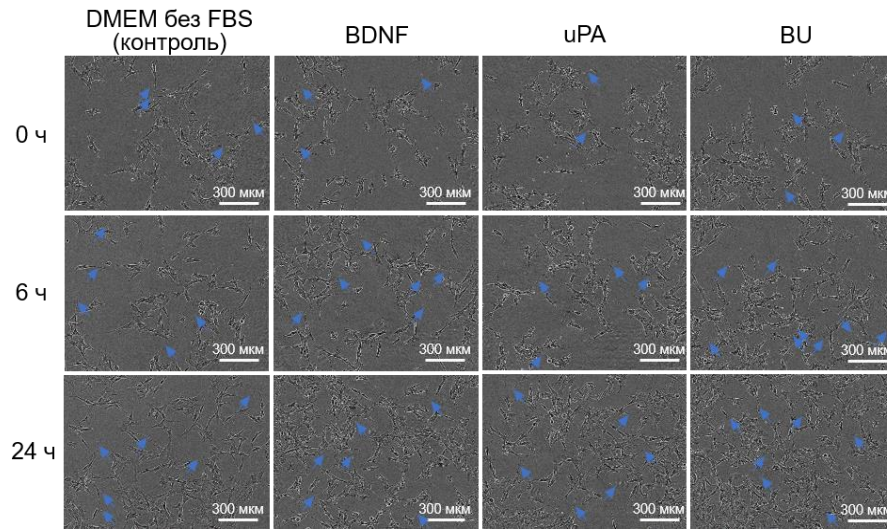


Рисунок 3.40 - Образцы изображений, полученные при исследовании способности образцов сред BDNF, uPA и BU стимулировать нейритогенез. Стрелками показаны примеры уценных отростков.

Полученные результаты хорошо согласуются с данными, полученными на *in vivo* моделях травматической денервации задней конечности мыши (раздел 3.3.2) и интрацеребральной посттравматической гематомы (раздел 3.4.1), «и подтверждают высказанный ранее тезис о том, что более полноценная и функциональная регенерация тканей может быть стимулирована только сочетанным действием функционально комплементарных молекул» [Eming et al, 2014; Li R et al, 2020]. По имеющимся у нас сведениям, полученные данные являются оригинальными и получены впервые.

3.5.3 Изучение влияния комбинации рекомбинантных белков BDNF и uPA на фагоцитарную активность моноцитов/макрофагов в области полутени в модели интрацеребральной посттравматической гематомы крыс

Процесс нейровоспаления является одним из основных механизмов вторичного повреждения мозговой ткани после острого ее повреждения, который запускает расширение очага повреждения с ухудшением прогноза выживаемости и утяжелением (аггравацией) неврологических дефицитов. Механизмы нейровоспаления изучены недостаточно, но очевидным является тот факт, что первыми в него включаются клетки нейроглии, которые затем привлекают в очаг поражения иммунные клетки гематогенного происхождения. В ряде работ, опубликованных ранее, была показана способность системы урокиназного активатора плазминогена (uPA) стимулировать процессы миграции и экстравазации иммунных клеток [Nykjaer et al, 1992; Cuzner et al, 1999]. Для изучения эффектов комбинации BDNF и uPA в модели интрацеребральной посттравматической гематомы на активность иммунных клеток в очаге повреждения была проведена окраска срезов головного мозга в области повреждения антителами к маркерам иммунных клеток: провоспалительным и противовоспалительным.

«Иммуногистохимическое окрашивание срезов головного мозга на CD68, маркер лизосомальной активности и провоспалительной M1-микроглии, продемонстрировало его достоверно более высокую экспрессию в срезах мозга группы» [Dzhauari et al, 2022] BU ($p = 0.001$): 31.7% (21.4%; 41.3%) площади среза, позитивно окрашивающейся на CD68, по сравнению с 5.9% (5.0%; 7.7%) в контрольной группе (Рисунок 3.41). В группах BDNF и uPA площадь среза, окрашивающаяся позитивно на CD68, достигала 6.8% (2.8%; 10.4%) и 12.8% (6.8%; 20.6%) соответственно, без статистически значимых различий по сравнению с группой контроля. Хотя не было установлено статистически значимых различий в окрашивании CD68 между «группами BDNF и uPA, uPA, по-видимому, способен стимулировать активацию

резидентной микроглии или привлечь клетки моноцитарно-макрофагального звена периферической крови.

Окрашивание на CD163, маркер M2-микроглии и гемоглобин-активированных макрофагов» [Dzhauari et al, 2022], наоборот, продемонстрировало достоверное снижение инфильтрации головного мозга CD163+ клетками в группе BU ($p = 0.002$): 2.5% (1.0%; 2.6%) против 9.7% (4.3%; 15.8%) в контрольной группе (Рисунок 3.41). Аналогичное снижение клеток CD163+ наблюдалось в группах BDNF и uPA: 3.7% (0.5%; 7.8%) и 3.1% (1.5%; 5.5%) соответственно; однако эти значения статистически достоверно не отличались от контрольной группы.

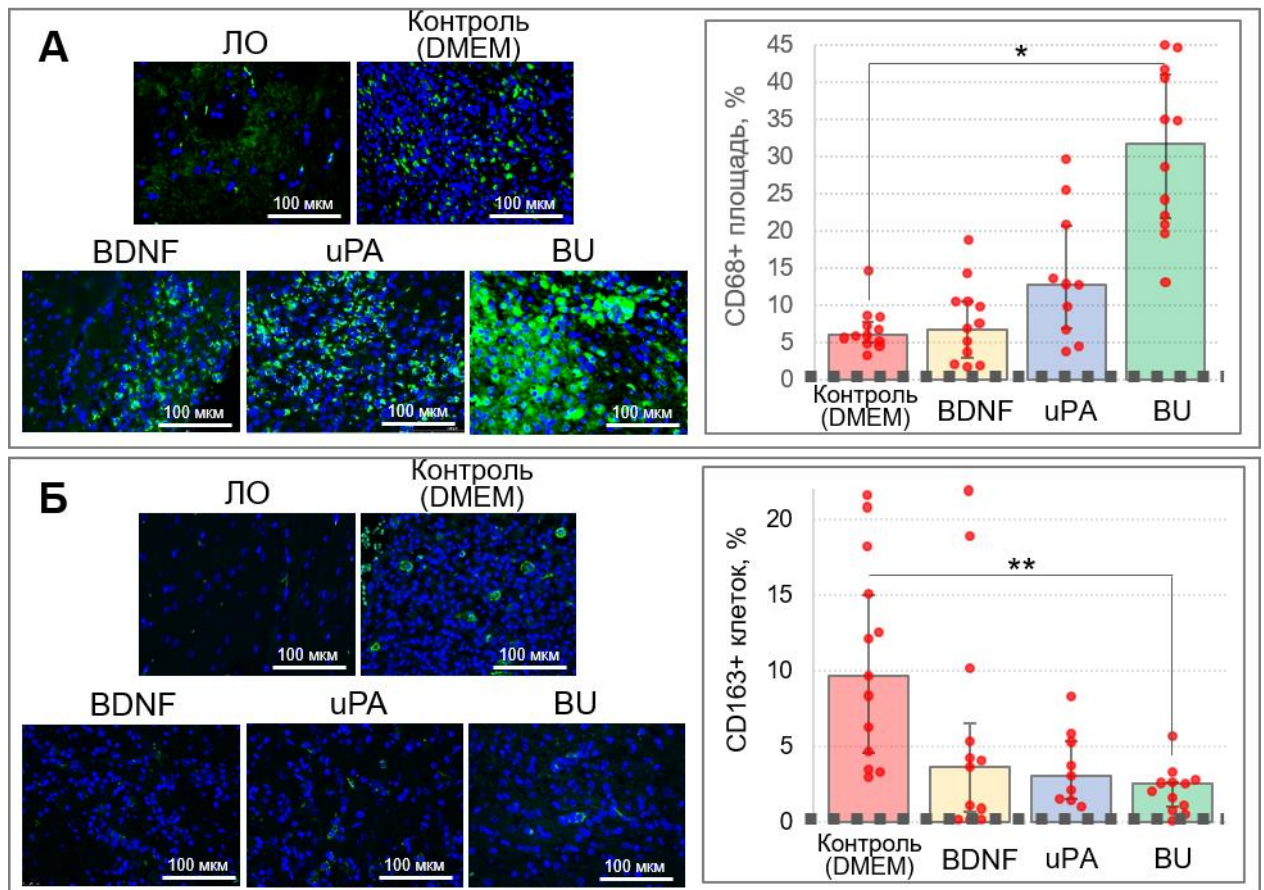


Рисунок 3.41 - Результаты иммуногистохимического окрашивания срезов головного мозга через 14 суток после внутримозгового кровоизлияния: (А) – CD68 и (Б) – CD163. На диаграммах пунктирные линии соответствуют площади срезов мозга ложнооперированных животных (ЛО), окрашивающихся антителами к CD68 или CD163, а красные точки – результату индивидуальных измерений. Данные представлены в виде

медиана (25%; 75%). * – $p = 0.001$; ** – $p = 0.002$; $n \geq 9$ (ANOVA по рангам, критерий Данна).

Маркер CD68 является маркером фагоцитоза [Lananna et al, 2020] и считается одним из маркеров провоспалительных популяций клеток, а нейровоспаление считается одним из факторов неблагоприятного исхода после повреждения головного мозга [Kalra et al, 2022], однако, в *in vivo* модели интрацеребральной посттравматической гематомы на крысах в группе BDNF + uPA наблюдали наилучшее выживание экспериментальных животных и наименьший объем очага повреждения (раздел 3.5.1), несмотря на ярко выраженную окраску срезов головного мозга таких крыс антителами к CD68. Механизм такого расхождения между полученными результатами не установлен и требует дальнейшего изучения, однако, ряд работ последних лет позволяет сделать некоторые предположения. Так, процесс формирования провоспалительной гиперактивной микроглии, хронизирующей нейровоспаление, является градиентным с прохождением следующих стадий: активация -> праймирование -> гиперактивация, причем маркер фагоцитоза CD68 характерен для стадии праймирования [Witcher et al, 2015; Koss et al, 2019]. В мировой литературе встречаются упоминания о том, что BDNF (в некоторых условиях) и uPA по-отдельности могут стимулировать активацию микроглии [Cunningham et al, 2009; Ding et al, 2020], что хорошо соответствует полученным экспериментальным данным. Такая активация запускает процессы фагоцитоза (повышение экспрессии маркера CD68) и, по-видимому, способствует скорейшей резорбции излившейся крови, что снижает ее токсическое действие на нейральные клетки в очаге повреждения, а, соответственно, улучшает выживаемость экспериментальных животных и уменьшает объем повреждения. Главным вопросом остается, что же препятствует переходу праймированной микроглии в гиперактивированную в используемой модели интрацеребральной посттравматической гематомы? Однозначного ответа на него нет, но ряд данных указывает на то, что таким

эффектом может обладать BDNF, способный осуществлять реверсию праймированной микроглии в гомеостатическую и способный конвертировать провоспалительное действие цитокинов в стимуляцию нейропластичности [Calabrese et al, 2014; Porter et al, 2022], а также отсутствие в используемой экспериментальной модели дополнительной иммунологической стимуляции, необходимой для перехода праймированной микроглии в гиперактивную [Witcher et al, 2015].

Таким образом, полученные данные вновь продемонстрировали способность BDNF и uPA потенцировать активность друг друга в составе данной комбинации, что привело к усилению фагоцитоза в очаге кровоизлияния, и, как ни странно, коррелировало со снижением тяжести неврологических нарушений у экспериментальных животных и уменьшением объема очага повреждения, хотя механизм данного явления пока установить не удалось. Полученные результаты хорошо соотносятся с выше приведенными данными, полученными на *in vitro* и *in vivo* моделях, о способности BDNF и uPA функционально дополнять друг друга в процессах нейропротекции и регенерации нервной ткани. По имеющимся у нас сведениям, полученные результаты являются оригинальными и получены впервые.

3.6 Изучение нейропротективной и прорегенераторной активности комбинации BDNF и uPA в составе секрета мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК) в модели интрацеребральной посттравматической гематомы

Состояние проблемы на момент исследования. Как уже было обсуждено в разделе 3.4, проблема защиты и восстановления центральных отделов нервной системы по ряду физиологических и медико-социальных причин является особо острой и нерешенной. В разделе 3.5 мы показали, что комбинация рекомбинантных белков BDNF и uPA обладает выраженной нейропротективной и прорегенераторной активностью, что проявляется в

лучшей сохранности структуры и функции головного мозга в модели интрацеребральной гематомы, более того, они потенцируют активность друг друга, поскольку ни один из них по-отдельности не обладает настолько выраженным эффектом. Судя по всему, это обусловлено их способностью функционально дополнять друг друга и воздействовать на различные звенья и компоненты процесса регенерации.

В одной из наших более ранних работ на модели травматической денервации задней конечности было продемонстрировано, что плазмидная генетическая конструкция pVax1-hBDNF, кодирующая BDNF, уступает по своей активности совокупности молекул (природной композиции), секретируемых мезенхимными стромальными клетками (МСК), которые считаются ключевыми стимуляторами и регуляторами процессов регенерации. В большом количестве экспериментальных моделей была продемонстрирована способность МСК стимулировать процессы регенерации, причем одним из основных механизмов считается продукция широкого спектра нейротрофических, проангиогенных, антиапоптотических и противовоспалительных молекул (низкомолекулярных соединений, белков и нуклеиновых кислот), в то же время вклад отдельных молекул в реализацию отдельных аспектов ее активности остается неизвестным. Понимание вклада отдельных молекул, с одной стороны, позволит лучше понять механизмы такой прорегенераторной активности МСК и ключевые звенья процесса регенерации, на которые необходимо воздействовать для ее стимуляции, а с другой, позволит предлагать подходы к усилению или изменению их активности (в том числе, для эндогенных МСК), а также разрабатывать новые перспективные лекарственные кандидаты для стимуляции процессов обновления и регенерации органов и тканей.

«BDNF и uPA также входят в состав секретома МСК, однако их роль в процессах регенерации (в частности регенерации нервной ткани)» [Dzhauari et al, 2022] еще только предстоит установить. Ряд сведений указывают на то, что их вклад в регенерацию нервной ткани может довольно существенным. В

пользу этого свидетельствуют ранее полученные нами данные: нейтрализация активности BDNF снижает нейропротективную активность секрета МСК в модели травматической денервации задней конечности [Lopatina et al, 2011], повышение экспрессии компонентов урокиназной системы в ответ на повреждение и при индукции процессов перестройки нейронных сетей [Siconolfi et al, 2001; Shmakova et al, 2022], а также выраженный потенцирующий эффект BDNF и uPA в целом ряде *in vitro* и *in vivo* моделей (разделы 3.2.1, 3.3 и 3.5).

Среди вопросов, которые необходимо прояснить в ходе данного исследования, были сформулированы следующие:

1. Способен ли секретом МСК, представляющий собой совокупность низкомолекулярных соединений, белков, нуклеиновых кислот и молекулярных комплексов с нейротрофической, проангиогенной, антиапоптотической и противовоспалительной активностью, стимулировать нейропротекцию и регенерацию ткани головного мозга в очаге острого повреждения в модели интрацеребральной посттравматической гематомы?

2. Каковы молекулярные и клеточные механизмы нейропротективной и прорегенераторной активности МСК в модели острого повреждения головного мозга?

3. Какова роль BDNF и uPA в реализации нейропротективной и прорегенераторной активности МСК в модели острого повреждения головного мозга?

Забегая вперед, отметим, что для секрета МСК была выявлена ярко выраженная способность препятствовать расширению очага повреждения в модели острого повреждения головного мозга, что, ввиду медико-социальной остроты проблемы повреждения головного мозга и отсутствия действенных терапевтических подходов к ее лечению, повлекло за собой необходимость оценить фармакологические параметры потенциального лекарственного кандидата: оптимальные пути введения, дозировку, зависимость эффекта от кратности и времени введения и т.п.

3.6.1 Изучение нейропротективной и прорегенераторной активности секрета МСК человека в модели интрацеребральной посттравматической гематомы

Результаты изучения нейропротективной и прорегенераторной активности секрета МСК человека в модели интрацеребральной посттравматической гематомы показали, что секретом МСК человека при его введении в область кровоизлияния оказывает протекцию ткани мозга в области повреждения, причем эффективность и спектр такого действия секрета во многом определяется его дозировкой. Так, секретом МСК человека чМСК1х (неконцентрированный) не оказывал существенного влияния на выживаемость экспериментальных животных и купирование у них неврологического дефицита (Рисунок 3.42), однако, он способствовал уменьшению объема повреждения головного мозга по данным МРТ – 70.1 (53.5; 155.8) мм³ (Рисунок 3.43) и гистологического исследования (Рисунок 3.46), а также способствовал сохранению долговременной памяти у крыс 100% (94.4%; 100%) (Рисунок 3.42В и 3.42Г).

Секретом МСК человека, сконцентрированный в 10 раз, чМСК10х достоверно более эффективно поддерживал выживаемость животных ($p = 0.023$; $n \geq 10$; лог-ранк-тест Каплана-Мейера) по сравнению с контролем. Так, в течение «14 суток после моделирования гематомы выжило 100% прооперированных животных, а также достоверно снижал тяжесть развивающихся у них неврологических нарушений» [Karagaur et al, 2021] ($p = 0.006$; $n \geq 10$; двусторонний точный критерий Фишера) (Рисунок 3.42), однако, по данным МРТ-исследования – 261.4 (232.0; 337.4) мм³ (Рисунок 3.43) и гистологического исследования (Рисунок 3.44) приводил к увеличению объема повреждения.

В группе контроля, где в область кровоизлияния вводили среду DMEM без сыворотки, выживаемость в течение 14 суток составила 75% ($n = 20$), а в структуре неврологических нарушений через 10 суток после моделирования

интрацеребральной посттравматической гематомы 50% составляли визуально здоровые животные и 25% животных с тяжелыми неврологическими нарушениями (Рисунок 3.42). Средний объем очага кровоизлияния через 11 суток после моделирования интрацеребральной гематомы по данным МРТ составил 176.6 (138.5; 201.5) мм³ (Рисунок 3.44) и достоверно не отличался от других групп, а эффективность сохранности долговременной памяти составила 79.2% (12.2%; 100%).

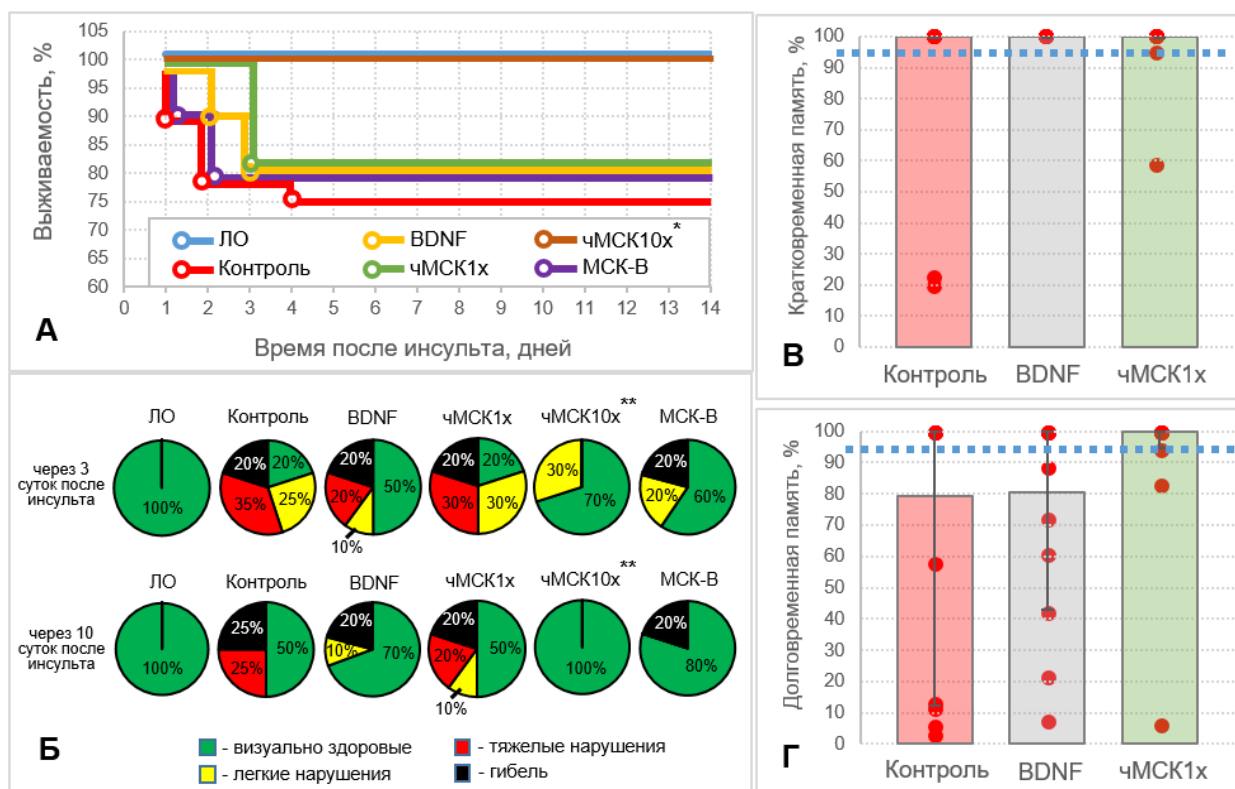


Рисунок 3.42 - Результаты *in vivo* исследования нейропротекторной активности секрета МСК человека: А – выживаемость экспериментальных животных (* - $p = 0.023$ - чМСК10х против контроля; $n \geq 10$; лог-ранк-тест Каплана-Мейера); Б – неврологический статус экспериментальных животных (ЛО – ложнооперированные); и когнитивный статус экспериментальных животных: В - кратковременная память (через 24 ч после внутримозгового кровоизлияния); Г – долговременная память (через 10 суток после внутримозгового кровоизлияния). Пунктирная линия соответствует показателям памяти животных из группы ЛО. Данные представлены в виде медиана (25%; 75%). ** – $p = 0.006$ чМСК10х против контроля; $n \geq 10$; двусторонний точный критерий Фишера.

В группе положительного контроля, где экспериментальным животным вводили в область кровоизлияния 3.5 нг/мкл рекомбинантного BDNF, а также в группе МСК-В, где вводили чМСК1х, комплементированный 3.5 нг/мкл рекомбинантного BDNF человека, наблюдали несколько лучшее восстановление неврологических показателей по сравнению с таковыми для контрольной группы, однако, к существенному улучшению выживаемости экспериментальных животных (80%) (Рисунок 3.42) и уменьшению объема повреждения головного мозга по данным МРТ (180.7 (137.6; 221.2) мм³ для BDNF и 129 (88.9; 197.3) мм³ для МСК-В) введение данных композиций не привело (Рисунок 3.43). Включение в эксперимент группы МСК-В было обусловлено ожиданием аддитивного терапевтического эффекта белка BDNF (немедленный) и микровезикул МСК (отсроченный эффект) в ходе длительного процесса восстановления мозга после внутримозгового кровоизлияния.

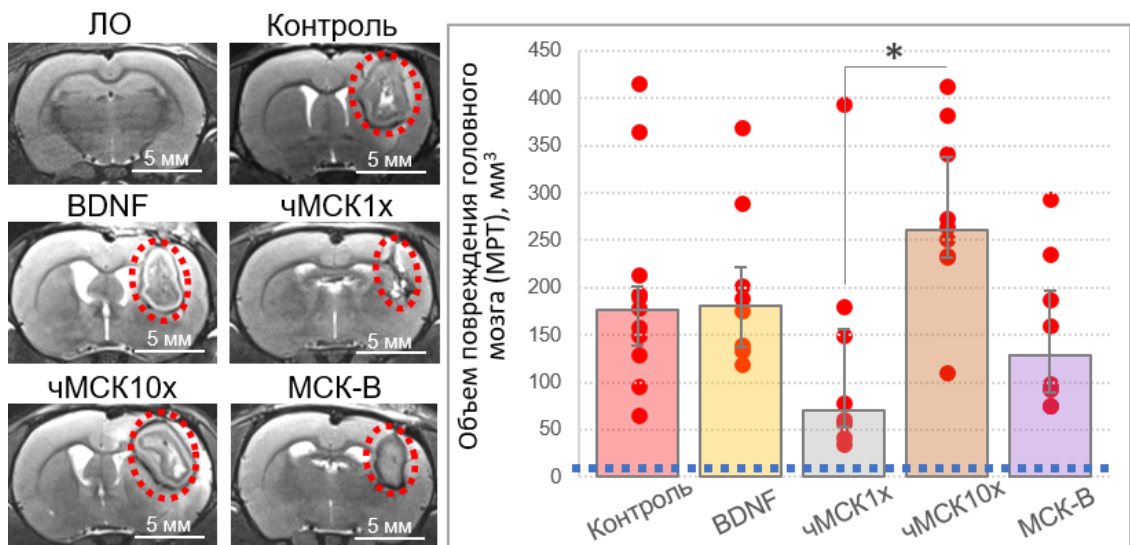


Рисунок 3.43 - Результаты МРТ-исследования головного мозга через 11 суток после моделирования внутримозгового кровоизлияния. На схеме: синяя пунктирная линия соответствует объему участка поражения головного мозга у животных ЛО. Данные представлены в виде медианы (25%; 75%). * - $p = 0.019$; $n \geq 8$ (ANOVA по рангам, критерий Данна).

Окрашивание гематоксилином-эозином срезов головного мозга в месте повреждения выявило схожее с результатами МРТ распределение размера очага повреждения головного мозга в группах (Рисунок 3.44). Статистически достоверных различий между группами установлено не было, хотя, как и в МРТ-исследовании, область поражения имела тенденцию к уменьшению в группах чМСК1х и МСК-В: 4.9% (3.9%; 6.2%) и 6.6% (2.8%; 7.7), соответственно, против 9.8% (6.6%; 13.4%) в контрольной группе и 8.4% (6.8%; 11.8%) в группе чМСК10х (n = 5).

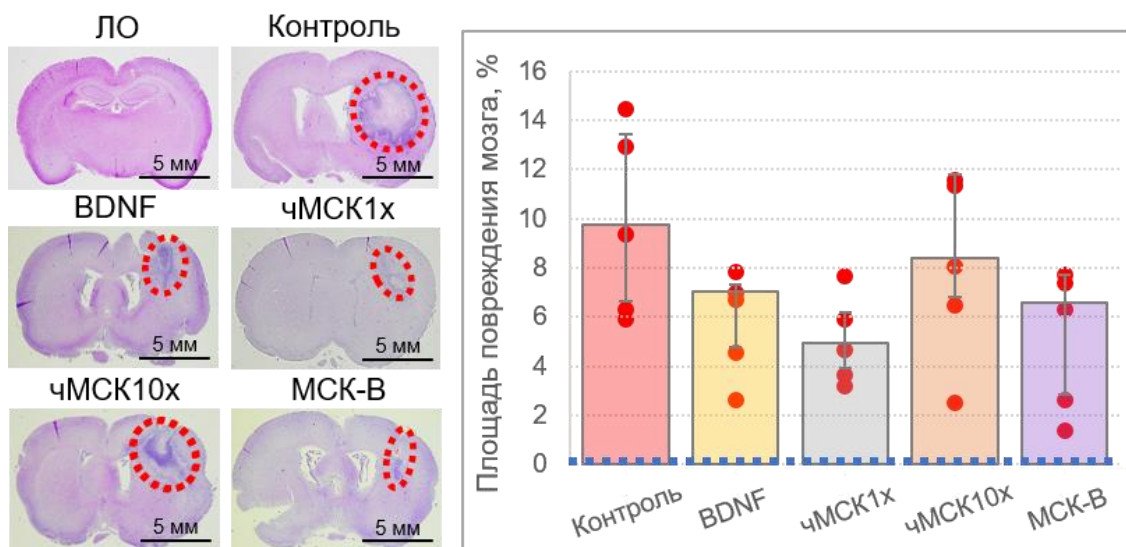


Рисунок 3.44 - Результаты гистохимического исследования головного мозга через 14 суток после моделирования внутримозгового кровоизлияния. На фотографиях: красные пунктирные овалы очерчивают области повреждения мозговой ткани. На диаграмме: синяя пунктирная линия соответствует площади участка поражения головного мозга у животных из группы ЛО. Данные представлены в виде медиана (25%; 75%). n = 5, существенных различий между группами нет (ANOVA по рангам, критерий Данна).

«Окрашивание срезов головного мозга гематоксилин-эозином и по Нисслю также подтвердило наличие микроскопических признаков повреждения ткани головного мозга: некроза, ишемии, отека, глиального рубца, нейтрофильной инфильтрации (Рисунки 3.44 и 3.45). Признаки поражения были более выражены в контрольной группе, однако количественный анализ не проводился. Окрашивание берлинским синим по

Перлсу показало наличие отложений гемосидерина (синего цвета) в ткани головного мозга, прилегающей к месту поражения, во всех группах, но они были менее выражены в контрольной группе и группах чМСК10х (Рисунок 3.45). Мы полагаем, что это свидетельствует о том, что расширение первичного участка поражения охватило отложения гемосидерина в группе отрицательного контроля и в группе чМСК10х» [Ткачук и др., 2023].

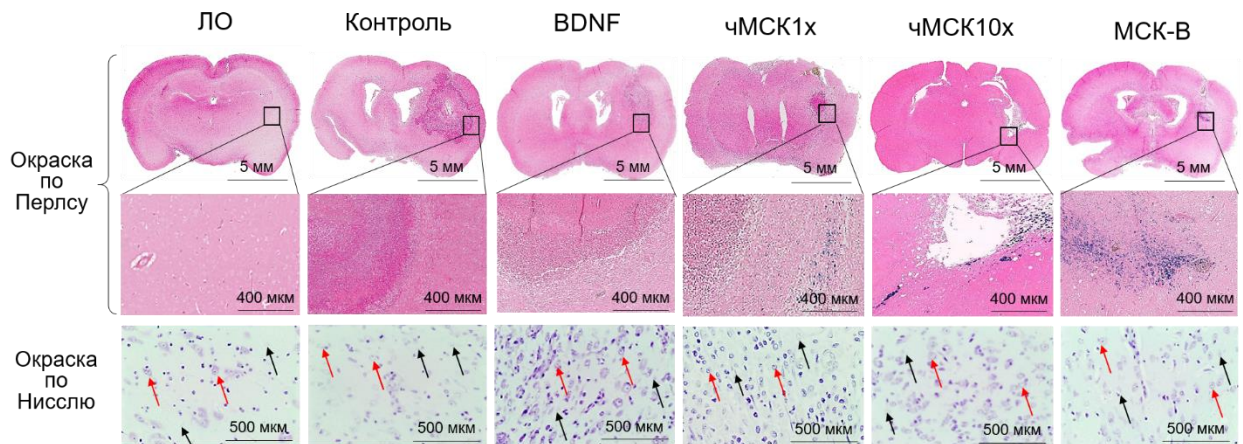


Рисунок 3.45 - Гистологическое исследование срезов головного мозга. Окраска по Перлсу выявляет отложения гемосидерина (синие зерна). Окраска по Нисслию отражает функциональное состояние нейронов полутени: красными стрелками показаны живые, хотя и находящиеся в гипоксии нейроны, черными стрелками показаны погибшие нейроны (тени нейронов).

Полученные данные позволяют предположить, что секретом МСК обладает способностью снижать эффект повреждающего действия крови в очаге повреждения, однако для реализации такой активности содержание нейропротективных и прорегенераторных факторов в составе секрета должно достигать определенной концентрации. Так, неконцентрированный секретом МСК человека и композиции на его основе (чМСК1х и МСК-В) обладают заметной, но не очень выраженной нейропротективной активностью, в то время как в секрете МСК, сконцентрированном в 10 раз, (чМСК10х) содержание нейропротективных молекул, судя по всему, достигает терапевтических концентраций и обеспечивает ему способность в острейшем периоде модельного кровоизлияния нейтрализовать негативное

действие излившейся крови, что приводит к увеличению выживаемости экспериментальных животных и снижению у них тяжести неврологических нарушений. Наблюдаемое расхождение в ряде эффектов чМСК10х может быть объяснено наличием в его составе молекул, воздействующих на отдельные составляющие головного мозга (и в разное время), а также видоспецифичностью действия его компонентов. Предположительно, компоненты секрета МСК, обладающие нейротрофической активностью и низкой видоспецифичностью (например, нейротрофические факторы), позволяют нейтрализовать токсическое действие крови в острейшем периоде повреждения нервной ткани, а другие компоненты, наоборот, могут оказывать негативное, повреждающее действие и вызывать расширение очага первичного повреждения в отсроченном периоде. Стоит отметить, что в неконцентрированном секрете МСК (чМСК1х), судя по всему, концентрация таких "негативных" факторов была недостаточна для запуска деструктивных процессов. Логично предположить, что большой объем повреждения головного мозга должен коррелировать с ухудшением тяжести неврологического состояния и снижением выживаемости, однако, это во многом определяется локализацией повреждения и индивидуальными особенностями человека или экспериментального животного с повреждением мозга. В текущем дизайне эксперимента мы не можем исключить, что, несмотря на 100% «выживаемость таких животных в острейшем периоде, такое объемное повреждение мозга в группе чМСК10х может привести к значительной гибели экспериментальных животных в отсроченном периоде» [Karagyaur et al, 2021], вне периода наблюдения (после 14 суток).

Поскольку в данном эксперименте было исследовано нейропротективное действие секрета МСК человека (т.е. ксеногенного по отношению к экспериментальным животным), мы предположили, что такое расширение очага повреждения при введении сконцентрированного секрета МСК человека в мозг крысы может быть обусловлено увеличением концентрации неких видоспецифичных иммуногенных молекул или молекулярных

комплексов, тем более что ряд исследований показал содержание в секрете МСК внеклеточных везикул, способных нести ряд видоспецифичных иммуногенных молекул [Janockova et al, 2021], а сам мозг содержит клетки микроглии – разновидность иммунных клеток, способных к презентации антигена, фагоцитозу, запуску и поддержанию воспаления [Feldman et al, 2022].

Для изучения возможного иммуногенного провоспалительного влияния отдельных компонентов ксеногенного секрета на размер очага повреждения в модели интрацеребральной посттравматической гематомы, мы произвели «иммуногистохимическое окрашивание срезов мозга в области повреждения антителами к маркеру фагоцитоза (лизосомальной активности) и провоспалительной М1-микроглии CD68, а также антителами к маркеру противовоспалительных гемоглобин-активируемых макрофагов CD163 и М2-микроглии» [Karagyaur et al, 2021]. Было установлено, что на срезах мозга животных из группы чМСК10х область, специфично окрашенная CD68, была достоверно больше, чем контрольной группе: 18.0% (6.5%; 25.6%) против 5.9% (5.0%; 7.4%) в контрольной группе ($p < 0.05$; $n \geq 9$) (Рисунок 3.46). Никаких существенных различий в площади области, положительно окрашивающейся антителами к CD68, в группах BDNF, чМСК1х и МСК-В по сравнению с контрольной группой не наблюдалось, хотя наблюдалась тенденция к увеличению количества CD68-позитивно окрашивающихся клеток в этих группах.

Окрашивание на CD163, маркер противовоспалительных гемоглобин-активируемых макрофагов CD163 и М2-микроглии, «показало выраженное (но не статистически значимое) снижение уровня CD163-позитивных клеток в группе чМСК10х – 1.7% (0.6%; 5.3%) по сравнению с 9.7% (4.6%; 15.0%) в контрольной группе ($p = 0.052$; $n \geq 8$) (Рисунок 3.46). Аналогичное снижение наблюдалось в группах» [Karagyaur et al, 2021] BDNF, чМСК1х и МСК-В, хотя они по-прежнему существенно не отличались от контрольной группы.

Полученные результаты позволяют предположить, что, действительно, в результате концентрирования секрета МСК в его составе увеличивается концентрация не только нейропротективных молекул, но и иммуногенных (по-видимому, в составе везикулярной фракции секрета), и, предположительно, именно гиперактивация клеток микроглии [Witcher et al, 2015; Koss et al, 2019] компонентами ксеногенного секрета, приводит к привлечению иммунных клеток гематогенного происхождения и разрастанию очага повреждения.

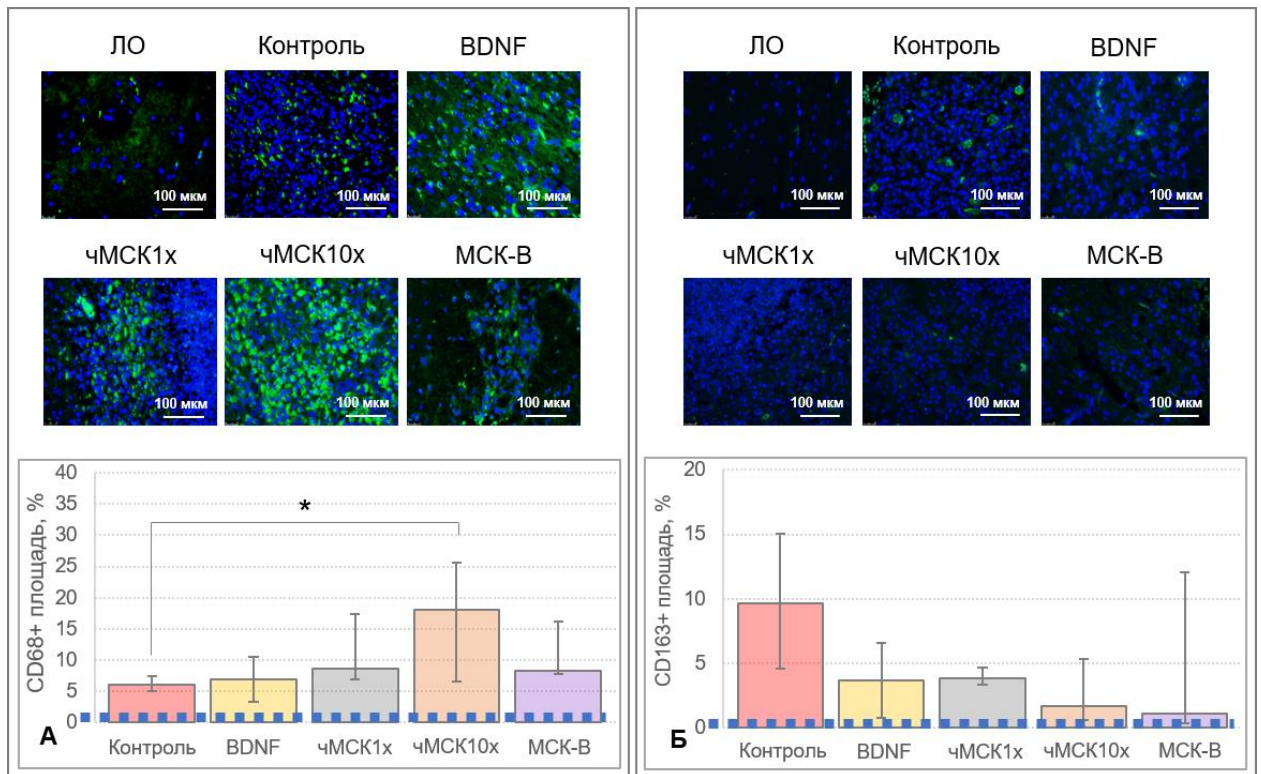


Рисунок 3.46 - Результаты иммуногистохимического окрашивания срезов головного мозга на 14-е сутки после моделирования интрацеребральной гематомы: А – иммуногистохимическое окрашивание на CD68; Б – иммуногистохимическое окрашивание на CD163. На фотографиях: зеленое окрашивание соответствует окрашиванию CD68 или CD163; синее окрашивание соответствует ядрам клеток. На диаграммах: синяя пунктирная линия соответствует площади участка поражения головного мозга у ложнооперированных животных (ЛО). Данные представлены в виде медиана (25%; 75%). * – $p < 0.005$, $n \geq 9$ (ANOVA по рангам, критерий Данна).

Полученные результаты позволяют утверждать, что секретом мезенхимных стромальных клеток, одного из основных регуляторов

процессов обновления и регенерации тканей, способен оказывать нейропротективную и прорегенераторную активность на ткань мозга, стимулировать выживание и неврологическое восстановление экспериментальных животных в модели интрацеребральной посттравматической гематомы и, при определенных условиях, уменьшать объем повреждения головного мозга. Патогенез интрацеребральной посттравматической гематомы включает все основные звенья патогенеза повреждения нервной ткани (ишемия, токсическое действие глутамата и компонентов крови, нарушение целостности гематоэнцефалического барьера, нейровоспаление и вторичное повреждение), и, несмотря на такое разнообразие механизмов повреждения, секретом МСК способен защищать мозговую ткань от негативного действия, по крайней мере, некоторых из них, что является уникальным свойством композиций перед монокомпонентными лекарственными средствами и позволяет рассматривать «секретом МСК как потенциальную платформу для разработки и создания новых, перспективных лекарственных кандидатов для патогенетической терапии повреждений» [Primak et al., 2024a] центральной нервной системы. Потенциальные механизмы нейропротективной и прорегенеративной активности секрета МСК будут изучены в разделе 3.6.10.

Результаты исследования показали, что в составе секрета есть, молекулы обладающие, как нейропротективной, так и потенциальной повреждающей (провоспалительной) активностью, обладающие различной динамикой активности: немедленное нейропротективное действие и потенциальное отсроченное провоспалительное. Полученные результаты проявляют комплексность процесса регенерации и демонстрируют, что эффективной регенерации можно добиться только комбинацией воздействий на ее ключевые звенья.

Поскольку в ходе исследования была установлена провоспалительная активация в ткани мозга (окраска на CD68), причем она оказалась дозозависимой, мы предположили, что она может быть обусловлена

введением в мозг крыс компонентов ксеногенного происхождения (компоненты везикулярной фракции секрета МСК человека). Предположение о роли видоспецифичности секрета МСК в модуляции его биологической активности (в т.ч. его нейропротективных и иммуномодулирующих свойствах) будет проверено в разделах 3.6.2 и 3.6.10. Результаты о способности секрета стимулировать защиту и регенерацию мозговой ткани в модели интрацеребральной посттравматической гематомы, а также о видоспецифичности этого действия и его дозозависимости являются оригинальными и получены впервые.

3.6.2 Изучение видоспецифичности нейропротективной и прорегенераторной активности секрета МСК в модели интрацеребральной посттравматической гематомы

Поскольку площадь CD68-специфического окрашивания (признак активации воспаления и фагоцитоза) в группе чМСК10х была достоверно выше, чем в остальных группах, и коррелировала с «объемом поражения головного мозга по данным МРТ и гистохимических исследований, мы предположили, что этот негативный эффект может быть связан с применением ксеногенного (человеческого), а не аллогенного (крысиного) секрета МСК» [Ткачук и др., 2023; Джауари, 2024]. Чтобы проверить нашу гипотезу, мы изучили потенциальный нейропротективный эффект кМСК10х (аллогенный секретом) и сравнили его эффективность с таковой для чМСК10х (ксеногенный секретом) и для препарата сравнения "Церебролизин" (согласно инструкции предназначен для терапии острых нарушений мозгового кровообращения и травм головного мозга). В результате исследования было установлено, что аллогенный секретом кМСК10х обеспечивает 100% выживаемость экспериментальных животных и отличное восстановление их неврологического состояния в модели интрацеребрального посттравматического кровоизлияния, как и чМСК10х ($p < 0.005$ ($n = 12$) для кМСК10х по сравнению с контролем; двусторонний точный критерий

Фишера) (Рисунок 3.47). «По данным МРТ-исследования, секретом кМСК10х эффективно уменьшал объем поражения головного мозга в отличие от чМСК10х: 90.2 (48.3; 144.3) мм³ для кМСК10х против 261.4 (232.0; 337.4) мм³ для чМСК10х ($p = 0.004$; $n \geq 8$)» [Karagyaur et al, 2021].

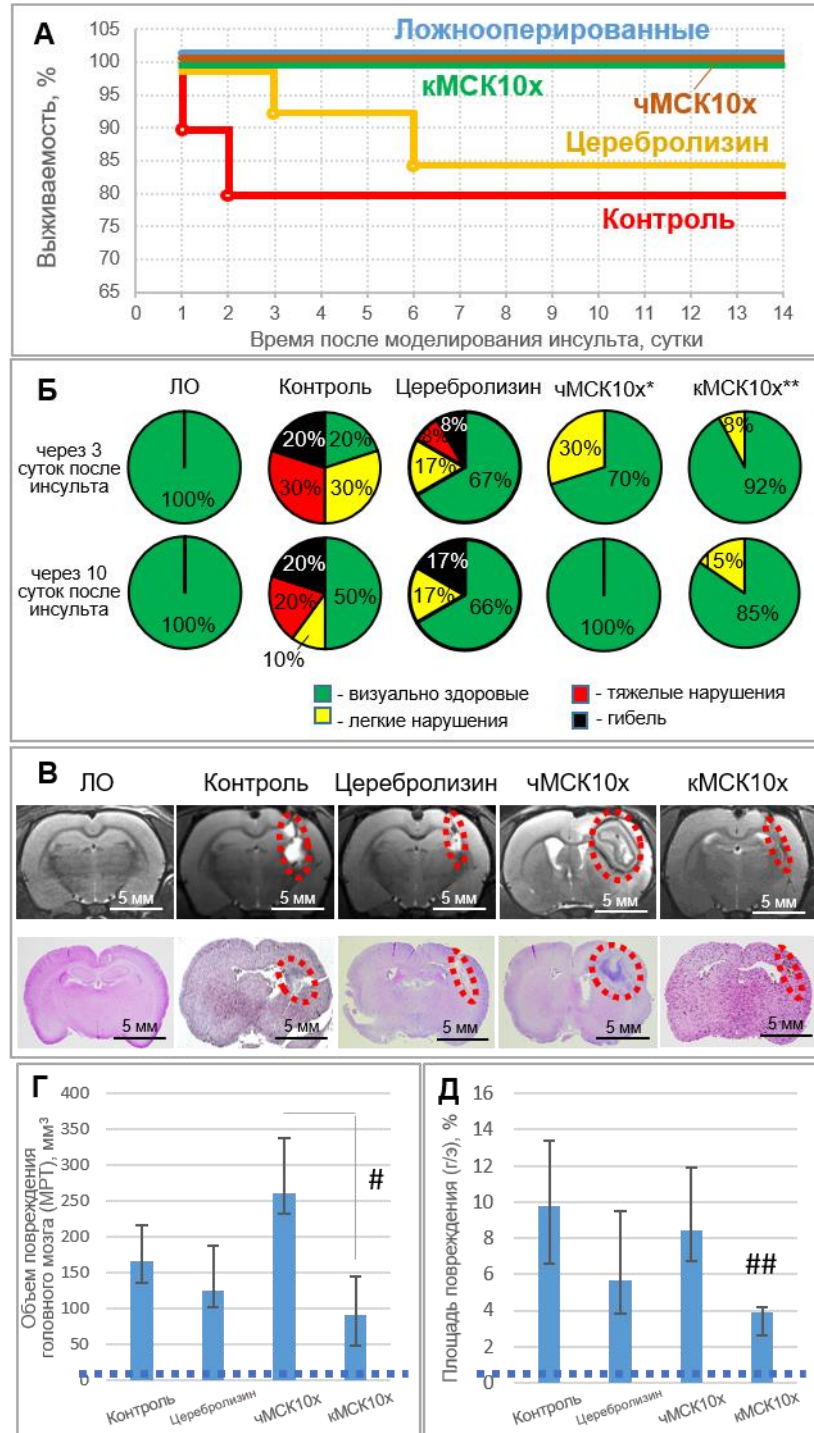


Рисунок 3.47 - Результаты *in vivo* исследования нейропротективной активности аллогенного секрета МСК крысы, сконцентрированного в 10 раз (кМСК10х): А – динамика выживаемости подопытных животных; Б – неврологический статус подопытных животных через 3 и 10 суток после

внутричерепного кровоизлияния (ЛО – ложнооперированный) (* – $p = 0.006$, $n = 10$; ** – $p < 0.005$, $n = 12$, двусторонний точный критерий Фишера); В – образцы МРТ-изображений и гистологические срезы головного мозга, полученные от экспериментальных животных (красные пунктирные овалы ограничивают область повреждения); Г – результаты подсчета объема повреждения по данным МРТ на 11-е сутки после внутричерепного кровоизлияния (# – $p < 0.005$; $n \geq 8$); Д – результаты оценки размеров очага повреждения мозговой ткани по данным гистохимического исследования на 14-е сутки после внутричерепного кровоизлияния (## – $p < 0.05$ по сравнению с группой контроля; $n = 5$, ANOVA по рангам, критерий Данна). Данные представлены в виде медиана (25%; 75%).

«Аналогичные результаты были получены и при гистологическом исследовании головного мозга крыс: площадь повреждения головного мозга в группе кМСК10х была значительно меньше – 3.9% (2.6%; 4.2%), чем в контрольной группе» [Ткачук и др., 2023] – 9.8% (6.6%; 13.4%) ($p = 0.023$; $n = 5$) (Рисунок 3.47).

В группе препарата сравнения «Церебролизин», где в область кровоизлияния экспериментальным животным вводили коммерческий пептидный препарат «Церебролизин», наблюдали несколько лучшее восстановление неврологических показателей по сравнению с таковыми для контрольной группы, однако, к существенному улучшению выживаемости экспериментальных животных (Рисунок 3.47) и уменьшению объема повреждения головного мозга по данным МРТ 125.7 (102.6; 188.2) мм³ введение данного препарата не привело. Результаты по группе чМСК10х получены ранее и приведены в составе рисунков 3.47 и 3.48 для оценки видоспецифичности эффекта секрета МСК.

Уменьшение размера очага поражения при введении секрета крыс кМСК10х также коррелировало со снижением окрашивания антителами к CD68 на срезах мозга крыс: 5.6% (1.1%; 7.7%) ($p = 0.005$ для кМСК10х по сравнению с чМСК10х; $n \geq 9$) (Рисунок 3.48). Площадь окрашивания на маркеры противовоспалительной M2-микроглии CD163 в срезах головного мозга крыс кМСК10х достоверно не отличалась от других групп: 5.3% (2.2%;

5.5%) ($p = 0.06$; $n \geq 8$) (Рисунок 3.48). В группе «Церебролизин» наблюдалась тенденция к увеличению площади окрашивания антителами к маркеру провоспалительной M1-микроглии CD68: 8.6% (5.1%; 11.7%), и снижению окрашивания на маркеры противовоспалительной M2-микроглии CD163: 4.1% (1.2%; 5.7%) по сравнению с группой контроля, однако выявленные различия были статистически недостоверны (Рисунок 3.48).

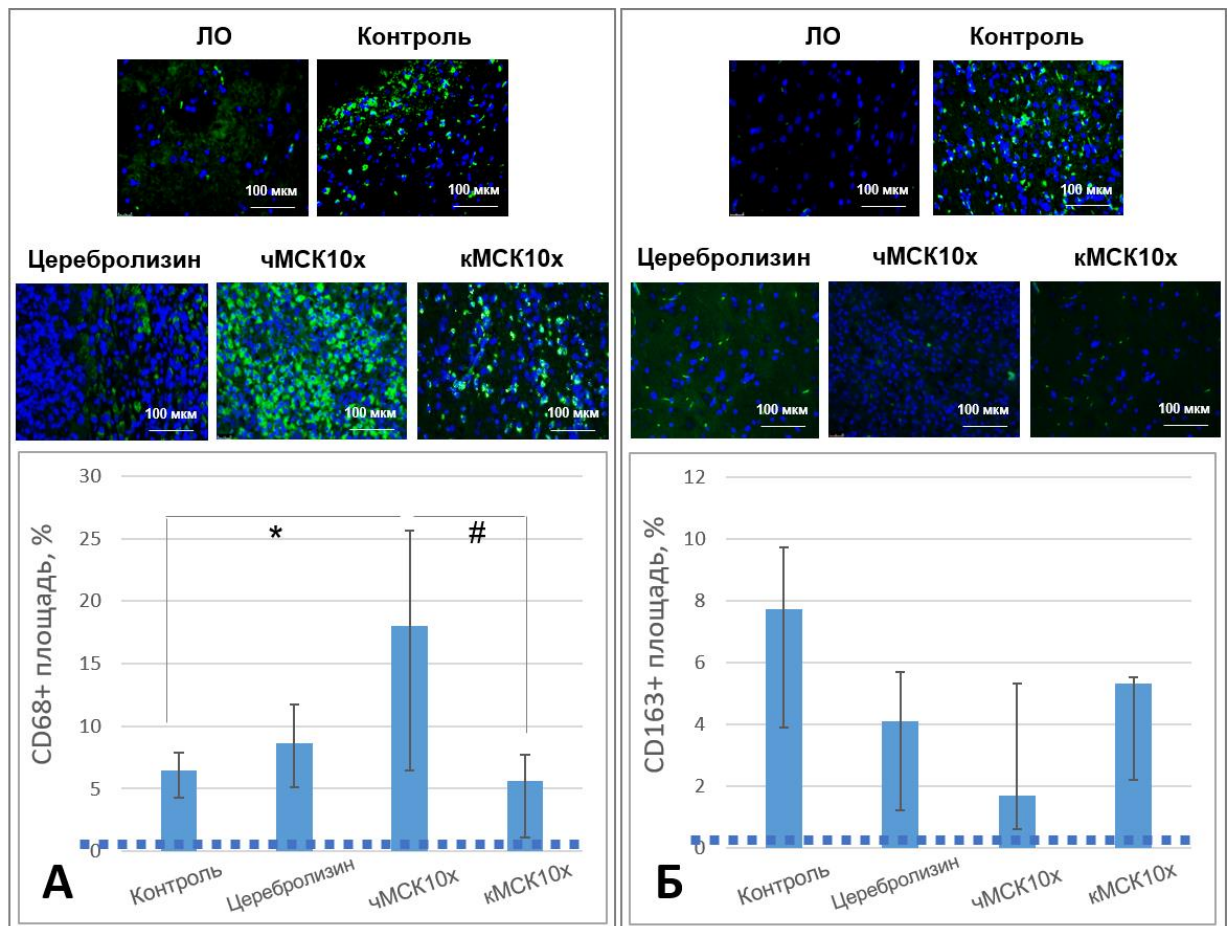


Рисунок 3.48 - Результаты иммуногистохимического окрашивания срезов головного мозга на 14-е сутки после внутримозгового кровоизлияния и введения аллогенного кМСК10х: А – иммуноокрашивание на CD68; Б - иммуноокрашивание на CD163. На фотографиях: зеленое окрашивание соответствует окрашиванию CD68 или CD163; синее окрашивание соответствует ядрам клеток. На диаграммах: синяя пунктирная линия соответствует объему/площади очага поражения головного мозга у животных из группы ЛО. Данные представлены в виде медиана (25%; 75%). * – $p < 0.05$, $n \geq 9$; # – $p = 0.005$, $n \geq 9$ (ANOVA по рангам, критерий Данна).

В ходе исследования было установлено, что аллогенный секретом (как и ксеногенный) также обладает ярко выраженным нейропротективным эффектом, стимулирует выживаемость экспериментальных животных и снижает тяжесть неврологических нарушений, однако, в противоположность ксеногенному не вызывает активацию воспалительных реакций в очаге повреждения и способствует его уменьшению по данным МРТ и гистологического исследования, по-видимому, благодаря содержанию в нем молекул с нейропротективной, антиапоптотической и проангиогенной активностью и воздействию на ключевые звенья процесса повреждения и регенерации мозговой ткани. Полученные данные подтвердили, что аллогенный секретом МСК может служить «платформой для разработки перспективных лекарственных кандидатов для стимуляции нейропротекции и регенерации ткани мозга после его повреждения. Полученные данные указывают на то, что выраженная активация процессов воспаления в очаге повреждения» [Primak et al., 2024a; Karagyaur et al, 2021] при введении ксеногенного секрета МСК обусловлена его видоспецифичными компонентами (предположительно, везикулярной фракцией), а также на то, что при исследовании активности и безопасности перспективных биомедицинских препаратов на ксеногенных моделях следует принимать во внимание развитие возможных иммунологических реакций, которые могут исказить результаты исследования. Результаты тестирования нейропротективной и прорегенераторной активности аллогенного и ксеногенного секретомов МСК в модели интрацеребральной посттравматической гематомы являются оригинальными и получены впервые.

3.6.3 Изучение зависимости нейропротективной и прорегенераторной активности секрета МСК от пути введения в модели интрацеребральной посттравматической гематомы

Поскольку проведенные исследования выявили у секрета МСК ярко выраженную нейропротективную активность в модели интрацеребральной

посттравматической гематомы (даже более выраженную, чем зарегистрированный препарат сравнения «Церебролизин»), а сама проблема повреждения мозговой ткани представляет собой нерешенную медико-социальную проблему, мы предположили, что секретом МСК может послужить основой для разработки лекарственного кандидата для стимуляции нейропротекции и регенерации нервной ткани после повреждения. В рамках доклинического исследования потенциального лекарственного кандидата необходимо установить зависимость его активности от пути введения, дозы, кратности и т.п.

При изучении зависимости нейропротективной и прорегенераторной активности секрета МСК от пути введения в модели интрацеребральной посттравматической гематомы было установлено, что «секретом МСК сохраняет свою нейропротекторную активность даже при внутривенном и интраназальном введении» [Dzhauari et al, 2023; Джауари, 2024]. В этих экспериментальных группах животных мы наблюдали меньшую тяжесть неврологических нарушений, индуцированных кровоизлиянием, чем в контрольной группе, где среду кондиционирования МСК (DMEM-LG) вводили внутривенно (Рисунок 3.49), «хотя статистически значимой разницы из-за небольшого размера выборки обнаружить не удалось» [Dzhauari et al, 2023; Джауари, 2024].

«Внутривенное и интраназальное введение секрета МСК, сконцентрированного в 10 раз, уменьшало объем поражения в 2 и 1.3 раза» [Dzhauari et al, 2023; Джауари, 2024] – до 108 (75; 172) и 173 (147; 175) мм³, соответственно, по сравнению с группой контроля (внутривенное введение DMEM-LG), где средний объем очага повреждения составил 218 (201; 233) мм³ (Рисунок 3.49). Более того, «по данным МРТ и гистологического исследования, внутривенное введение секрета МСК обеспечивает более выраженный нейропротекторный эффект секрета МСК, чем при его введении непосредственно в очаг кровоизлияния» [Karagyaour et al, 2021].

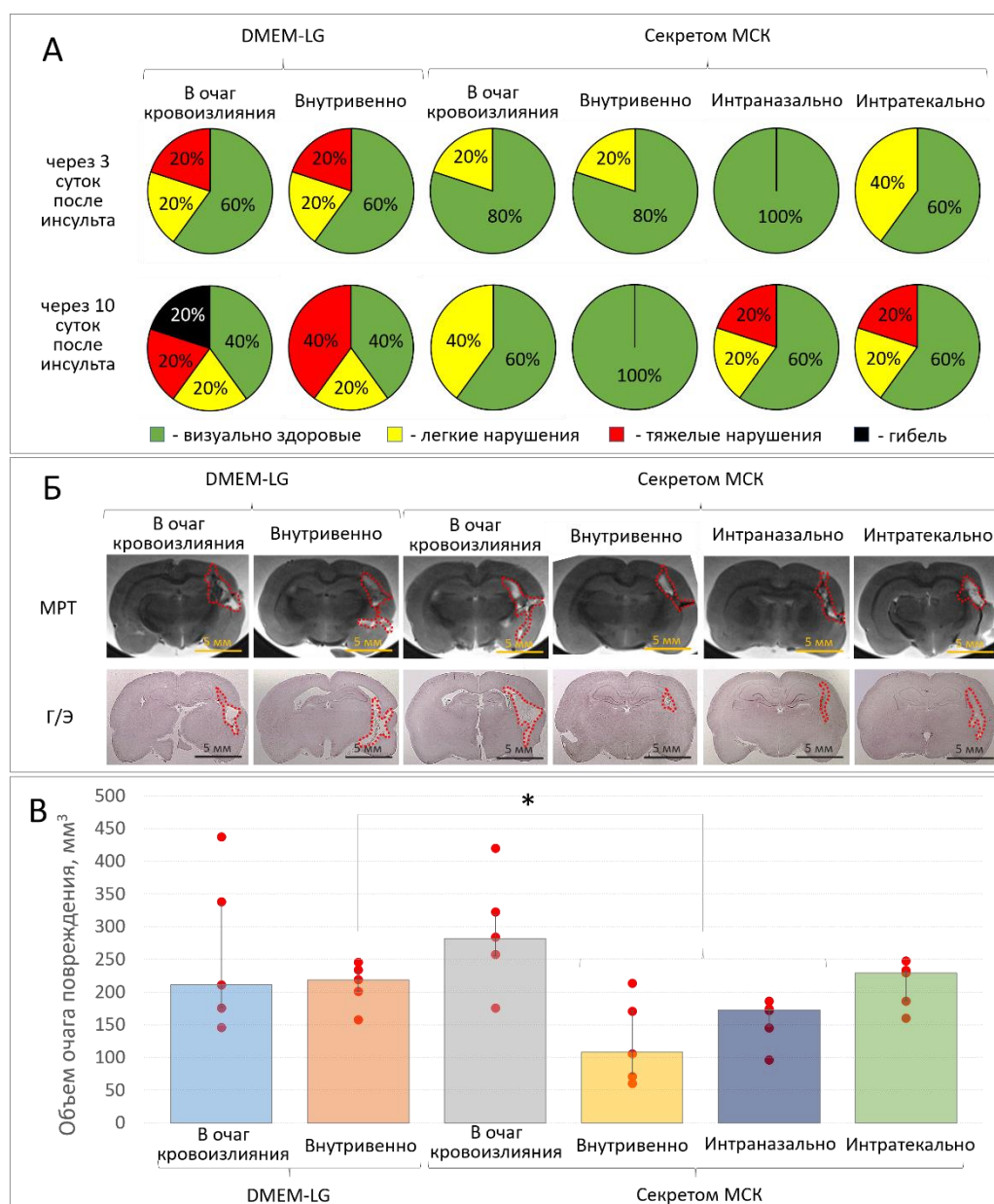


Рисунок 3.49 - Результаты *in vivo* исследования нейропротекторной активности секрета МСК, сконцентрированного в 10 раз, при различных путях введения (в очаг кровоизлияния, внутривенно, интраназально, инtrateкально) на модели интрацеребральной посттравматической гематомы у крыс: А – тяжесть неврологических дефицитов у экспериментальных животных через 3 и 10 суток после моделирования кровоизлияния; Б – образцы очагов поражения головного мозга через 14 суток после моделирования кровоизлияния (МРТ, гистохимическое окрашивание), г/э – гематоксилин/эозин; В – количественная оценка объема поражения головного мозга по данным МРТ. Данные представлены в виде медианы (25%; 75%). * – $p < 0.05$, $n = 5$ (ANOVA по рангам, критерий Данна).

«По-видимому, это связано с постепенным поступлением компонентов секрета из кровотока в очаг повреждения и, как следствие, с меньшей активацией клеток микроглии в зоне повреждения (или, возможно, с другим, пока неустановленным механизмом). Интратекальное введение секрета МСК не привело к уменьшению объема очага поражения» [Karagyaur et al, 2021] или уменьшению тяжести неврологических нарушений. Результаты гистологического исследования согласуются с результатами МРТ (Рисунок 3.49).

Согласно полученным данным, «внутривенное и интраназальное введение секрета МСК человека стимулирует нейропротекцию ткани головного мозга на модели внутримозгового кровоизлияния и не приводят к увеличению объема очага поражения по сравнению с внутримозговым введением секрета (ксеногенного)» [Karagyaur et al, 2021]. «По-видимому, это связано с тем, что потенциально иммуногенные компоненты секрета человека при внутривенном/интраназальном введении оказывают не одновременное, а постепенное и ограниченное действие на иммунокомпетентные клетки (микроглию) головного мозга» [Karagyaur et al, 2021]. Нельзя исключить, что потенциальная иммуногенность компонентов секрета при внутривенном и интраназальном введении компенсируется наличием в секрете МСК противовоспалительных молекул (TGF β , IL-10, IL-13 и др.) [Bruno et al, 2015; Rubtsov et al, 2017].

Механизм нейропротекторной активности секрета МСК при внутривенном введении установлен не был. Однако, зная, что в состав секрета входят нейропротективные, противовоспалительные и антиапоптотические молекулы и молекулярные комплексы, можно предположить, что он обусловлен прямым нейропротекторным действием на нервные клетки или подавлением нейровоспаления, которое является одним из основных факторов вторичного повреждения головного мозга после внутримозгового кровоизлияния.

Ряд исследований косвенно подтверждают гипотезу прямой нейропротекции мозговой ткани в очаге повреждения в модели интрацеребральной посттравматической гематомы: они показывают, что некоторые белки [Mayhan et al, 1999; Suzuki et al, 2016; Hayes et al, 2021; Jodeiri et al, 2021] и молекулярные комплексы (микровезикулы) [Rufino-Ramos et al, 2017; Davis et al, 2021] способны проникать через гематоэнцефалический барьер, обеспечивая нейропротекцию и улучшая восстановление мозговой ткани после инсульта. Более того, показано, что проницаемость гематоэнцефалического барьера может повышаться в условиях кровоизлияния или локальной ишемии [Nadeau et al, 2019; Bernardo-Castro et al, 2020], что может привести к увеличению поступления нейропротекторных молекул в место повреждения. В ряде исследований установлена корреляция между повышенными концентрациями факторов роста и нейропротекторных микроРНК в сыворотке крови пациентов с инсультом и их лучшей выживаемостью и неврологическим исходом [Zhang et al, 2017; Luan et al, 2019; Sobrino et al, 2020; Roslavtceva et al, 2020; Kadir et al, 2022; Hazelwood et al, 2022]. Является ли высокая концентрация этих молекул в плазме крови следствием повреждения мозговой ткани или конститутивной особенностью таких пациентов (и врожденным механизмом эндогенной нейропротекции), еще предстоит установить.

Известно, что аллогенный секретом МСК способен подавлять активацию Т-лимфоцитов и моноцитарно-макрофагальных клеток [Bruno et al, 2015; Rubtsov et al, 2017; Lu D et al, 2021], и нельзя исключить, что противовоспалительная активность секрета МСК может опосредовать непрямую нейропротекцию ткани головного мозга. Предположительно, секретом МСК при внутривенном введении может повышать порог активации Т-клеток и моноцитов/макрофагов, что подавляет их рекрутирование в очаг кровоизлияния и предотвращает прогрессирование нейровоспаления и вторичного повреждения. Механизмы нейропротекторной активности

циркулирующих факторов роста при острых нарушениях мозгового кровообращения еще не установлены.

Одним из широко используемых путей введения лекарств при патологиях нервной системы является интратекальное введение (в спинномозговой канал) [Nagoshi et al, 2020; Fakhri et al, 2021]. В данном исследовании интратекальное введение секрета МСК, вопреки ожиданиям, не обеспечило статистически достоверного уровня нейропротекции головного мозга на модели интрацеребральной посттравматической гематомы. По-видимому, это связано с рострально-каудальным направлением тока ликвора [Lloyd et al, 2020] и большим расстоянием между местом инъекции (L5-S1) и очагом кровоизлияния, в результате чего нейропротективные компоненты секрета не достигли очага повреждения в течение эффективного временного терапевтического окна. С высокой вероятностью этот путь введения может быть эффективно использован для лечения острых и хронических повреждений спинного мозга [Shoichet et al, 2007; Nagoshi et al, 2020; Fakhri et al, 2021]. Результаты оценки нейропротективной и прорегенераторной активности секрета МСК в зависимости от пути введения в модели интрацеребральной посттравматической гематомы являются оригинальными и получены впервые.

3.6.4 Изучение зависимости нейропротективной и прорегенераторной активности секрета МСК от времени его введения в модели интрацеребральной посттравматической гематомы (определение временного терапевтического окна)

Поскольку известно, что эффективность нейропротекции ткани головного мозга после ее острых повреждений во многом зависит от времени начала лечения [Fonarow et al, 2011; Hawkes et al, 2018] необходимо было установить зависимость нейропротективной и прорегенераторной активности секрета МСК от времени его введения (временное терапевтическое окно) в модели интрацеребральной посттравматической гематомы. Изучение

временного терапевтического окна важно не только для оценки терапевтического потенциала секретома МСК, как потенциального лекарственного кандидата, но и для разграничения его нейропротективной и прорегенераторной активности. Эффект, реализуемый в интервале до 6 часов после моделирования повреждения, наиболее вероятно обусловлен прямой нейропротективной активностью секретома, а эффект, наблюдаемый после 6 часов – в большей степени обусловлен его способностью стимулировать процессы регенерации. Для оценки зависимости нейропротективной и/или прорегенераторной активности секретома МСК от времени его введения изучали интервалы продолжительностью 1, 3 и 6 ч после моделирования интрацеребральной посттравматической гематомы для путей введения секретома МСК, оказавшихся наиболее эффективными по данным предыдущего этапа исследования: внутривенного и интраназального.

Наилучший нейропротективный «эффект наблюдался при внутривенном введении секретома МСК, сконцентрированного в 10 раз, через 1 ч после моделирования интрацеребрального кровоизлияния» [Dzhauari et al, 2023]: у всех пяти подопытных животных этой группы на протяжении всего эксперимента (14 суток) не наблюдалось признаков неврологических нарушений (Рисунок 3.52), а средний объем очага повреждения головного мозга составил 86 (62; 109) мм³ (Рисунок 3.52).

В группе «Контроль» (внутривенное введение DMEM-LG) не менее, чем у 2 животных за период наблюдения наблюдались неврологические нарушения, а средний объем очага повреждения головного мозга составил 205 (189; 232) мм³ ($p < 0.05$; $n = 5$). Увеличение временного интервала введения секретома МСК после моделирования кровоизлияния (1ч->3ч->6ч) снижало его нейропротекторную активность. «Так, объем очага повреждения головного мозга в группах с внутривенным введением секретома МСК, сконцентрированного в 10 раз, через 3 и 6 ч после моделирования кровоизлияния достигал 168 (162; 203) и 216 (203; 224) мм³, соответственно» [Dzhauari et al, 2023; Джауари, 2024], и достоверно не отличался от такового в

группе контроля. Нейропротекторная активность секретомы МСК у крыс при интраназальном введении также снижалась с увеличением времени воздействия до 1-6 ч и достоверно не отличалась от таковой в контрольной группе. Результаты гистологического исследования совпали с данными МРТ-исследования (Рисунок 3.50).

Полученные результаты соответствуют имеющимся литературным данным о так называемом золотом часе – периоде времени (~60 мин) после инсульта, когда эффективность нейропротекции максимальна [Kim K et al, 2022], и с данными о снижении эффективности нейропротекции с увеличением интервала между кровоизлиянием и началом терапевтического воздействия [Shoichet et al, 2007; Fonarow et al, 2011; Kim K et al, 2022].

Полученные результаты свидетельствуют о наличии у секретомы МСК истинной нейропротективной активности в *in vivo* модели интрацеребральной посттравматической гематомы у крыс даже при внутривенном введении. Это подтверждается наличием зависимости терапевтической эффективности секретомы МСК от времени его введения после моделирования интрацеребральной гематомы: максимальный эффект через 1 час после моделирования кровоизлияния и постепенное снижение эффективности к 6 часам, поскольку такой кратковременный терапевтический эффект можно объяснить только прямой защитой мозговой ткани и повышением ее устойчивости к токсическому действию компонентов крови, метаболитов, активных форм кислорода и избытка нейромедиаторов в очаге повреждения.

Результаты зависимости нейропротективной и прорегенераторной активности секретомы МСК от времени его введения в модели интрацеребральной посттравматической гематомы являются оригинальными и получены впервые.

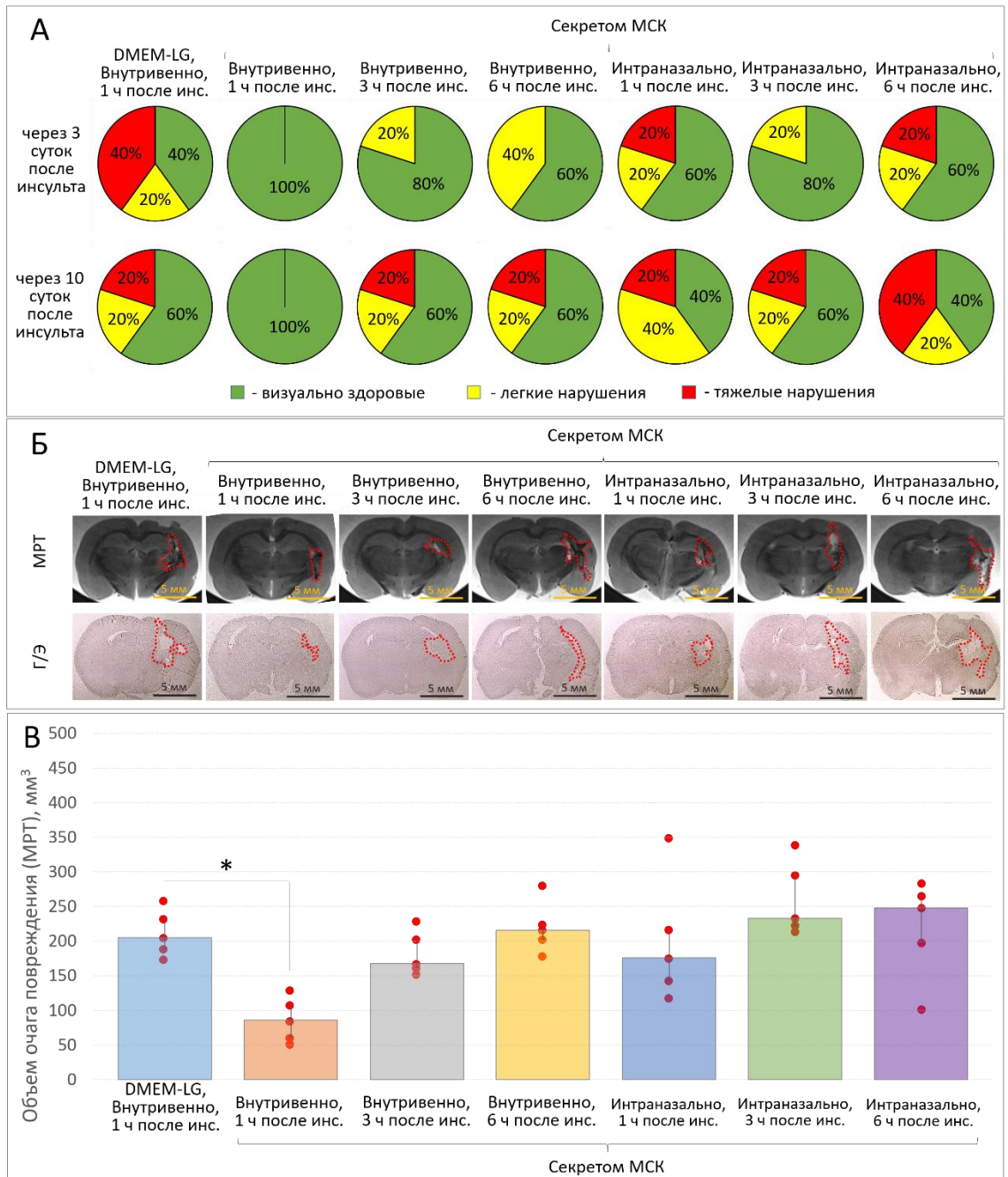


Рисунок 3.50 - Результаты оценки зависимости нейропротективной и прорегенераторной активности секрета МСК от времени его введения (1, 3 и 6 ч после моделирования кровоизлияния) в модели интрацеребральной посттравматической гематомы: А – выраженность неврологического дефицита у экспериментальных животных через 3 и 10 суток после моделирования интрацеребральной посттравматической гематомы; Б – образцы очагов поражения головного мозга через 14 суток после моделирования кровоизлияния (МРТ, гистохимическое окрашивание), г/э – гематоксилин/эозин; В – количественная оценка объема очага повреждения головного мозга по данным МРТ. Данные представлены в виде медианы (25%; 75%). * - $p \leq 0.001$, $n = 5$ (ANOVA по рангам, критерий Данна).

«Поскольку наибольшая нейропротекторная активность секрета МСК наблюдалась при его внутривенном введении через 1 ч после моделирования внутримозгового кровоизлияния, такое сочетание» [Dzhauari et al, 2023] пути введения и времени от момента моделирования кровоизлияния до начала лечения использовали при титровании дозы, изучении эффективности курсового лечения, оценке нейропротекторной активности секрета МСК у старых крыс и др.

3.6.5 Изучение зависимости нейропротективной и прорегенераторной активности секрета МСК от дозы в модели интрацеребральной посттравматической гематомы

Как уже ранее было установлено (раздел 3.6.1), эффективность и токсичность биомедицинских композиций (в т.ч. и секрета МСК) зависит не только от их состава, но и от соотношения и концентрации этих молекул в составе таких композиций, поэтому важным аспектом в изучении нейропротективных «свойств секрета МСК стало установление его оптимальной «дозировки», т.е. той концентрации секрета МСК, которая проявляет наибольшую нейропротекторную активность при введении в постоянном объеме (внутривенное введение, 100 мкл).

Нормализацию состава секрета МСК проводили по одному из основных нейропротекторных компонентов секрета – BDNF (мозговой нейротрофический фактор). Для неконцентрированного секрета МСК (1х) концентрации BDNF находятся в пределах 3 ± 1.2 нг/мл ($n = 3$). Для образцов секрета МСК, концентрированных в 5, 10, 25 и 50 раз (5х, 10х, 25х, 50х соответственно), концентрация BDNF достигала 15 нг/мл, 30 нг/мл, 75 нг/мл и 150 нг/мл, соответственно» [Dzhauari et al, 2023; Джауари, 2024]. В этом исследовании в качестве контрольной группы мы использовали среду DMEM-LG, сконцентрированную в 50 раз.

«Исследование показало, что секретом МСК, сконцентрированный в 5, 10, 25 и 50 раз, оказывает нейропротекторное действие и снижает выраженность неврологических нарушений у прооперированных крыс по сравнению с контрольной группой, хотя наблюдаемые различия не являются статистически значимыми (по причине небольшой выборки). По данным МРТ-исследования наибольший нейропротекторный эффект оказывал секретом МСК, сконцентрированный в 5 и 10 раз» [Dzhauari et al, 2023; Джауари, 2024].

«Так, внутривенное введение секрета МСК, сконцентрированного в 5 и 10 раз, через 1 ч после моделирования интрацеребральной посттравматической гематомы уменьшало объем очага повреждения головного мозга до 113 (93; 124) мм³ и 156 (104; 172) мм³, соответственно, при среднем объеме очага повреждения в 229 (199; 359) мм³ в контрольной группе. Неконцентрированный 1х секретом МСК не выявил значимого нейропротекторного действия, что согласовывалось с полученными ранее данными [Karagaur et al, 2021]. Секретом МСК, сконцентрированный в 25 и 50 раз, наоборот, увеличивал объем поражения головного мозга до 299 (277; 330) мм³ и 347 (215; 474) мм³, соответственно» [Dzhauari et al, 2023; Джауари, 2024].

Результаты гистологического исследования совпали с данными МРТ-исследования (Рисунок 3.51). Для дальнейших исследований мы использовали секретом МСК, сконцентрированный в 10 раз, поскольку эта степень концентрирования секрета МСК проявляет наиболее выраженную нейропротекторную активность в отношении ткани головного мозга в модели интрацеребральной посттравматической гематомы у крыс.

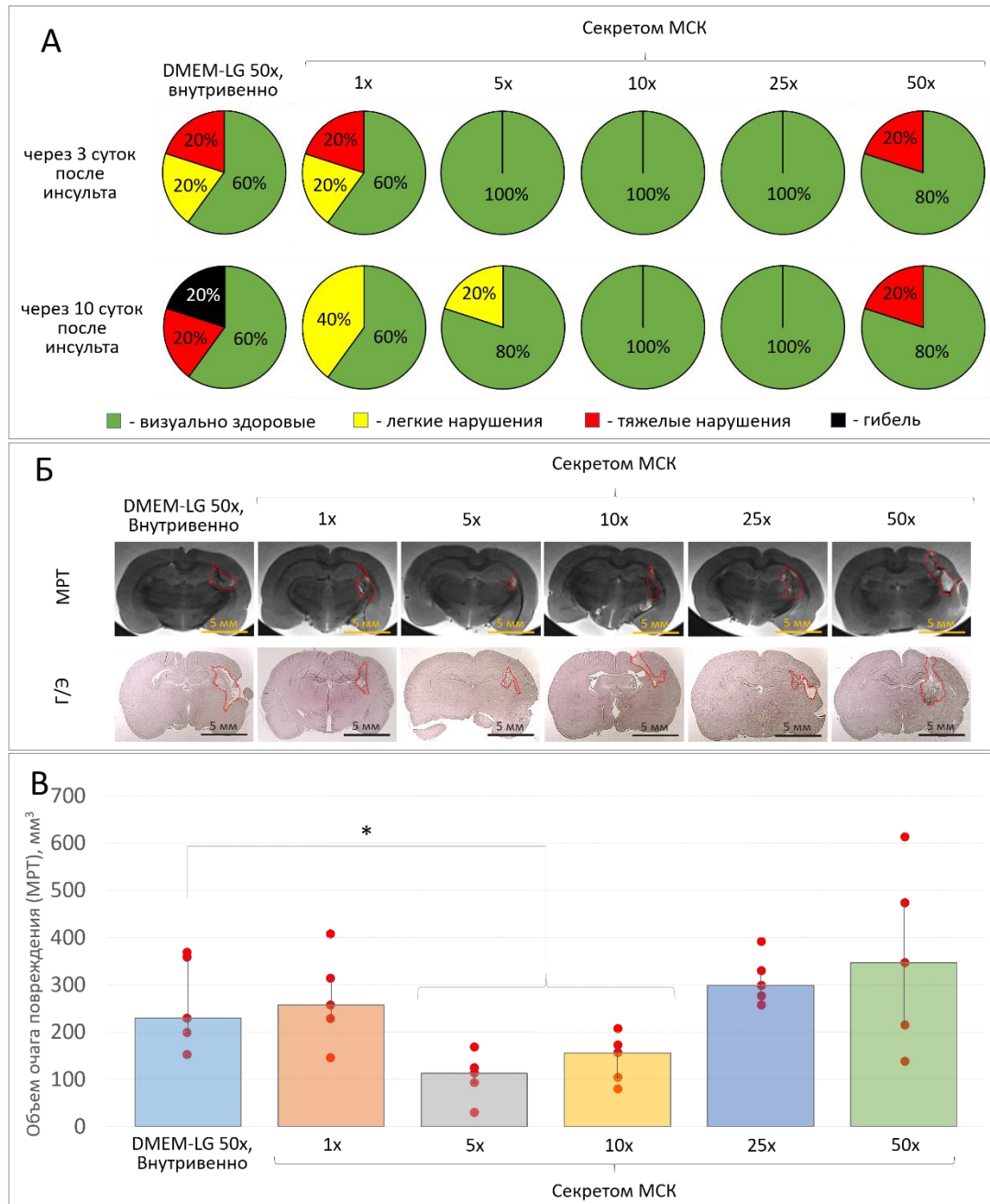


Рисунок 3.51 - Результаты исследования зависимости нейропротективной и прорегенераторной активности секрета МСК от дозы в модели интрацеребральной посттравматической гематомы при внутривенном введении через 1 ч после моделирования кровоизлияния у крыс: А – выраженность неврологического дефицита у экспериментальных животных через 3 и 10 суток после моделирования кровоизлияния; Б – образцы очагов поражения головного мозга через 14 суток после моделирования кровоизлияния (MPT, гистохимическое окрашивание), г/э – гематоксилин/эозин; В – количественная оценка объема поражения головного мозга по данным MPT. Данные представлены в виде медианы (25%; 75%). * – $p < 0.05$, $n = 5$ (ANOVA по рангам, критерий Данна).

Таким образом, был установлен диапазон нейротрофической активности секрета МСК при лечении внутримозговых кровоизлияний у крыс: неконцентрированный секретом МСК (1х) не оказывает эффекта, а секретом МСК, сконцентрированный в 5 и 10 раз, оказывает нейропротективный эффект. Концентрирование секрета МСК в 25 раз не улучшает эффективность нейропротекции мозговой ткани (достигает эффекта «плато»), а секретом МСК, сконцентрированный в 50 раз, наоборот, по-видимому, проявляет токсические свойства.

Предположительно, наблюдаемая дозозависимость наблюдаемого нейропротективного и токсического эффекта секрета МСК определяется концентрацией «факторов роста, нейротрофинов или цитокинов, действующих в достаточно узком терапевтическом диапазоне. Так, ранее было показано, что избыток нейротрофических факторов (или преобладание их незрелых форм) приводит к передаче сигнала через альтернативный рецептор p75NTR и к апоптозу нервных клеток вместо их нейропротекции [Meeker et al, 2015; Fleitas et al, 2018]. Подобная зависимость (увеличение эффективности с дозой, достижение "плато", токсический эффект) от введения разных доз МСК или их секрета неоднократно наблюдалась на других моделях и других путях введения» [Dzhauari et al, 2023; Джауари, 2024; Kim et al, 2012; Pawitan et al, 2014; Shi L et al, 2022], что свидетельствует в пользу универсальности этого явления.

Роль некоторых компонентов секрета, определяющих токсическое действие при передозировке, а также механизмы этого явления до сих пор не установлены; однако мы не исключаем, что в его основе лежит избыток ростовых (нейротрофических) факторов или чрезмерная стимуляция иммунной системы реципиента. Примечательно, что среда DMEM-LG (Контрольная группа), сконцентрированная в 50 раз, не оказала значимого влияния (стимулирующего или ингибирующего) на нейропротекцию и регенерацию ткани головного мозга в модели интрацеребральной посттравматической гематомы при аналогичной схеме введения. Это

указывает на то, «что наблюдаемые нейропротекторные и токсические эффекты обусловлены специфическим действием определенных компонентов секрета МСК» [Dzhauari et al, 2023]. Очевидно, что при переходе в клиническую практику потребуется дополнительное определение эффективной, достаточной и безопасной дозы потенциального лекарственного кандидата на основе секрета МСК в организме человека, и полученные данные могут служить основой для планирования такого исследования. Результаты оценки зависимости нейропротективной, прорегенераторной и токсической активности секрета МСК от его дозы в модели интрацеребральной посттравматической гематомы крыс являются оригинальными и получены впервые.

3.6.6 Изучение зависимости нейропротективной и прорегенераторной активности секрета МСК от кратности применения в модели интрацеребральной посттравматической гематомы

Согласно данным литературы [Lok et al, 2011; Wilkinson et al, 2018; Shao et al, 2019; Kuriakose et al, 2020], «патогенез острого повреждения головного мозга (острые нарушения мозгового кровообращения, травмы и т.п.) растянут во времени и приводит ко вторичному повреждению тканей головного мозга» [Primak et al., 2024a] за счет активации микроглии и персистенции повреждающих факторов. Учитывая это, можно попытаться разграничить прямую нейропротективную (активность менее 6 часов после моделирования кровоизлияния) и непрямую нейропротекцию вместе с прорегенераторной активностью (активность после 6 часов после моделирования кровоизлияния) секрета МСК.

Если отсроченное или повторное введение секрета МСК позволит смягчить негативное воздействие повреждающих факторов на ткань головного мозга и предотвратить ее вторичное повреждение, это будет свидетельствовать о том, что секретом МСК обладает непрямой нейропротективной и прорегенераторной активностью. Для этого была

изучена зависимость нейропротективной и прорегенераторной активности секрета МСК от кратности применения в модели интрацеребральной посттравматической гематомы. В результате проведенного исследования было показано, что повторное применение секрета МСК (внутривенное введение через 1, 48, 96 и 144 ч после моделирования внутримозгового кровоизлияния) снижало выраженность неврологического дефицита по сравнению с контрольными крысами, получавшими лечение DMEM-LG (хотя статистически значимой разницы не наблюдалось) (Рисунок 3.52), а также значительно уменьшало объем повреждения головного мозга по данным МРТ. Так, крысы, получившие повторные инъекции секрета МСК (4 инъекции), имели средний объем повреждения головного мозга 36 (33; 77) мм³, тогда как в контрольной группе он составлял 198 (146; 207) мм³, а у крыс после однократного введения секрета МСК – 122 (105; 177) мм³ (различия между каждой парой групп достоверны, $p < 0.05$, $n \geq 4$, ANOVA по рангам: критерий Данна) (Рисунок 3.52).

В ходе эксперимента некоторых животных содержали в течение 22 суток после последнего введения секрета МСК в рамках его курсового применения (в общей сложности 28 суток с момента моделирования внутримозгового кровоизлияния) для мониторинга возможных отсроченных негативных побочных эффектов применения секретом МСК. Результаты настоящего исследования не выявили негативных отдаленных побочных эффектов введения секрета МСК экспериментальным животным.

В то же время неврологический дефицит и объем повреждения головного мозга (по данным МРТ) у этих крыс достоверно не отличались от таковых у крыс, повторно обработанных секретом МСК и умерщвленных через 14 суток после моделирования внутримозгового кровоизлияния, и были достоверно снижены по сравнению с таковыми из группы контроля (Рисунок 3.52). Результаты гистологического исследования совпали с данными МРТ-исследования (Рисунок 3.52).

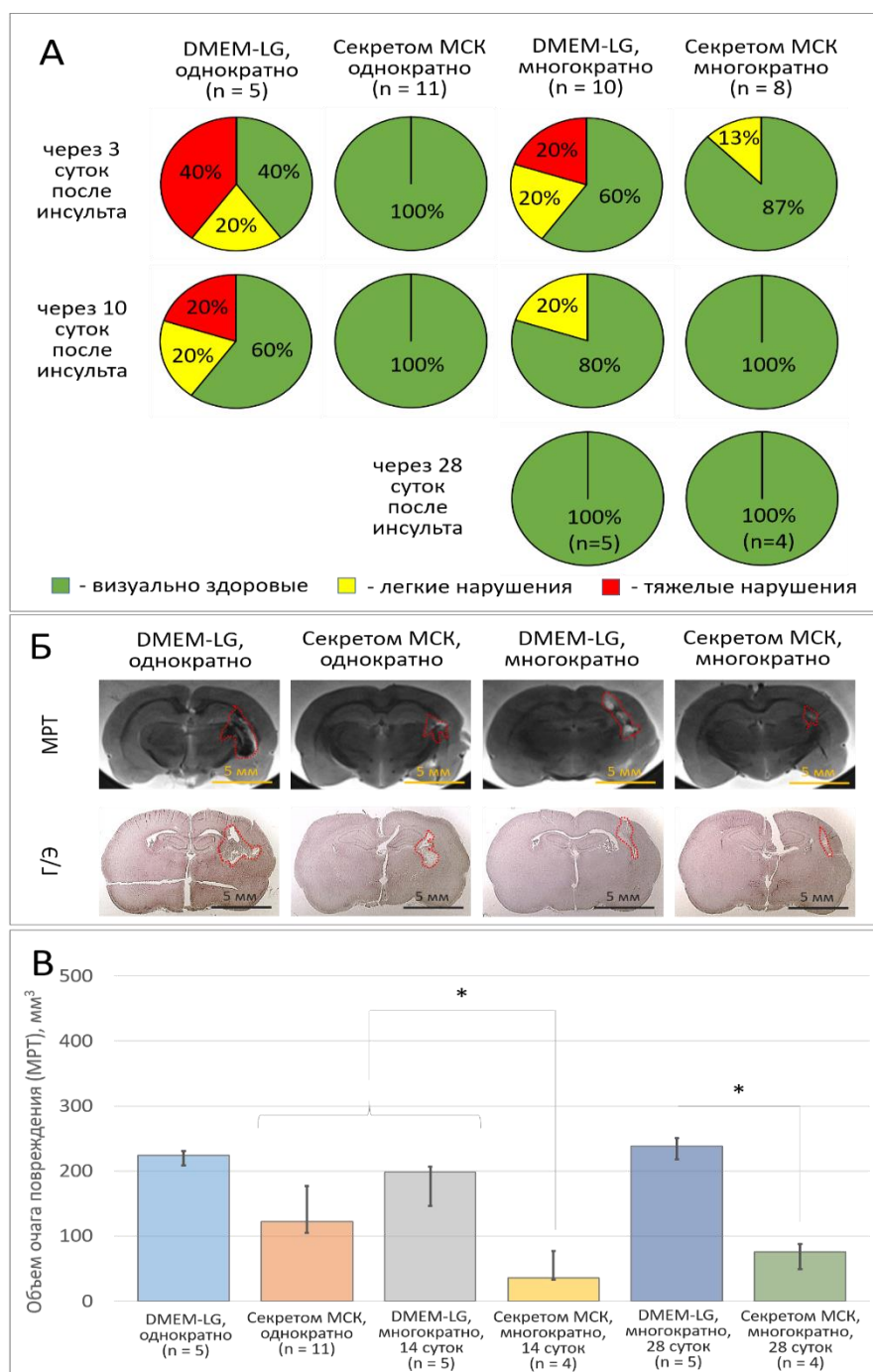


Рисунок 3.52 - Результаты оценки зависимости нейропротективной и прорегенераторной активности секрета МСК (10x секретом МСК) от кратности его внутривенного введения в модели интрацеребральной посттравматической гематомы крыс: А – выраженность неврологического дефицита у экспериментальных животных через 3, 10 и 28 суток после моделирования кровоизлияния; Б – образцы очагов повреждения головного мозга через 14 суток после моделирования кровоизлияния (МРТ, гистохимическое окрашивание), г/э – гематоксилин/эозин; В – количественная оценка объема поражения головного мозга по данным МРТ. Данные представлены в виде медианы (25%; 75%). * - $p < 0.05$ (ANOVA по рангам, критерий Данна).

Полученные данные позволяют утверждать, что секретом МСК способен оказывать непрямую нейропротекцию и стимулировать процессы регенерации, подавлять нейровоспаление и вторичное повреждение мозговой ткани в отсроченном периоде. Нейропротективная активность секретома МСК, наблюдаемая при введении и через 48, 96 и 144 ч после моделирования внутримозгового кровоизлияния, подтверждает тот факт, что патогенез внутримозговых кровоизлияний и других повреждений мозга растянут во времени. «Также этот факт расширяет наше понимание патогенеза острых повреждений головного мозга и демонстрирует, что посредством воздействия на ряд сигнальных каскадов и нейровоспаление, и вторичное повреждение мозговой ткани могут быть подавлены» [Primak et al., 2024a], хотя компоненты секретома МСК, ответственные за такой его эффект, еще только предстоит установить. Полученные результаты имеют и многообещающее практическое применение, поскольку демонстрируют способность секретома МСК подавлять вторичное повреждение головного мозга в патогенезе внутримозговых кровоизлияний (и других острых повреждений головного мозга), даже за пределами так называемого «золотого часа инсульта». Это значительно удлиняет временное терапевтическое окно для начала лечения таких патологий и «подсвечивает» новые потенциальные мишени для патогенетической терапии острых повреждений мозговой ткани. Данные о том, что секретом МСК (при внутривенном введении) обладает способностью препятствовать развитию нейровоспаления и вторичного повреждения в отсроченном периоде, являются новыми и получены впервые.

3.6.7 Изучение зависимости нейропротективной и прорегенераторной активности секретома МСК от возраста экспериментальных животных в модели интрацеребральной посттравматической гематомы

Различные формы цереброваскулярных заболеваний (в том числе инсульт) чаще всего возникают у людей в зрелом возрасте и часто связаны с

ожирением, метаболическими или сердечно-сосудистыми нарушениями. Поскольку эффективность процессов нейропротекции и нейрогенерации в молодом и зрелом организме может различаться по целому ряду причин (биохимический состав крови, особенности проницаемости сосудистой стенки и регенеративного потенциала головного мозга и т.п.), было необходимо выяснить, сохраняет ли секретом МСК свою нейропротекторную активность на модели интрацеребральной посттравматической гематомы у старых крыс с избыточной массой тела (10-11 мес, масса до 560 г). Метаболический статус старых крыс не оценивали; однако, по данным ряда исследований, превышение индекса массы тела крыс более 0.68 г/см^2 связано с изменениями липидного профиля крови и эндокринными нарушениями [Carroll et al, 2006; Novelli et al, 2007].

Результаты исследования подтвердили, что однократное внутривенное введение 100 мкл секрета МСК, сконцентрированного в 10 раз, стимулировало выживание экспериментальных животных и сохранение у них неврологических функций, а также уменьшало объем повреждения головного мозга у крыс в возрасте 10-11 мес (Рисунок 3.53). «Так, объем поражения головного мозга у старых крыс, получивших однократное внутривенное введение секрета МСК (чМСК10х)» [Dzhauari et al, 2023], составил $156 (88; 196) \text{ мм}^3$ против $219 (183; 334) \text{ мм}^3$ в контрольной группе DMEM-LG ($p < 0.05$; $n \geq 8$). Достоверных различий в нейропротективной эффективности секрета МСК между молодыми (3-3.5 мес) (Рисунок 3.52) и старыми (10-11 мес) крысами выявлено не было. Результаты гистологического исследования соответствовали результатам МРТ-исследования (Рисунок 3.53).

Полученные данные позволяют предположить, что патогенез интрацеребрального кровоизлияния у пожилых животных с избыточной массой тела в высокой степени схож с таковым у молодых животных, и что в состав секрета МСК входят молекулы, способные воздействовать на патогенез острого повреждения головного мозга вне зависимости от возраста и метаболического статуса экспериментальных животных.

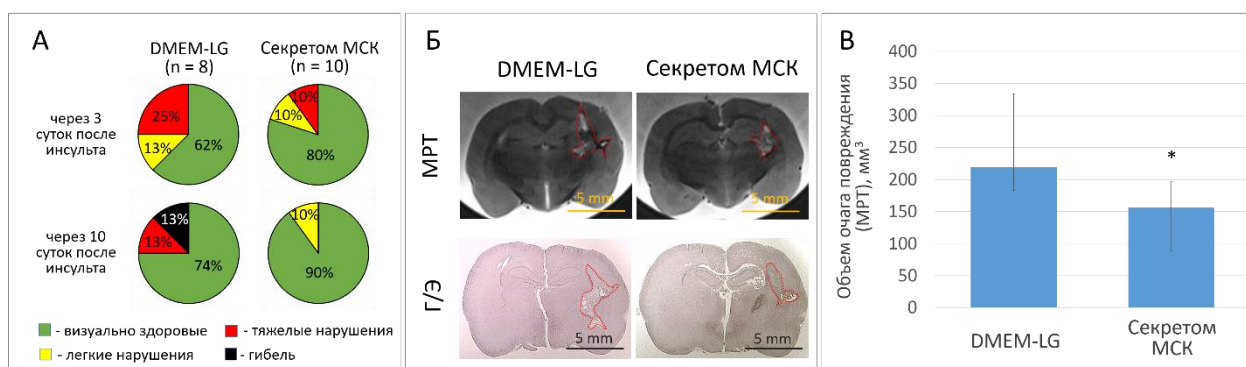


Рисунок 3.53 - Результаты оценки нейропротективной и прорегенераторной активности секретома МСК в модели интрацеребральной посттравматической гематомы на пожилых крысах: А – выраженность неврологического дефицита у экспериментальных животных через 3 и 10 суток после моделирования кровоизлияния; Б – образцы очагов повреждения головного мозга через 14 суток после моделирования кровоизлияния (МРТ, гистохимическое окрашивание), г/э – гематоксилин/эозин; В – количественная оценка объема поражения головного мозга по данным МРТ. Данные представлены в виде медианы (25%; 75%). * – $p < 0.05$ (ANOVA по рангам, критерий Данна).

С практической точки зрения это может означать, что использование секретома МСК может оказаться перспективным терапевтическим подходом для нейропротекции и стимуляции регенерации мозговой ткани после острых черепно-мозговых травм и нарушений мозгового кровообращения, в том числе внутримозговых кровоизлияний, у пациентов пожилого возраста с сопутствующими метаболическими, эндокринными и, возможно, сердечно-сосудистыми нарушениями. Данные результаты являются оригинальными и получены впервые.

3.6.8 Изучение нейропротективной и прорегенераторной активности секретома иммортализованных МСК в модели интрацеребральной посттравматической гематомы

Ввиду полученных данных есть основания полагать, что секретом МСК может представлять собой перспективную платформу для разработки лекарственных кандидатов для нейропротекции и стимуляции регенерации нервной ткани после острых повреждений. В то же время первично выделенные МСК являются неудобным и крайне ограниченным по своим

свойствам объектом для культивирования и получения секрета для терапевтического применения. Это обусловлено целым рядом параметров: недостатком доноров, быстрым старением культуры МСК, гетерогенностью качественного и количественного состава их секрета, а также необходимостью проводить анализ инфекционной безопасности и биологической активности для каждого из образцов.

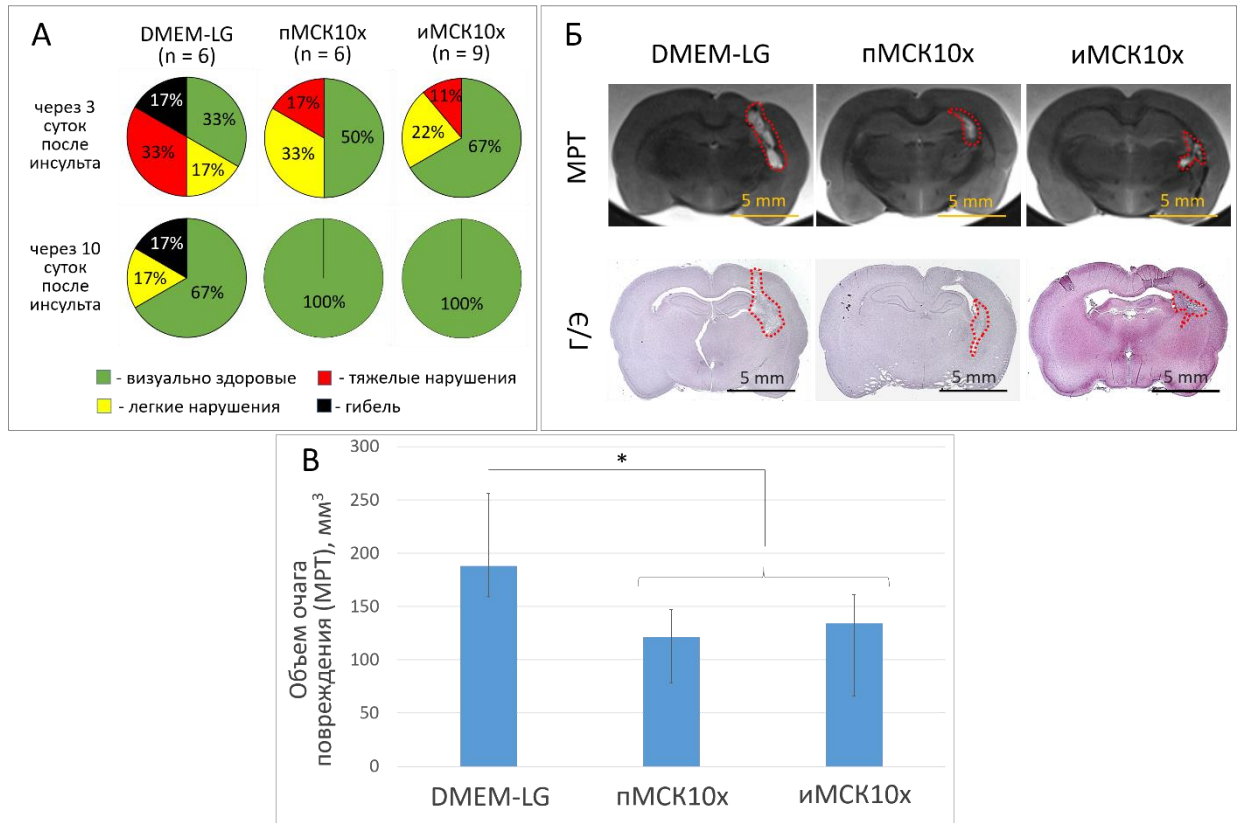


Рисунок 3.54 - Результаты оценки нейропротективной и прорегенераторной активности секрета иммортализованных МСК в модели интрацеребральной посттравматической гематомы крыс: А – выраженность неврологического дефицита у экспериментальных животных через 3 и 10 суток после моделирования кровоизлияния; Б – образцы очагов повреждения головного мозга через 14 суток после моделирования кровоизлияния (МРТ, гистохимическое окрашивание), г/э – гематоксилин/эозин; В – количественная оценка объема поражения головного мозга по данным МРТ. Данные представлены в виде медианы (25%; 75%). DMEM-LG - пустая среда культивирования, пМСК10х - секретом первично выделенных МСК, иМСК10х - секретом иммортализованных МСК человека, * – $p < 0.05$, $n \geq 6$ (ANOVA по рангам, критерий Данна).

Результаты анализа мировой литературы и наших собственных исследований свидетельствуют о том, что реальные перспективы выхода в клиническую практику имеют лишь продукты стандартизованных охарактеризованных клеточных линий, например, иммортализованных МСК. Иммортализация позволяет преодолеть все перечисленные ограничения, а стабильность качественного и количественного состава секрета после иммортализации была подтверждена протеомным анализом и иммуноферментным анализом по ряду факторов роста/цитокинов, а высокий уровень стабильности экспрессии мРНК некоторых из них был подтвержден ПЦР в реальном времени (разделы 3.2.3). Однако, сохраняет ли секретом иммортализованных МСК свои нейропротективные и прорегенераторные свойства оставалось неизвестным.

Проведенное исследование продемонстрировало, что секретом иммортализованных МСК, сконцентрированный в 10 раз (иМСК10х), оказывает такой же выраженный нейропротективный эффект, как и секретом первично выделенных МСК (пМСК10х), и приводит к статистически достоверно лучшей сохранности неврологического статуса и «уменьшению объема повреждения головного мозга (по данным МРТ и гистологического исследования) по сравнению с группой контроля» [Ткачук и др., 2023]. Так, в группе экспериментальных животных, которым вводили секретом иммортализованных МСК средний объем очага повреждения составил 134 (66; 161) мм³, в то время как в группах животных, которым вводили секретом первично выделенных МСК или контрольный образец (DMEM-LG) средний объем очага повреждения составил 121 (78; 147) и 188 (159; 256) мм³, соответственно (Рисунок 3.54) ($p < 0.05$, $n \geq 6$, ANOVA по рангам: критерий Данна).

Полученные данные в совокупности с представленными выше результатами протеомного анализа и иммуноферментного анализа, а также результатами ПЦР в реальном времени позволяют утверждать, что иммортализация культур МСК с помощью повышения экспрессии гена

теломеразы (TERT) позволяет замедлить старение клеточной культуры, однако, практически не оказывает влияния на качественный и количественный состав секрета МСК и его биологические свойства. В совокупности, это позволяет рассматривать иммортализованные культуры МСК как стабильный источник получения больших (коммерчески значимых) количеств клеточного секрета, что является важной составляющей изучения и создания платформы для разработки перспективных лекарственных кандидатов для решения задач регенеративной медицины. Результаты, подтверждающие нейропротективную и прорегенераторную активность секрета иммортализованных МСК в модели интрацеребральной посттравматической гематомы, являются оригинальными и получены впервые.

3.6.9 Изучение нейропротективной и прорегенераторной активности секрета генетически модифицированных МСК в модели интрацеребральной посттравматической гематомы

Иммортализация МСК замедлила их старение и значительно увеличила промежуток времени (минимум с 8 до 24 пассажа) продукции секрета с относительно постоянным качественным и количественным составом. Поскольку, согласно приведенным выше результатам, иммортализация существенным образом не изменила качественный и количественный состав секрета МСК, а также его биологические свойства, то логично предположить, что ограничения, свойственные для секрета первично выделенных МСК (выраженная нейропротективная активность при концентрировании секрета в 5-25 раз), будут характерны и для секрета иммортализованных МСК. Концентрирование секрета, с одной стороны, может изменять соотношение его компонентов, а, с другой, при разработке потенциального лекарственного кандидата для стимуляции процессов регенерации увеличивает трудозатраты и стоимость фармакологического производства при общем снижении выхода терапевтической субстанции.

Мы предположили, что данное ограничение может быть преодолено путем создания генетически модифицированных клеточных культур МСК (на базе immortalized МСК), способных гиперэкспрессировать нейротрофические и прорегенераторные факторы роста и цитокины в составе секретора МСК. В качестве генов для повышенной экспрессии были выбраны гены BDNF и uPA (по причинам, подробно описанным в разделе 3.1), а также проангиогенные молекулы, как класс. Для этого были созданы системы конститутивной и индуцируемой экспрессии искомым генов BDNF и uPA, а также подавления гена VHL – одного из супрессоров HIF.

Полученные результаты показали, что в группе kSh (конститутивная экспрессия shRNA к мРНК VHL) выживаемость через 10 суток после моделирования интрацеребрального посттравматического кровоизлияния составила 100%, неврологические нарушения: 60% животных с легкими неврологическими нарушениями и 40% - визуально здоровых, а средний объем повреждения головного мозга составил 173 (167; 192) мм³, в то время как в группах kBU (конститутивная экспрессия BDNF и uPA) и kBU+kSh (комбинация kBU и ksh 1:1) выживаемость через 10 суток после моделирования интрацеребрального посттравматического кровоизлияния составила по 100%, неврологические нарушения: по 40% животных с легкими неврологическими нарушениями и по 60% - визуально здоровых, а средний объем повреждения головного мозга составил 212 (176; 253) мм³ (Рисунок 3.55, n = 5) и 104 (86; 125) мм³ (n = 5, ANOVA по рангам, критерий Данна), соответственно. В группе iBU (индуцируемая экспрессия BDNF и uPA) выживаемость через 10 суток после моделирования интрацеребрального кровоизлияния составила 60%, неврологические нарушения: 20% животных с легкими неврологическими нарушениями и 40% - визуально здоровых, а средний объем повреждения головного мозга составил 232 (210; 238) мм³.

В то же время в группе iSh (индуцируемая экспрессия shRNA к мРНК VHL) выживаемость через 10 суток после моделирования интрацеребрального кровоизлияния составила 100%, неврологические нарушения: 40% животных

с тяжелыми неврологическими нарушениями и 60% - визуально здоровых, а средний объем повреждения головного мозга составил 159 (127; 230) мм³, а в группе иBU+ish (комбинация иBU и иSh 1:1) выживаемость через 10 суток после кровоизлияния составила 100%, «неврологические нарушения: 20% животных с легкими неврологическими нарушениями и 80% - визуально здоровых, а средний объем повреждения головного мозга составил 108 (99.3; 174) мм³ (Рисунок 3.55, n = 5). В группе отрицательного контроля (DMEM-LG) выживаемость через 10 суток после моделирования кровоизлияния составила 100%, неврологические нарушения: 20% животных с легкими неврологическими нарушениями и 60% - визуально здоровых, а средний объем повреждения головного мозга составил 187 (151; 226) мм³, в то время как в группе положительного контроля чМСК1х выживаемость через 10 суток после моделирования кровоизлияния составила 100%», неврологические нарушения: 20% животных с легкими неврологическими нарушениями и 80% - визуально здоровых, а средний объем повреждения головного мозга составил 165 (153; 213) мм³. Результаты гистологического исследования соответствуют таковым, полученным в ходе МРТ-исследования (Рисунок 3.55).

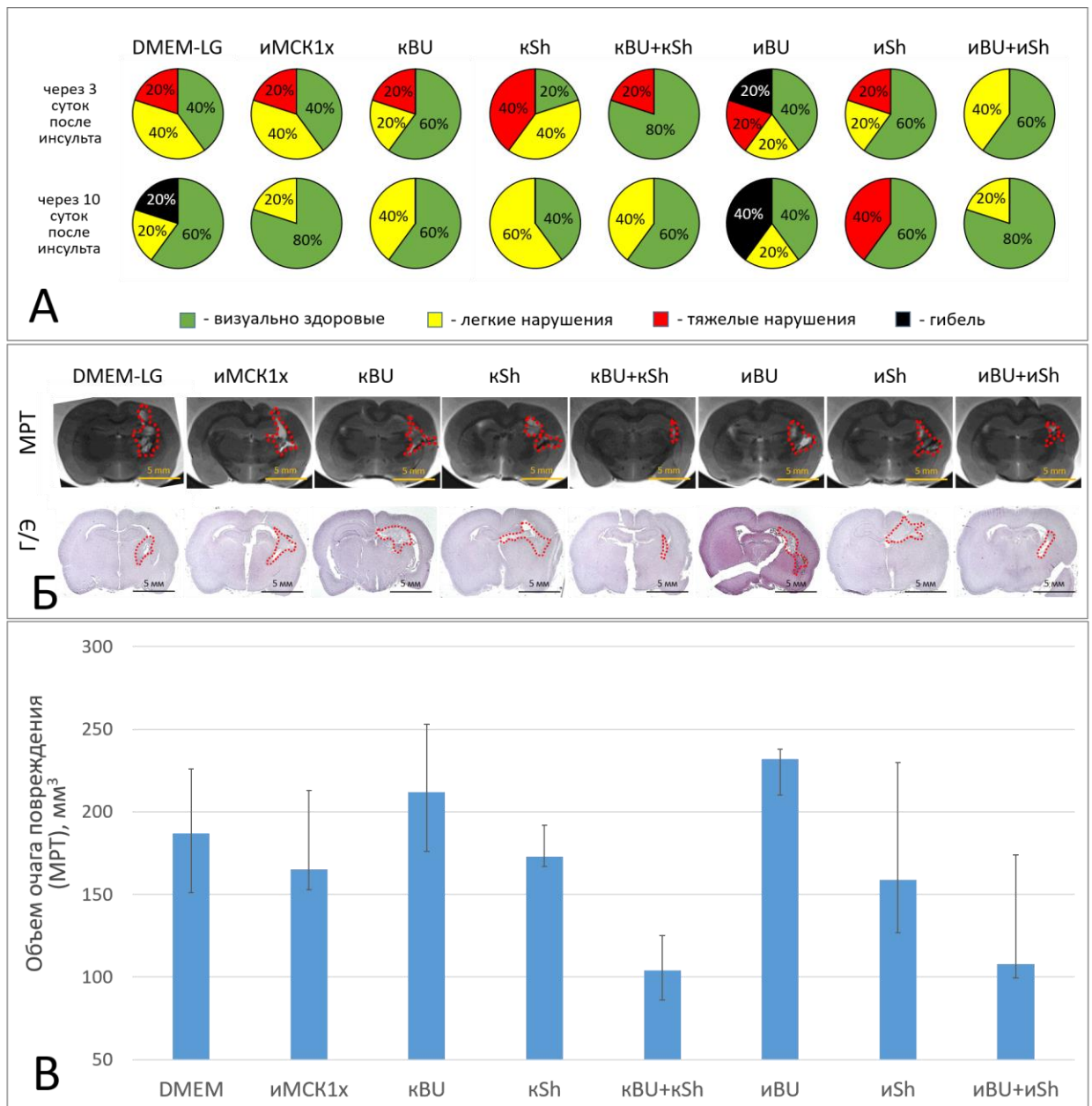


Рисунок 3.55 - Результаты оценки нейропротективной и прорегенераторной активности секрета генетически модифицированных МСК в модели интрацеребральной посттравматической гематомы крыс: А – выраженность неврологического дефицита у экспериментальных животных через 3 и 10 суток после моделирования кровоизлияния; Б – образцы очагов повреждения головного мозга через 14 суток после моделирования кровоизлияния (МРТ, гистохимическое окрашивание), г/э – гематоксилин/эозин; В – количественная оценка объема поражения головного мозга по данным МРТ. Данные представлены в виде медианы (25%; 75%). n = 5, ANOVA по рангам, критерий Данна.

Полученные данные показывают, что подавление экспрессии VHL (конститутивное или индуцируемое) и повышение экспрессии проангиогенных факторов самих по себе не способно значительно увеличить нейропротективную активность секрета МСК. Из данных литературы известно, что VEGF (как один из основных проангиогенных факторов) может увеличивать проницаемость ГЭБ и ухудшать прогноз при повреждениях центральной нервной системы [Mayhan et al, 1999; Zhang et al, 2000], однако, статистически достоверного ухудшения состояния экспериментальных животных в группах кSh (конститутивная экспрессия shRNA к VHL) и иSh (индуцируемая экспрессия shRNA к VHL) ни по одному из регистрируемых параметров не наблюдается. Возможно, это связано с относительно небольшим повышением концентрации VEGF (~2 раза) в случае подавления VHL, как с помощью конститутивной, так и с помощью индуцированной систем экспрессии.

В то же время, повышение экспрессии BDNF и uPA (конститутивное или индуцируемое), наоборот, снижает нейропротективную активность секрета (статистически недостоверно, но наблюдается тенденция), что проявляется в худшей выживаемости экспериментальных животных, ухудшении их неврологических показателей и тенденции к увеличению очага повреждения, причем наблюдается зависимость токсического эффекта от дозы гиперэкспрессированных BDNF и uPA: он наиболее выражен в группе иBU (индуцированная экспрессия комбинации BDNF и uPA), где уровень экспрессии BDNF достигал - 19.3 ± 4.2 нг/мл, а uPA - 4.9 ± 0.9 нг/мл. Механизм такого токсического действия комбинации BDNF и uPA при таких концентрациях при внутривенном введении остается неустановленным.

Комбинирование секретомов, содержащих «BDNF+uPA и композицию проангиогенных факторов (кBU + кSh и иBU + иSh), наоборот, приводит к улучшению выживаемости экспериментальных животных, снижению у них тяжести неврологических дефицитов и тенденции к уменьшению объема повреждения мозговой ткани». Механизм этого явления еще только предстоит

установить, но предположительно, это связано с увеличением проницаемости ГЭБ (за счет действия VEGF) и увеличением поступления нейротрофических молекул (BDNF, uPA и др.) в очаг повреждения, что в итоге приводит наблюдаемому улучшению клинической картины и уменьшению очага повреждения.

Полученные данные лишней раз свидетельствует о том, что в составе секрета МСК могут содержаться молекулы, обладающие различными функциональными модальностями, в т.ч. обладающие противоположными терапевтическими эффектами, и что результирующий эффект во многом будет определяться наличием отдельных молекул, их соотношением и взаимодействием. Полученные результаты показывают важность изучения состава секрета МСК, как потенциальной платформы для разработки перспективных лекарственных кандидатов, изучения вклада отдельных факторов и их взаимодействия в наблюдаемые терапевтические (нейропротективные и прорегенераторные) эффекты. С практической точки зрения это демонстрирует важность поддержания качественного и количественного состава секрета при разработке на его основе перспективных лекарственных кандидатов, что может быть обеспечено использованием иммортализованных МСК и их секрета.

Полученные результаты показывают, что идея использования генетически модифицированных МСК и их секрета для разработки перспективных лекарственных кандидатов является преждевременной и требует дальнейшего изучения свойств полученных культур клеток и их секрета. Результаты исследования нейропротективной и прорегенераторной активности секрета генетически модифицированных МСК в модели интрацеребральной посттравматической гематомы являются новыми и получены впервые.

3.6.10 Изучение потенциальных клеточных механизмов нейропротективной и прорегенераторной активности секрета МСК, регистрируемых в модели интрацеребральной посттравматической гематомы

Полученные данные *in vivo* исследований (разделы 3.6.1 и 3.6.4) свидетельствуют о прямой нейропротективной активности секрета МСК в острейшем периоде в модели интрацеребральной посттравматической гематомы, а также о его способности обеспечивать непрямую нейропротекцию, оказывать иммуномодулирующее действие и стимулировать процессы регенерации в отсроченном периоде. Для того, чтобы установить возможные клеточные механизмы, лежащие в основе нейропротективной и прорегенераторной активности секрета МСК, мы изучили различные аспекты его действия на доступных клеточных моделях. Особое внимание уделили оценке способности к прямой нейропротекции (модель глутамат-индуцированной токсичности в «культуре клеток нейробластомы SH-SY5Y»), иммуномодуляции (в культуре аллогенных первично выделенных клеток моноцитарно-макрофагальной фракции периферической крови) и способности стимулировать прораствание нервных волокон (в культуре клеток нейробластомы SH-SY5Y)» [Karagyaur et al, 2021].

Секретом МСК поддерживает выживание клеток нейробластомы человека SH-SY5Y в условиях глутамат-индуцированной нейротоксичности. Глутамат-индуцированная нейротоксичность (эксайтотоксичность) является одним из основных механизмов гибели нейронов в головном мозге в условиях ишемии (вне зависимости от причин, ее вызвавших) [Rothman et al, 1986; Brown et al, 1999]. «Для оценки прямой нейропротективной активности секрета МСК мы использовали опубликованную ранее модель глутамат-индуцированной гибели клеток нейробластомы человека SH-SY5Y» [Karagyaur et al, 2021; Hu et al, 2012; Nampoothiri et al, 2014].

Результаты исследования показали, что секретомы чМСК1х, чМСК10х, кМСК10х и МСК-В поддерживают выживаемость «линии клеток нейробластомы человека SH-SY5Y в условиях нейротоксичности, индуцированной глутаматом (Рисунки 3.56 и 3.57А). Таким образом, количество живых клеток в группах чМСК1х, чМСК10х, кМСК10х и МСК-В было значительно выше через 3-24 часа после добавления глутамата, чем в группе положительного контроля «К+», не содержащей секретома ($p < 0.001$ по сравнению с контролем (К+); $n = 12$)» [Karagyaur et al, 2021].

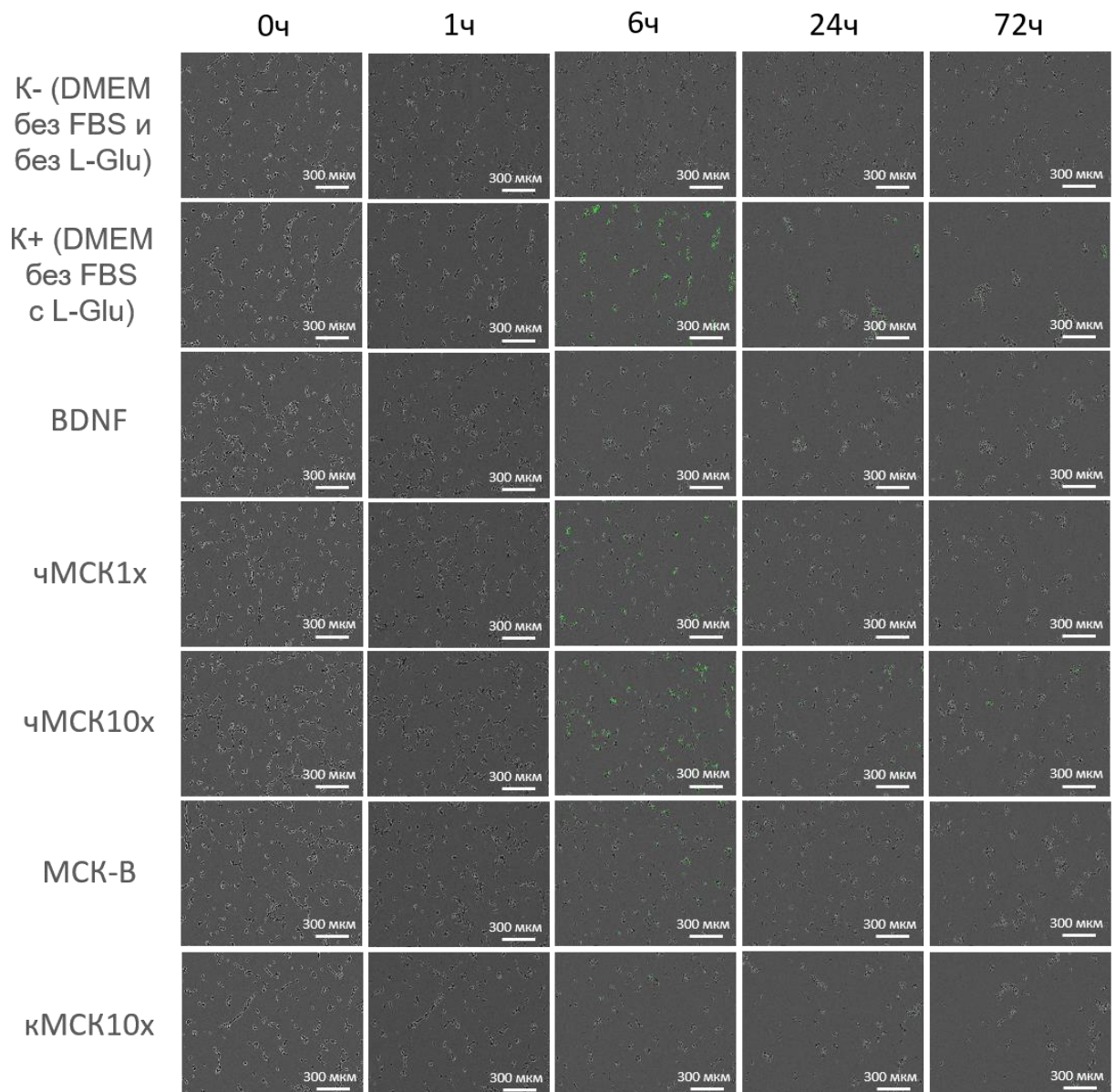


Рисунок 3.56 - Примеры изображений, полученных в ходе изучения нейропротекторной активности секретомов МСК в модели глутамат-индуцированной нейротоксичности *in vitro*. Зеленое окрашивание соответствует погибшим клеткам (апоптоз).

Выживаемость SH-SY5Y в группах чМСК1х, чМСК10х, кМСК10х и МСК-В была сопоставима с таковой, наблюдаемой в группе положительного контроля BDNF. Достоверных различий в выживаемости клеток линии SH-SY5Y между группами МСК не наблюдалось, за исключением группы кМСК10х, в которой регистрируемая нейропротекторная активность была статистически достоверно выше по сравнению с группой «К+» и даже по сравнению с группами чМСК1х, МСК-В и чМСК10х в определенные моменты времени. Секретомы чМСК1х, чМСК10х и кМСК10х поддерживали выживаемость клеток нейробластомы SH-SY5Y до 72 часов в нейротоксических условиях (100 мМ L-глутамата), с количеством живых клеток в 7% (0%; 9%), 8% (4%; 10%) и 19% (11%; 27%), соответственно, тогда как в группе «К+» через 24 ч от начала эксперимента (добавление глутамата) живых клеток не наблюдалось.

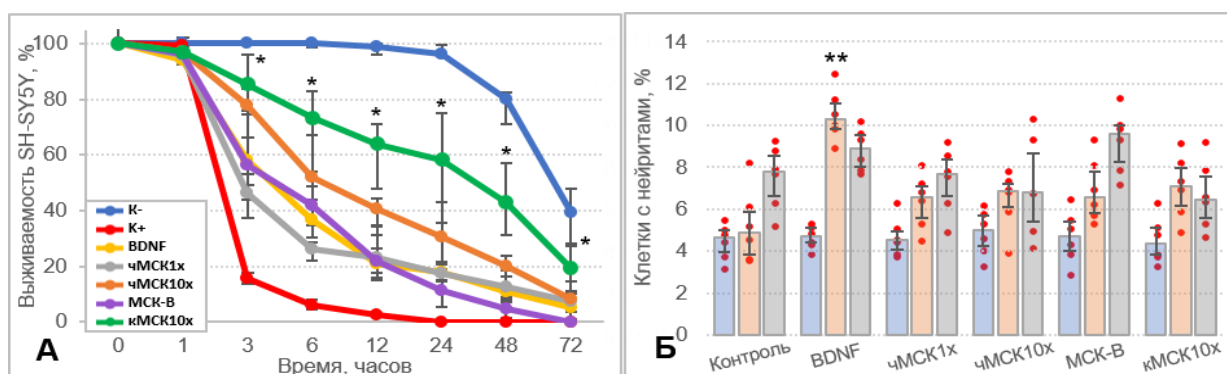


Рисунок 3.57 - Результаты изучения молекулярно-клеточных механизмов нейропротективной и прорегенераторной активности секретомы МСК в моделях *in vitro*: А - оценка прямой нейропротекторной активности секретомы МСК (чМСК1х; МСК-В; чМСК10х; кМСК10х) в модели глутамат-индуцированной токсичности клеток нейробластомы SH-SY5Y: * - $p < 0.001$ по сравнению с контролем (К+), $n = 12$, ANOVA, тест Ньюмена-Кейлса. Б - оценка способности секретомы МСК стимулировать рост нейритов в культуре клеток нейробластомы SH-SY5Y. ** - $p = 0.004$ по сравнению с контролем, $n = 5$, ANOVA по рангам, критерий Данна. Данные представлены в виде медианы (25%; 75%).

«Помимо глутамат-индуцированной токсичности также наблюдалась спонтанная гибель клеток SH-SY5Y в условиях бессывороточной среды (группа отрицательного контроля «К-», бессывороточная среда без L-глутамата), которая начинала значительно увеличиваться с 24 ч эксперимента» [Karagyaur et al, 2021].

Изучение способности секрета МСК стимулировать рост нейритов клеток нейробластомы человека SH-SY5Y. Изучение динамики роста нейритов культуры SH-SY5Y в течение 24 ч показало спонтанный рост нейритов во всех экспериментальных группах. Секретомы чМСК1х, чМСК10х, МСК-В и кМСК10х увеличивали рост нейритов по сравнению с контрольной группой в течение 6 ч от начала эксперимента; однако, зафиксированное различие не является статистически достоверным. Только в группе BDNF рост нейритов был статистически достоверно выше, чем в контрольной группе ($p = 0.004$ по сравнению с контролем; $n = 5$) (Рисунки 3.57Б и 3.58).

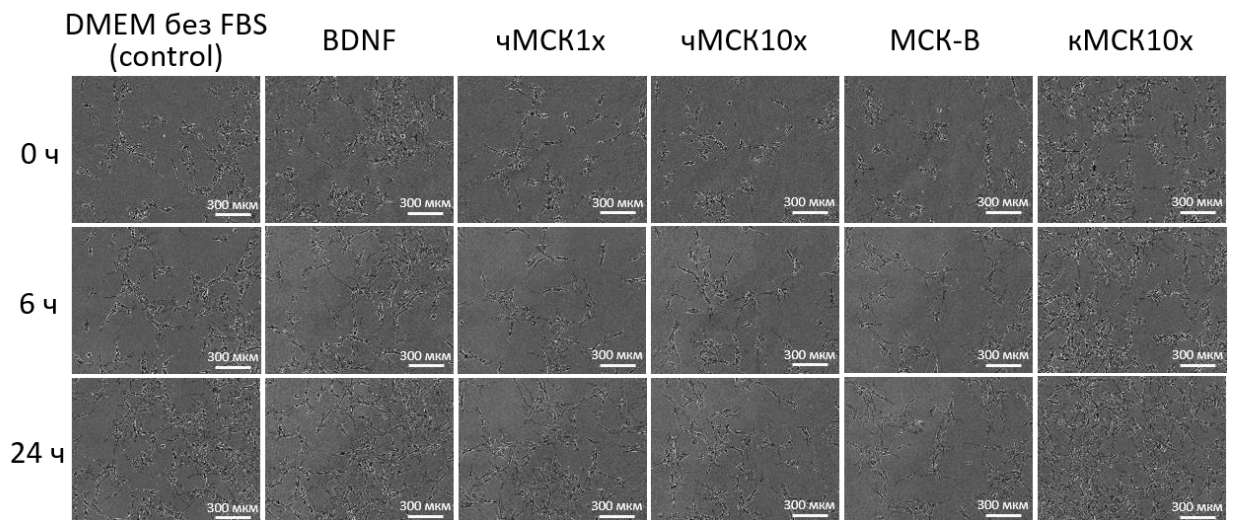


Рисунок 3.58 - Примеры изображений, полученных в ходе изучения способности секретомов МСК стимулировать нейритогенез в культуре клеток нейробластомы человека SH-SY5Y.

Секретом МСК стимулирует поляризацию клеток моноцитарно-макрофагального звена периферической крови человека в противовоспалительном направлении. Активация клеток моноцитарно-макрофагального звена и их привлечение в очаг повреждения является одним из механизмов прогрессирования нейровоспаления и развития вторичного повреждения мозговой ткани [He et al., 2020; Wu et al, 2021]. Ввиду этого необходимо было исследовать влияние секрета МСК на свойства и поведение иммунных клеток, для чего была использована опубликованная ранее *in vitro* модель поляризации первично выделенных клеток моноцитарно-макрофагальной фракции периферической крови человека в М1-провоспалительный и М2-противовоспалительный фенотипы [Vogel et al, 2014; Huang et al, 2018].

«Проведенное исследование показало, что добавление в среду культивирования секрета МСК человека до степени его концентрирования 1х достоверно тормозит поляризацию моноцитов/макрофагов в провоспалительный М1-фенотип по сравнению с группой контроля ($n = 4$; $p < 0.05$, *t*-критерий Стьюдента) (Рисунок 3.59). Так, в группе без секрета МСК (контроль) средняя интенсивность окраски (арифметическое среднее интенсивности сигнала) клеток, поляризованных в М1-фенотип и окрашенных антителами к CD80 (M1) составила 36.8% (34.1%; 39.5%), в то время как добавление секрета МСК снижало среднюю интенсивность окраски таких клеток в ~2 раза» [Ткачук и др., 2023] до 18.3% (17.3%; 19.2%) ($p < 0.001$, $n \geq 4$, *t*-критерий Стьюдента) (Рисунок 3.59) и увеличивало экспрессию маркеров противовоспалительного фенотипа (CD209) даже в провоспалительных условиях с 29.9% (16.2%; 44.7%) в группе контроля до 61.2% (51.1%; 74.8%). Аналогичным образом добавление секрета МСК снижает уровень представленности CD86, маркера провоспалительных М1-моноцитов/макрофагов, с 60.3% (53.5%; 72.1%) до 50.5% (43.4%; 55.9%) (различия статистически недостоверны, $n \geq 4$) (Рисунок 3.59).

Добавление «секрета» МСК в среду культивирования моноцитов/макрофагов статистически достоверно стимулирует их индукцию в противовоспалительный М2-фенотип: средняя интенсивность окраски (арифметическое среднее интенсивности сигнала) клеток, поляризованных в М2-фенотип в присутствии секрета МСК и окрашенных антителами [Ткачук и др., 2023] к CD206 (М2-специфичный маркер) составила 80.3% (76.4%; 84.1%), в то время как в группе контроля (без секрета МСК) – 42.6% (39.7%; 45.5%) ($p < 0.05$, $n = 4$, t-критерий Стьюдента) (Рисунок 3.59). Аналогичным образом добавление секрета МСК повышает уровень представленности CD209, маркера противовоспалительных М2-моноцитов/макрофагов, с 51.8% (18.7%; 54.1%) до 68.8% (61.2%; 72.5%) ($p < 0.05$, $n \geq 4$, t-критерий Стьюдента) (Рисунок 3.59).

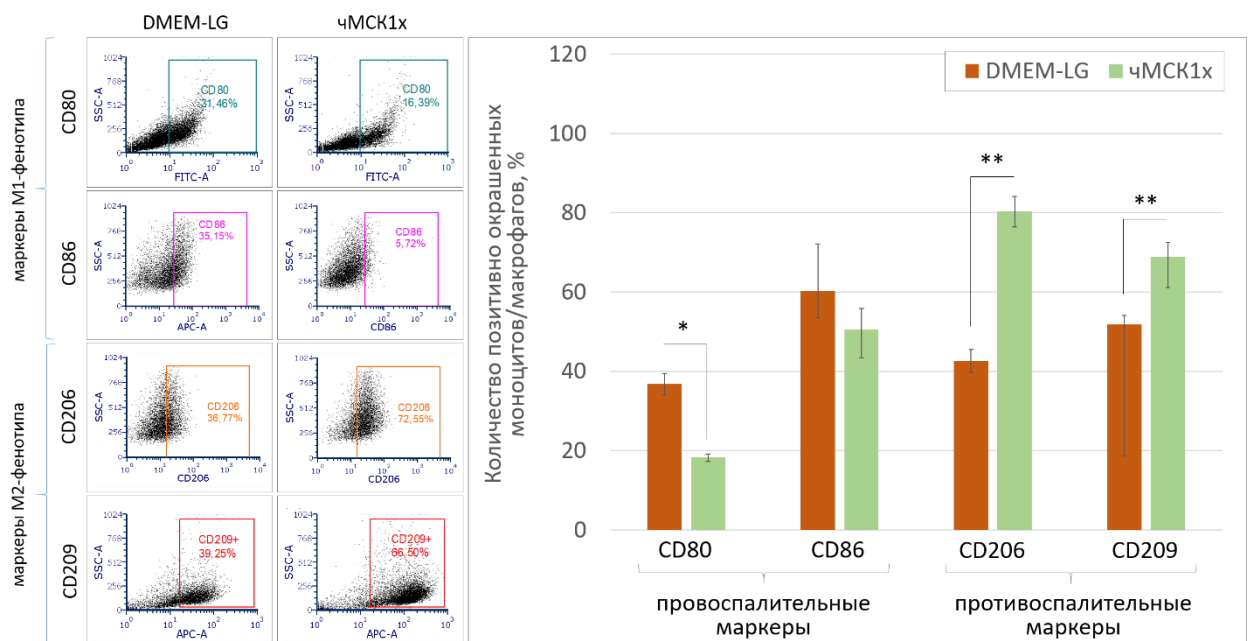


Рисунок 3.59 - Результаты оценки иммуномодулирующей активности аллогенного секрета МСК в *in vitro* модели поляризации первично выделенных клеток моноцитарно-макрофагальной фракции периферической крови человека в М1-провоспалительный фенотип (CD80 и CD86) и в М2-противовоспалительный фенотип (CD206 и CD209). Данные представлены в виде медиана (25%; 75%). * – $p < 0.001$, ** – $p < 0.05$, $n \geq 4$, t-критерий Стьюдента.

Таким образом, *in vitro* модель поляризации первично выделенных клеток моноцитарно-макрофагальной фракции периферической крови человека было показано, что секретом МСК препятствует поляризации моноцитов/макрофагов человека в провоспалительный М1-фенотип и стимулирует их поляризацию противовоспалительный М2-фенотип, в условиях стимуляции поляризации как в М1-провоспалительный фенотип, так и в М2-противовоспалительный фенотип.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что секретом МСК содержит нейропротективные молекулы, обеспечивающие его прямую нейропротективную активность, даже в условиях глутамат-опосредованной нейротоксичности (одного из механизмов повреждения мозговой ткани в острейшем периоде патогенеза), молекулы, подавляющие воспаление и стимулирующие противовоспалительную поляризацию иммунных клеток (тем самым предотвращают вторичное повреждение и обеспечивают непрямую нейропротекцию мозговой ткани), а также молекулы, стимулирующие рост и восстановление нейронных сетей, что является важным компонентом процесса регенерации нервной ткани в отсроченном периоде после ее повреждения. Результаты о возможных клеточных механизмах нейропротективной и прорегенераторной активности секрета МСК в модели интрацеребральной посттравматической гематомы являются оригинальными и получены впервые.

3.6.11 Изучение вклада BDNF и uPA в нейропротективную и прорегенераторную активность секрета МСК в модели интрацеребральной посттравматической гематомы

Мозговой нейротрофический фактор (BDNF) и урокиназный активатор плазминогена (uPA) входят в состав секрета МСК и, согласно полученным выше данным, могут обуславливать часть нейропротективных и прорегенераторных эффектов секрета аллогенных МСК. Для того, чтобы оценить важность вклада BDNF и uPA в нейропротективную и

прорегенераторную активность секретома аллогенных МСК, мы заблокировали их активность с помощью нейтрализующих антител и химических ингибиторов. Блокирование BDNF или uPA привело к снижению нейропротективной и прорегенераторной активности секретома. Так, нейтрализация BDNF и ингибирование uPA через 10 суток после моделирования интрацеребральной посттравматической гематомы снизила выживаемость экспериментальных животных в этих группах и увеличила тяжесть и частоту встречаемости неврологических нарушений: 83% выживших животных, из них - 17% с легкими неврологическими нарушениями и 66% визуально здоровых - при нейтрализации BDNF и 67% выживших животных, из них - 33% с легкими неврологическими нарушениями и 33% визуально здоровых - при ингибировании активности uPA. Также это сопровождалось увеличением объема повреждения головного мозга по данным МРТ-исследования до 191 (167; 193) мм³ и 233 (197; 304) мм³, при нейтрализации BDNF и ингибировании активности uPA, соответственно (различия статистически недостоверны, $n = 6$). В то время как в группе отрицательного контроля (DMEM-LG) через 10 суток после моделирования интрацеребральной посттравматической гематомы 83% экспериментальных животных выжило, из них - 33% имели легкие неврологические нарушения, 50% - были визуально здоровы, а объем очага повреждения головного мозга по данным МРТ-исследования составил 254 (237; 272) мм³. В контрольной группе кМСК10х+IgG через 10 суток после моделирования интрацеребральной посттравматической гематомы 17% экспериментальных животных имели легкие неврологические нарушения, в то время как 83% и 100% из группы и кМСК10х были визуально здоровы, а «объем очага повреждения головного мозга по данным МРТ-исследования у них составил 196 (138; 212) мм³ и 206 (116; 249) мм³, соответственно (Рисунок 3.60). Результаты гистологического исследования соответствуют таковым, полученным в ходе МРТ-исследования» [Dzhauari et al, 2023; Джауари, 2024].

Такой выраженный эффект снижения нейропротективной и прорегенераторной активности секрета МСК в результате нейтрализации BDNF и ингибирования uPA, по-видимому, обусловлен важностью этих молекул в процессах нейропротекции и «регенерации мозговой ткани. Так, BDNF, согласно нашим и ранее опубликованным данным [Boyd et al, 2003; Гомазков, 2006;] обладает способностью стимулировать прямую и опосредованную (через подавление нейровоспаления) нейропротекцию, а также регенерацию поврежденной нервной ткани» [Karagyaur et al, 2015], а uPA представляет собой плеiotропную молекулу, вовлеченную в процессы фибринолиза, ангиогенеза, активации факторов роста, деградации матрикса, направленной миграции клеток, прорастания аксонов и т.п. [Naldini et al, 1995; Traktuev et al, 2007; Semina et al, 2016a].

Если принимать во внимание весь указанный спектр биологической активности BDNF и uPA, то полученные результаты их блокирования и ингибирования являются ожидаемыми в модели острого повреждения мозговой ткани.

В совокупности с ранее полученными результатами новые данные подтверждают наличие сложных межмолекулярных взаимодействий и необходимость функциональной комплементарности факторов роста/цитокинов для сочетанного воздействия на различные этапы/компоненты процессов обновления и регенерации тканей с целью обеспечения его эффективного протекания. Результаты оценки вклада BDNF и uPA в нейропротективную и прорегенераторную активность секрета МСК в модели интрацеребральной посттравматической гематомы являются оригинальными и получены впервые.

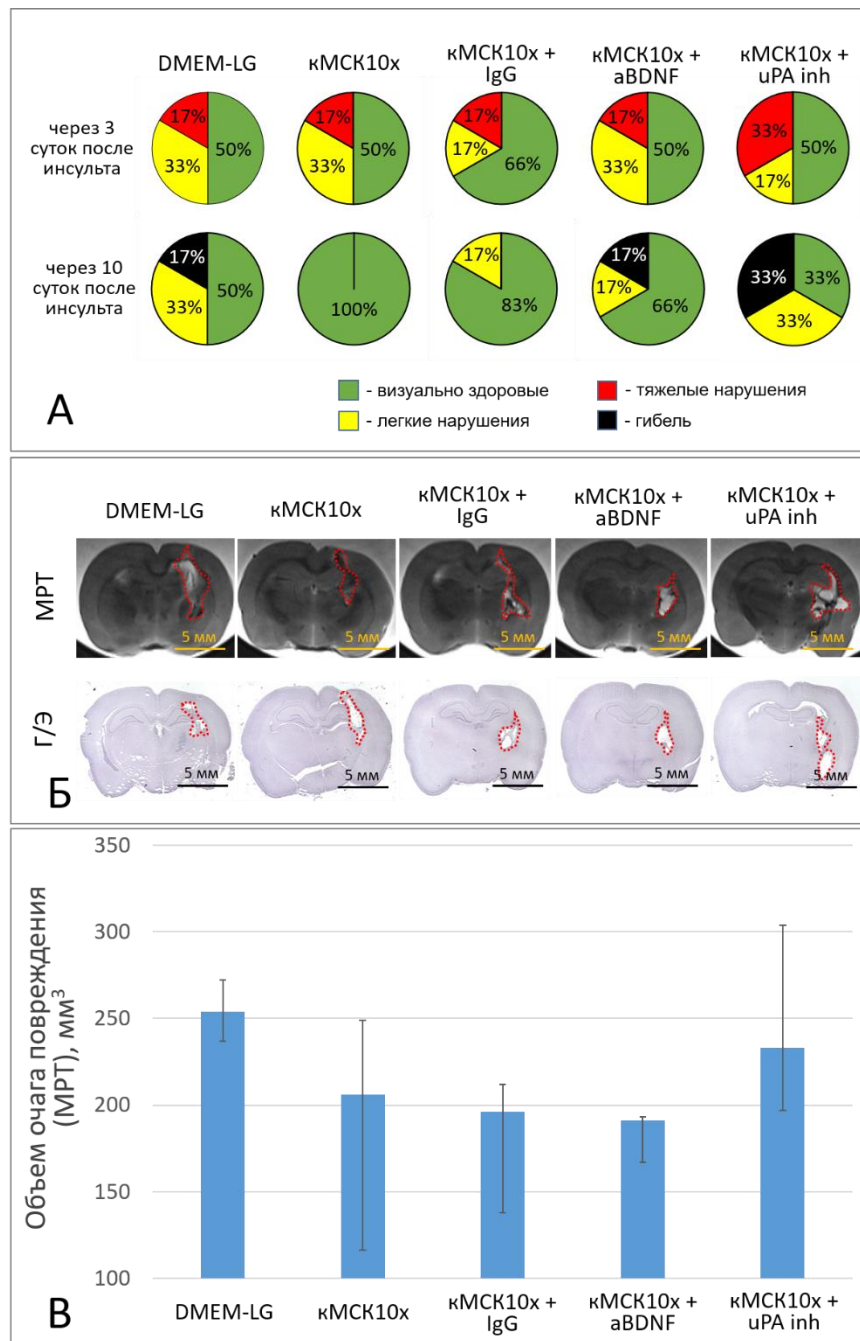


Рисунок 3.60 - Результаты оценки вклада мозгового нейротрофического фактора (BDNF) и урокиназного активатора плазминогена (uPA) в нейропротективную и прорегенераторную активность секретома аллогенных МСК в модели интрацеребральной посттравматической гематомы крыс: А – выраженность неврологического дефицита у экспериментальных животных через 3 и 10 суток после моделирования кровоизлияния; Б – образцы очагов повреждения головного мозга через 14 суток после моделирования кровоизлияния (МРТ, гистохимическое окрашивание), г/э – гематоксилин/эозин; В – количественная оценка объема поражения головного мозга по данным МРТ. Данные представлены в виде медианы (25%; 75%). n = 6 (ANOVA, тест Ньюмена-Кейлса).

3.7 Изучение потенциальных побочных эффектов BDNF и uPA при сочетанном использовании в виде различных систем доставки

Состояние проблемы на момент исследования. Мозговой нейротрофический фактор (BDNF) и урокиназный активатор плазминогена (uPA) являются эффективными стимуляторами нейропротекции и регенерации нервной ткани, как в центральной, так и в периферической нервной системе: результаты данного исследования и данные мировой литературы [Boyd et al, 2003; Traktuev et al, 2007;]. Данные молекулы являются факторами роста и цитокинами, а значит их избыточная, диссеминированная и несвоевременная продукция потенциально может быть причиной развития нежелательных побочных эффектов: нарушение тканевого гомеостаза, сенсibilизация нервов, стимуляция роста и метастазирования дормантных опухолей [Huang et al, 2016; Tajbakhsh et al, 2017; Nijs et al, 2015; Jaiswal et al, 2018]. Поскольку область биомедицинской науки, направленной на регенерацию нервной ткани, является достаточно молодой, значимого опыта применения генотерапевтических конструкций и природоподобных композиций (на основе секретама клеток) пока не накоплено, тем более отсутствуют данные о применении и безопасности различных модификаций таких систем (бицистронные генотерапевтические конструкции, иммортализованные МСК и их секретом). Все это требует проведения исследования безопасности таких систем и их модификаций с тем, чтобы оценить возможность трансляции полученных результатов о нейропротективной и прорегенераторной активности комбинации BDNF и uPA в виде рекомбинантных белков, генотерапевтической конструкции и мультимолекулярных композиций (секретом МСК) в клиническую практику.

3.7.1 Изучение подострой токсичности, мутагенности с прогнозом канцерогенности и генотоксичности бицистронной генетической конструкции pNCure, кодирующей гены BDNF и uPA

Изучение подострой токсичности бицистронной генетической конструкции pNCure, кодирующей гены BDNF и uPA. Внутримышечное ежедневное введение плазмиды pNCure, кодирующей BDNF и uPA, в дозах от 0.118 до 2 мг/кг в течение 30 суток не вызывало гибели экспериментальных животных (крыс) в течение всех 60 суток эксперимента. Общее состояние животных в течение всего периода наблюдения (осмотр проводился на 1, 8, 15, 22, 29, 38, 45, 52, 59 дни исследования) соответствовало норме и оставалось стабильным. Животные в клетке проявляли нормальную активность, тремора не было, состояние шерсти, кожи и слизистых оболочек, доступных для наблюдения, соответствовало таковому у крыс, живущих в удовлетворительных условиях.

Крысы опытных и контрольных групп независимо от пола прибавляли массу в пределах возрастной нормы (Рисунок 3.61 А и Б). Эти результаты согласовывались с данными о потреблении пищи и воды в обеих группах (Рисунок 3.61 В-Е). Это показывает, что хроническое (ежедневное) применение pNCure в течение месяца не влияет на аппетит крыс и прибавку их веса.

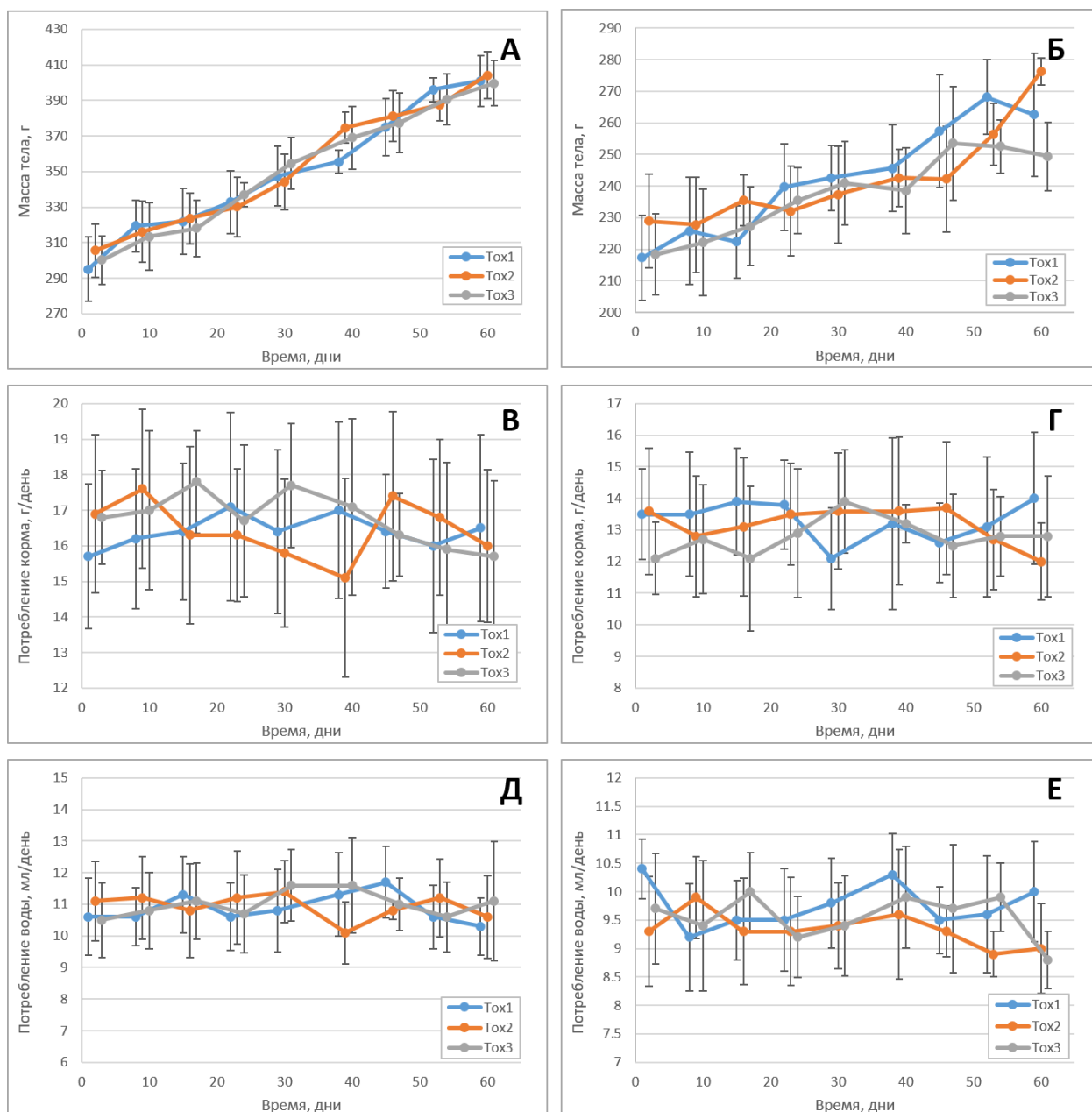


Рисунок 3.61 - Влияние инъекций плазмиды rNCure на динамику массы тела (А – самцы, Б – самки), а также на потребление пищи и воды (В,Д – самцы, Г,Е – самки) в условиях эксперимента по оценке субхронической токсичности rNCure. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (ANOVA, тест Ньюмена-Кейлса).

Взвешивание внутренних органов на 30-е и 60-е сутки эксперимента не выявило статистически значимой разницы между контрольной и опытной группами (Рисунок 3.62).

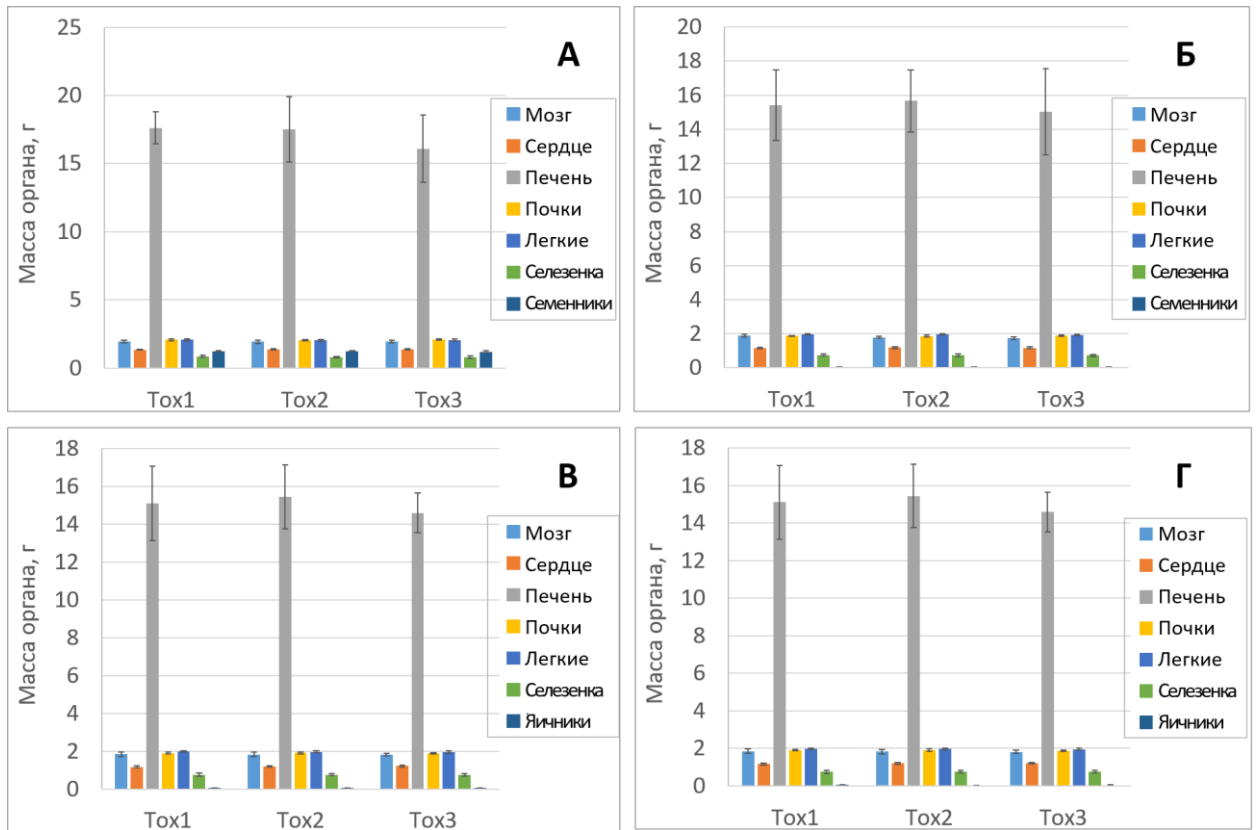


Рисунок 3.62 - Результаты взвешивания внутренних органов в ходе эксперимента по оценке субхронической токсичности pNCure: А – самцы (30-й день), Б – самцы (60-й день), В – самки (30-й день), Г – самки (60-й день). Сравнение массы органов между группами Tox1, Tox2 и Tox3 в рамках одного пола и одной временной точки - ANOVA, тест Ньюмена-Кейлса. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение.

Макроскопическое и гистологическое исследование внутренних органов на 30-е и 60-е сутки эксперимента не выявило различий между контрольной и опытной группами после курсового введения плазмиды pNCure независимо от ее дозы. Признаков патологического процесса (воспаления, дистрофии, некроза, склероза или гетероплазии) не наблюдалось (Рисунок 3.63).

Результаты клинико-биохимического анализа крови крыс на 30-е и 60-е сутки после курсового введения pNCure находились в пределах физиологического диапазона для контрольной и опытной групп. (Приложение Таблицы 2-5).

Результаты исследования ЭКГ у крыс после курсового введения плазмиды pNCure находились в пределах физиологического диапазона и

статистически не отличались от соответствующих показателей контрольной группы. Также не было отмечено значимой разницы между соответствующими параметрами ЭКГ на 29-й и 59-й дни исследования (Приложение Таблицы 6 и 7).

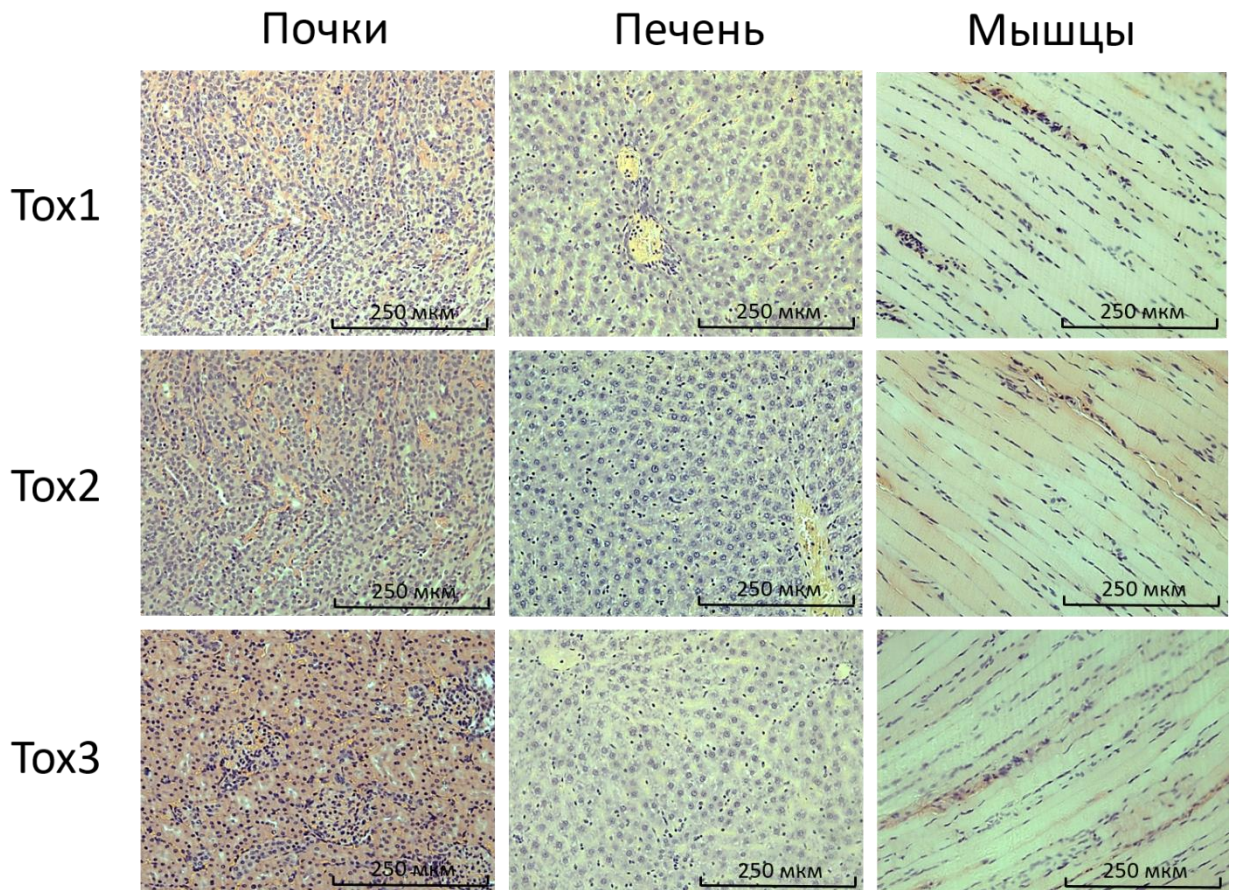


Рисунок 3.63 - Гистологическая картина органов крысы после курсового введения плазмиды pNCure (окрашивание гематоксилин-эозином, 20х).

Параметры индивидуального эмоционального статуса (степень тревожности, исследовательский рефлекс, вокализация при осмотре) в обеих группах находились в пределах физиологического диапазона. У животных выявлена нормальная рефлекторная реакция на простые раздражители (дрожание, переворачивание, слуховые раздражители, роговичный рефлекс). Это свидетельствует о том, что плазида pNCure не проявляет нейротоксического действия в диапазоне доз от 0.118 до 2 мг/кг. Также никаких различий между экспериментальной и контрольной группами не

наблюдалось и при изучении высшей нервной деятельности подопытных животных в тесте «Открытое поле» (двигательная активность, ориентировочное исследовательское поведение, тревожность) (Приложение Таблицы 8 и 9). Таким образом, при ежедневном введении в течение 30 суток в рамках токсикологического исследования плазмиды pNCure не влияла на внешний вид животных, их здоровье и поведение, не влияла на показатели крови и основные физиологические функции, а также не вызывала патоморфологических изменений в органах и тканях.

Изучение потенциальной мутагенности с прогнозом канцерогенности бицистронной генетической конструкции pNCure, кодирующей гены BDNF и uPA (comet-assay). «Потенциальную мутагенную активность бицистронной генетической конструкции pNCure, кодирующей BDNF и uPA» [Karagyaur et al, 2021a], оценивали по процентному содержанию фрагментированной ДНК в хвосте кометы в ходе comet assay. В результате исследования было установлено, что введение плазмиды pNCure в дозах 20 и 200 мг/кг не повышало уровень фрагментации ДНК в органах и тканях подопытных мышей по сравнению с аналогичными показателями в тканях контрольных мышей вне зависимости от продолжительности наблюдения. Например, в клетках костного мозга животных из группы отрицательного контроля (Mut1) процент фрагментированной ДНК (в пределах «хвоста кометы») составил $3.7 \pm 1.6\%$. У животных, получавших плазмиду pNCure в дозах 20 и 200 мг/кг (Mut2 и Mut3), процент фрагментированной ДНК составлял $3.4 \pm 0.9\%$ и $3.2 \pm 0.9\%$ ДНК в «хвосте кометы», соответственно. Сравнение данных контрольной и опытной групп не выявило статистически значимых различий между ними. В то же время у животных из группы положительного контроля (Mut4), обработанных метансульфонатом, наблюдалось статистически значимое увеличение повреждений ДНК (в 3-5 раз) в органах и тканях - $16.3 \pm 3.5\%$ фрагментированной ДНК в «хвосте кометы» (Рисунок 3.64) ($p < 0.01$, $n = 5$, ANOVA: тест Сидака-Холма). «По

результатам исследования мутагенной активности плазмидной конструкции рNCure не выявлено» [Karagyaur et al, 2021a].

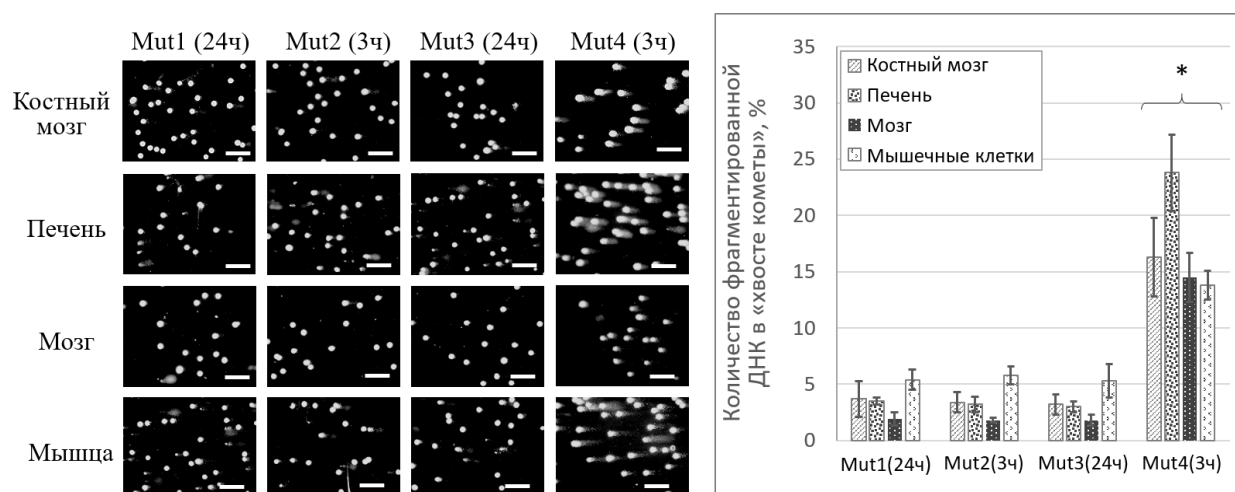


Рисунок 3.64 - Результаты ДНК comet assay мышинных органов и тканей через 3 и 24 часа после введения бицистронной генотерапевтической конструкции рNCure. Длина шкалы - 100 мкм. * - $p < 0.01$ по сравнению с отрицательным контролем (Mut1). Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (ANOVA, тест Сидака-Холма).

Изучение потенциальной генотоксичности бицистронной генетической конструкции рNCure, кодирующей гены BDNF и uPA. Для оценки потенциальной генотоксической активности плазмиды рNCure мы изучили ее способность увеличивать частоту соматической рекомбинации у самок дрозофилы. Спонтанный уровень мутаций и рекомбинаций у дрозофилы не высок и колеблется в пределах 0.3-1.1%. Никаких признаков соматической рекомбинации не было обнаружено у необработанных мух (спонтанная рекомбинация) или после инъекции плазмиды (рVax1 или рNCure). Единственное событие соматической рекомбинации наблюдалось в группе положительного контроля (циклофосфамид 10 мкМ) – фенотип щетинок sn3 у мух y1, sn3+/y1+, sn3 (Таблица 3.1, Рисунок 3.65). Таким образом, введение бицистронной генетической конструкции рNCure эмбрионам дрозофилы в дозе 20 нг/эмбрион не увеличивает частоту соматической рекомбинации (мозаицизма) у самок дрозофилы. По

результатам исследования генотоксической активности плазмидной конструкции pNCure не выявлено.

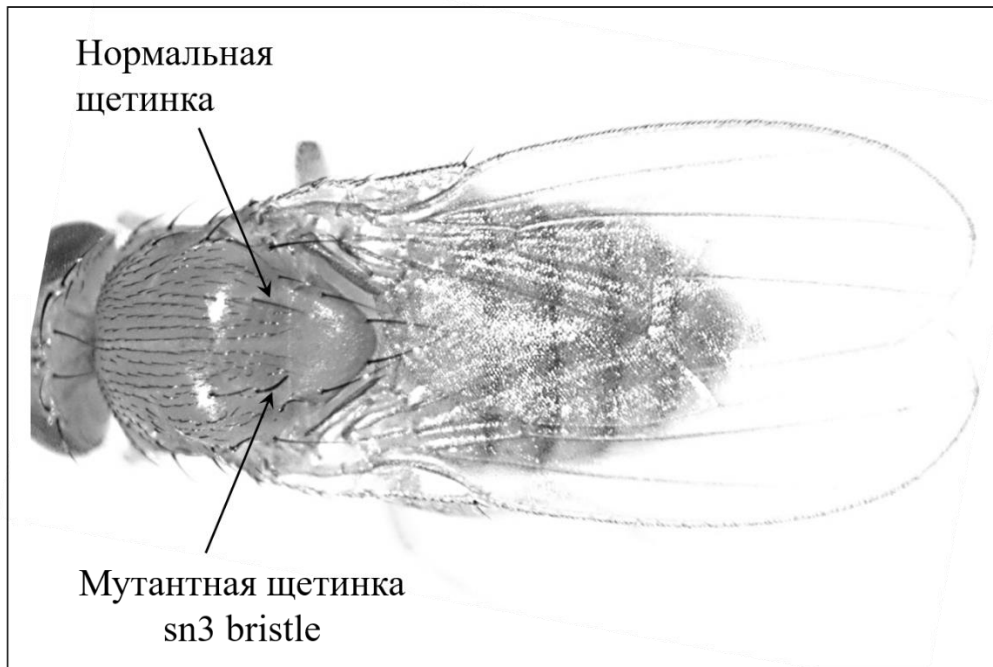


Рисунок 3.65 - Фотография мутантной дрозофилы (фенотип sn3+), полученной в ходе исследования генотоксичности плазмиды pNCure (группа циклофосамид 10 мкМ)

Таблица 3.1 - Результаты исследования генотоксичности плазмиды pNCure на модели соматической рекомбинации дрозофилы

	Без инъекций	pVax1 (Контроль) 1 мг/мл	pNCure, 1 мг/мл	Циклофосфамид 10 мкМ	Циклофосфамид 1 мМ
Количество изученных самок дрозофил	120	133	90	101	100
Количество мутировавших самок дрозофил (sn3+фенотип)	0	0	0	1	0

Полученные результаты свидетельствуют о хорошей переносимости и безвредности бицистронной генотерапевтической конструкции, кодирующей

BDNF и uPA человека, в условиях исследования, а также о том, что при многократном внутримышечном введении в широком диапазоне концентраций она не токсична и не проявляет мутагенного или генотоксического действия. Результаты исследования потенциальной мутагенной и генотоксической активности бицистронной генотерапевтической конструкции являются оригинальными и получены впервые.

3.7.2 Изучение биораспределения и эктопической экспрессии бицистронной генетической конструкции в организме мыши

Повторные инъекции плазмиды с целью повышения ее эффективности и продолжительности экспрессии могут способствовать распространению плазмиды из места инъекции [Hengge et al, 2001; Coelho-Castelo et al, 2006], что потенциально это может привести к эктопической экспрессии факторов роста, закодированных в плазмиде, и вызвать нарушение тканевого гомеостаза, стимулировать рост и метастазирование дормантных опухолей [Huang et al, 2016; Tajbakhsh et al, 2017]. В то же время вопросы эктопической экспрессии факторов роста и безопасности генетических конструкций после их курсового введения на сегодняшний день изучены недостаточно. Для ответа на эти вопросы и проведено следующее исследование.

«На основе калибровки плазмидной ДНК pNCure в образцах сыворотки крови или лизатах органов и тканей (Приложение) получены уравнения, позволяющие определить количество плазмидной ДНК в экспериментальных образцах органов и тканей. Общий вид полученного уравнения: $P = e^{((\Delta Ct - A)/k)}$, где

P – искомое количество плазмидной ДНК в экспериментальном образце,
 ΔCt – пороговое значение цикла для соответствующего образца,

A и k – коэффициенты уравнения $y = k \cdot \ln(x) + A$, описывающие калибровочную кривую. Уравнения, а также калибровочные коэффициенты, полученные в ходе процедуры валидации определения плазмидной ДНК в

образцах сыворотки крови или лизатах органов и тканей, отражены в Таблице 3.2» [Karaguaur et al, 2021a].

Таблица 3.2 - Уравнения калибровки и калибровочные коэффициенты (k, A), полученные в процессе валидации метода ПЦР для обнаружения плазмидной ДНК pNCure в образцах сыворотки крови, органов и тканей экспериментальных животных

Ткань/Орган	Уравнение калибровки	k	A
Легкие	$y=-1.07\ln(x)+11.25$	-1.07	11.25
Почки	$y=-1.33\ln(x)+10.24$	-1.33	10.24
Мозг	$y=-1.33\ln(x)+10.2$	-1.33	10.24
Печень	$y=-1.33\ln(x)+10.3$	-1.29	10.33
Сердце	$y=-1.18\ln(x)+10.79$	-1.18	10.79
Селезенка	$y=-1.13\ln(x)+10.94$	-1.13	10.94
Мышцы	$y=-1.20\ln(x)+11.40$	-1.2	11.4
Сыворотка крови	$y=-1.32\ln(x)+11.15$	-1.32	11.15

Таблица 3.3 - Экспериментально установленные значения LOD (предел детекции) и LOQ (предел количественного определения) обнаружения плазмиды pNCure в образцах органов и тканей экспериментальных животных с использованием ПЦР в реальном времени

Ткань/Орган	LOD, пкг/ПЦР реакцию	LOQ, пкг/ПЦР реакцию
Легкие	1.11	3.71
Почки	0.25	0.683
Мозг	0.814	2.71
Печень	0.138	0.461
Сердце	0.206	0.686
Селезенка	0.137	0.457
Мышцы	0.72	2.4
Сыворотка крови	0.0127	0.0424

С помощью указанных уравнений определяли количество плазмиды pNCure в экспериментальных образцах сыворотки, лизатах органов и тканей. Если количество плазмидной ДНК, определенное в пробах, не превышало

соответствующего предела количественного определения (LOQ), содержание плазмидной ДНК в соответствующих органах и тканях считали достоверно неопределяемым, не превышающим уровень шума ($<LOQ$). Определенные значения LOD (предел обнаружения) и «LOQ для плазмиды pNCure в экспериментальных образцах приведены в Таблице 3.3.

После повторных внутримышечных инъекций плазмиды pNCure наблюдалась ее диссеминация из места введения в органы и ткани» [Karagyaur et al, 2021a]. В большинстве тканей плазида pNCure не обнаруживалась, но в некоторых органах (почках, печени, мышцах места инъекции) ее содержание было довольно высоким (Таблица 3.4).

Максимальный уровень диссеминации плазмиды pNCure от места инъекции в органы и ткани мы наблюдали на 27-й день эксперимента (14 суток с момента последней инъекции). Увеличение дозы плазмиды pNCure с 60 мкг (1 мг/мл) до 120 мкг (2 мг/мл) нелинейно увеличивало количество плазмиды в месте инъекции, но, что удивительно, не усиливало ее распространение из места инъекции. Полученные результаты соответствовали литературным данным. Помимо места инъекции плазида pNCure обнаруживалась в печени (5.2-35.4 нг/г), почках (10.6-43.7 нг/г) и миокарде (8.1-19 нг/г). Но является ли обнаруженная плазмидная конструкция функционально активной в этих органах и тканях?

ИФА-исследование эктопической продукции рекомбинантного hBDNF в некоторых «органах и тканях мышей с наиболее выраженным содержанием плазмидной ДНК pNCure выявило, что уровень продукции hBDNF в этих органах и тканях был ниже минимально выявляемой дозы набора ИФА (20 пг/мл) (Рисунок 3.66). При этом уровень экспрессии рекомбинантного BDNF человека в месте инъекции через 7 суток» [Karagyaur et al, 2021a] после последней инъекции оставался достаточно высоким (14.62 ± 3.65 нг/мл) ($n = 3$). На 41-й день мы наблюдали снижение содержания плазмидной конструкции в органах и тканях мышей.

Таблица 3.4 - Экспериментально установленное содержание плазмиды pNCure в сыворотке крови, лизатах органов и тканей после ее курсового применения

День	Мышь №	Содержание плазмиды pNCure в образцах сыворотки крови (нг/мл), образцах органов и тканей (нг/г)								
		Легкие	Почки	Мозг	Печень	Сердце	Селезенка	Интактная мышца	Место инъекции	Сыворотка крови
	-К	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	pNCure_1 #1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	19.7	<LOQ
	pNCure_1 #2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	13.4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_1 #3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	8.3	<LOQ	<LOQ	77.2	<LOQ
	pNCure_1 #4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_2 #1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	127.6	<LOQ
	pNCure_2 #2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	50.3	<LOQ
	pNCure_2 #3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	203.5	<LOQ
	pNCure_2 #4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	155.7	<LOQ
27	pNCure_1 #1	47.2	43.7	<LOQ	11.1	<LOQ	<LOQ	17.4	32.7	0.058631
	pNCure_1 #2	<LOQ	18.5	<LOQ	5.2	19.0	<LOQ	13.6	27.4	0.058413
	pNCure_1 #3	<LOQ	10.6	<LOQ	16.1	8.1	<LOQ	<LOQ	58.2	0.019976
	pNCure_1 #4	<LOQ	15.8	<LOQ	35.4	9.8	5.8	<LOQ	94.0	0.008879
	pNCure_2 #1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_2 #2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_2 #3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	30.3	0.010445
	pNCure_2 #4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	52.6	0.006862
41	pNCure_1 #1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.010855
	pNCure_1 #2	<LOQ	11.0	28.2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.007994
	pNCure_1 #3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.008608
	pNCure_1 #4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_2 #1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_2 #2	<LOQ	84.3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	90.6	0.004953
	pNCure_2 #3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	11.3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_2 #4	<LOQ	14.1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	5.9	<LOQ	<LOQ	0.005156

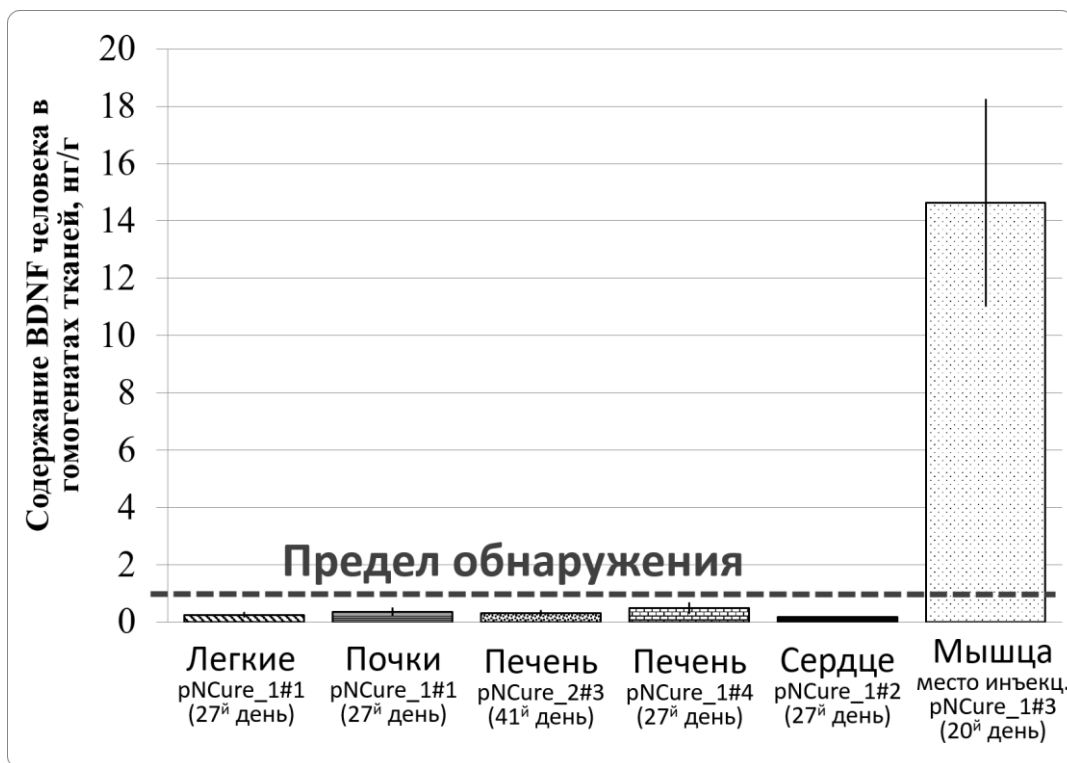


Рисунок 3.66 - Эктопическая продукция рекомбинантного BDNF человека в органах и тканях мышцы с наиболее значимым содержанием бицистронной генетической конструкции pNCure, кодирующей BDNF и uPA человека.

Таким образом, копии плазмиды pNCure, обнаруженные с помощью ПЦР в реальном времени в органах и тканях, оказались нефункциональными. Вероятно, это связано с внеклеточной локализацией плазмидной ДНК, тогда как для трансляции белка плазмиде необходимо попасть в ядро клетки-продуцента, в то же время, плазмиды представляют собой протяженные структуры, а клетки *in vivo* обладают высокой устойчивостью к трансфекции [Hardee et al, 2017]. Все это практически исключает возможность проникновения плазмиды через неповрежденные клеточные мембраны в органы и ткани, отличные от места инъекции, особенно без применения средств трансфекции или прямого повреждающего воздействия (чипование иглой, генная пушка и т.п.). Более того, присутствие плазмиды в агрессивном внеклеточном компартменте при температуре тела быстро приводит к переходу сверхспирализованной и наиболее компактной формы плазмиды в линейаризованную с последующей ее деградацией [Rolland et al, 1998]. Плазмидные генотерапевтические конструкции считаются одним из самых безопасных и многообещающих генетических

инструментов, наиболее близких к использованию в клинике, но их способность диссеминировать и сохраняться в тканях во многом определяется их нуклеотидной последовательностью и типом используемой системы доставки [Lunsford et al, 2000; Gill et al, 2009]. Поэтому, несмотря на полученные оптимистичные результаты, рекомендуется тщательно изучать любую генетическую конструкцию, предполагаемую к использованию в клинике, на предмет ее мутагенности, генотоксичности и способности обеспечивать нежелательную эктопическую экспрессию белков. Результаты диссеминации бицистронной генотерапевтической конструкции pNCure при курсовом внутримышечном введении являются оригинальными и получены впервые.

3.7.3 Изучение потенциальной трансформирующей активности секретома иммортализованных МСК

Результаты анализа мировой литературы и наших собственных исследований (ограниченный пролиферативный потенциал и быстрое старение первично выделенных МСК) свидетельствуют о том, что реальные перспективы выхода в клиническую практику имеют лишь продукты стандартизованных охарактеризованных клеточных линий, например, иммортализованных МСК, более того, в этом исследовании было показано, что иммортализация культуры МСК не влияет на качественный и количественный состав секретома и что он остается стабильным в течение длительного времени пассирования иммортализованной клеточной культуры. С другой стороны, клиническое использование таких линий может быть сопряжено с риском опухолевой трансформации, поскольку в состав секретома входит широкий спектр факторов роста и антиапоптотических молекул, а секретом иммортализованных МСК еще потенциально может содержать теломеразу или кодирующие ее нуклеиновые кислоты.

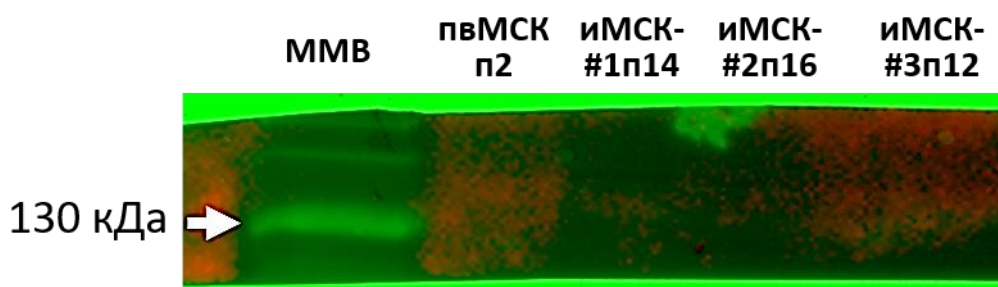
Безопасность секретома первично выделенных МСК была продемонстрирована ранее в целом ряде исследований [Moll et al, 2020; Fathi-Kazerooni et al, 2022; Giovannelli et al, 2023], и было показано, что сам по себе он

не обладает канцерогенным действием и не способен вызывать опухолевую трансформацию [Silver et al, 2000; Onzi et al, 2016]. Для изучения потенциальной трансформирующей активности секрета иммортализованных линий МСК были изучены:

- способность теломеразы переноситься в составе секрета в виде ДНК, РНК или белка;
- способность индуцировать образование колоний первично выделенных фибробластов дермы в тесте soft agar colony formation assay;
- транскриптом первично выделенных фибробластов дермы после воздействия секрета первично выделенных и иммортализованных МСК на предмет изменения экспрессии проонкогенов и антионкогенов.

Изучение способности теломеразы переноситься в составе секрета иммортализованных МСК в виде ДНК, РНК или белка. Результаты анализа показывают, что теломераза в составе секрета иммортализованных МСК не детектируется ни в виде белка (Рисунок 3.67), ни в виде кодирующих ее нуклеиновых кислот (ДНК, РНК). Полученные результаты свидетельствуют о том, что количество теломеразы в составе секрета иммортализованных МСК (в виде белка или кодирующих ее нуклеиновых кислот) находится ниже предела чувствительности использованных методов определения.

hTERT (Теломераза человека) – 127 кДа



TUBA1A (α-тубулин человека) – 50 кДа

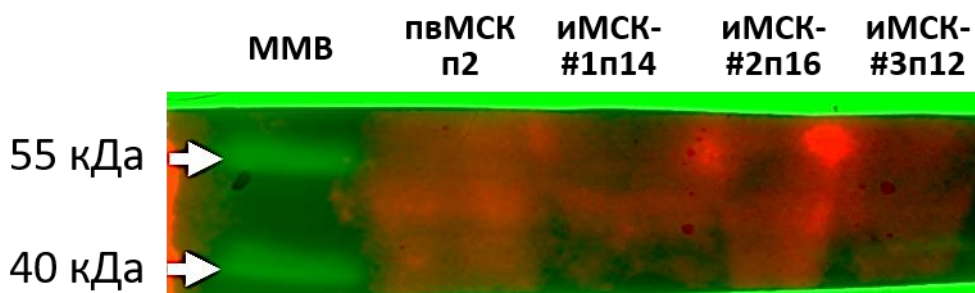


Рисунок 3.67 - Иммуноблоттинг секрета первично выделенных МСК пассажа 2 (пвМСКп2) и иммортализованных МСК линий #1-3 пассажей 12-16 (иМСК-#1п14, иМСК-#2п16, иМСК-#3п12), сконцентрированного в 100 раз, на содержание рекомбинантной теломеразы человека. Ни в одном из образцов теломераза не детектируется.

Изучение способности секрета иммортализованных МСК индуцировать образование колоний первично выделенных фибробластов дермы в тесте soft agar colony formation assay. Результаты анализа показывают, что секретом иммортализованных МСК не приводит к увеличению образования колоний первично выделенных фибробластов дермы в тесте soft agar colony formation assay. В контрольных и экспериментальных лунках визуализируются одиночные клетки, клетки, расположенные парами (находились в митозе в процессе посева), однако истинные колонии, содержащие более 4 клеток наблюдаются только в группах положительного контроля (3мМ нитрит натрия (NaNO₂) или 0.01% диметилсульфат). Распределение одиночных клеток, клеточных дулетов и клеточных колоний по группам и примеры микроскопической картины одиночных клеток и клеточных колоний отражены

на рисунке 3.68. Полученные результаты свидетельствуют о том, что секретом immortalized MSCs, как и секретом первично выделенных MSCs, не оказывает стимулирующего влияния на образование колоний первично выделенными фибробластами, заключенными в агарозу, т.е. не обладает трансформирующей активностью.

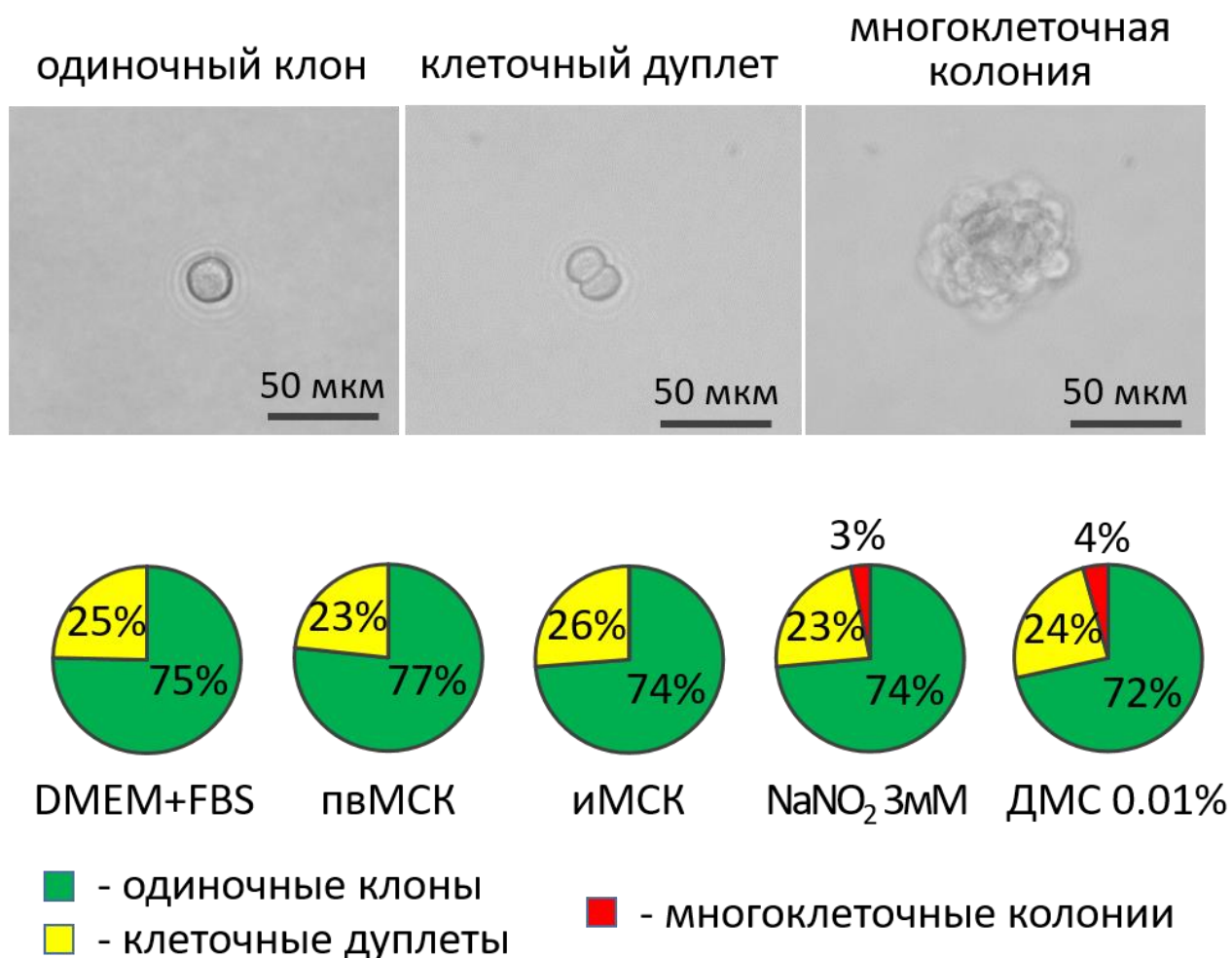


Рисунок 3.68 - Результаты оценки трансформирующей активности секрета immortalized MSCs в модели колониобразования *in vitro* soft agar colony formation assay. Вверху приведены примеры микроскопической картины одиночных клеток и клеточных колоний, внизу - распределение одиночных клеток, клеточных дуплетов и клеточных колоний по группам. DMEM+FBS (контроль) - среда роста, пвМСК - первично выделенные MSCs, иМСК - immortalized MSCs, ДМС - диметилсульфат.

Сравнительный анализ транскриптомов первично выделенных фибробластов дермы, обработанных секретами первично выделенных и иммортализованных МСК, на предмет изменения экспрессии онкогенов и антионкогенов. При анализе результатов транскриптомного исследования особое внимание уделяли изменению экспрессии генов супрессоров опухолей (*APC, BRCA1, BRCA2, CDKN2A, DENND2B, FAS, NF1, PTCH, RB1, ST7, ST14, TP53, VHL, YPEL3* и др.) и потенциальных проонкогенов (*BTK, EGFR, ERBB2, FLK1, FLT1, FLT4, HRAS, KRAS, MYC, MYCL, MYCN, NRAS, PDGFR, RAF1, SRC, WWTR1, YAP1* и др.).

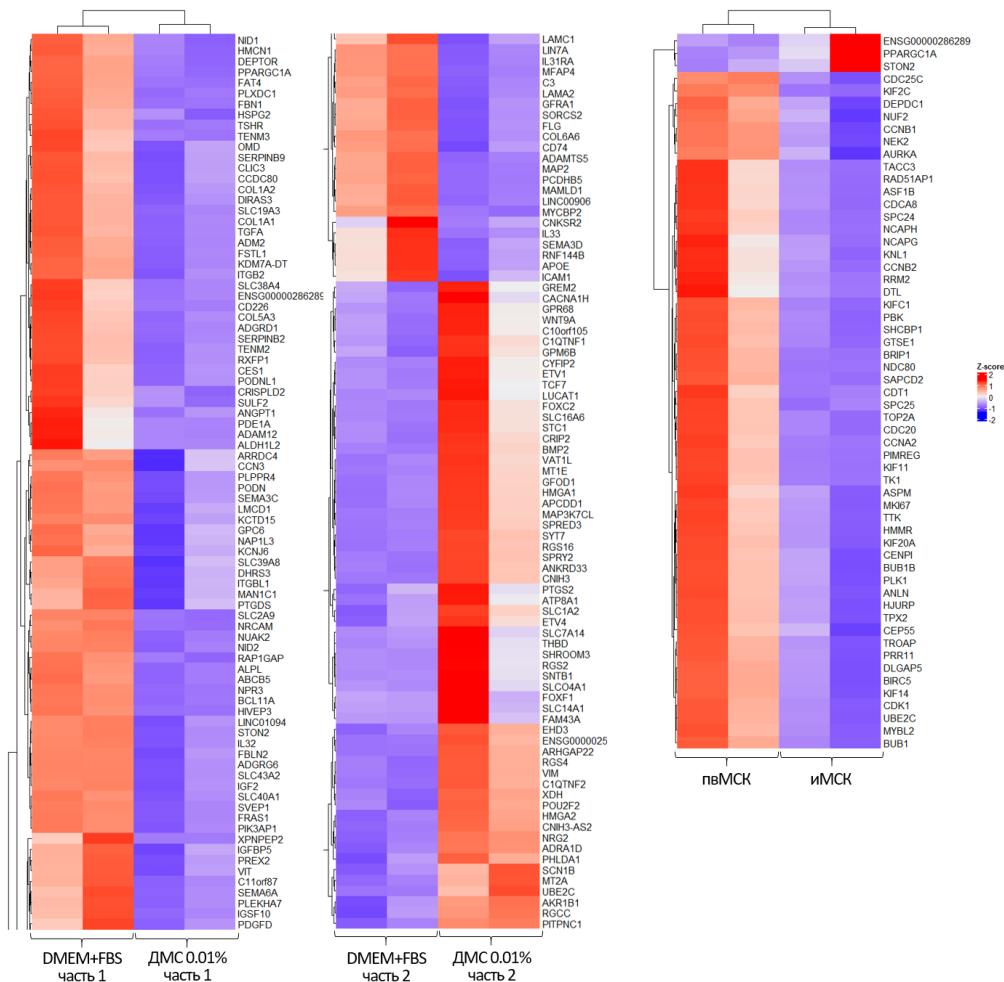


Рисунок 3.69 - Результаты сравнительного анализа (heat-map) транскриптомов первично выделенных фибробластов дермы человека, обработанных секретами первично выделенных и иммортализованных МСК (пвМСК и имМСК, соответственно). Группы контроля - среда роста (DMEM + FBS), ДМС (диметилсульфат) 0.01% и NaNO_3 3мМ. Существенных различий в изменении экспрессии проонкогенов и антионкогенов идентифицировать не удалось.

Транскриптомный анализ лизатов первично выделенных фибробластов дермы человека ($n = 2$), обработанных секретом МСК, показал, что секретом иммортализованных МСК не изменяет уровень экспрессии 99.7% генов (19279 из 19336), в том числе, и генов супрессоров опухолей и потенциальных проонкогенов по сравнению с таковым, наблюдаемым при воздействии секрета первично выделенных МСК (Рисунок 3.69).

В группах положительного контроля (3мМ нитрит натрия (NaNO_2) или 0.01% диметилсульфат) наблюдали изменения транскрипционной активности 0.6% и 0.8% генов, однако, среди них не было идентифицировано генов протоонкогенов и антионкогенов, вовлеченных в опухолевую трансформацию клеток (Рисунок 3.69). Предположительно, такое расхождение результатов теста на колониобразование *in vitro* (soft agar colony formation assay) с результатами транскриптомного анализа объясняется невысоким процентом трансформировавшихся под действием нитрита натрия и диметилсульфата фибробластов и относительным низким содержанием (ниже предела чувствительности метода) транскриптов антионкогенов и проонкогенов.

Полученные результаты позволяют утверждать, что секретом иммортализованных МСК по своей трансформирующей активности не отличается от таковой первично выделенных МСК. Результаты исследования потенциальной трансформирующей (проонкогенной) активности секрета иммортализованных МСК являются оригинальными и получены впервые.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ограниченная способность нервной ткани к регенерации является не только фундаментальной, но острой медико-социальной проблемой, что обуславливает необходимость изучения механизмов повреждения, нейропротекции и регенерации нервной ткани, а также вовлеченных в этот процесс молекул. В ходе проведенного исследования был изучен нейропротективный и прорегенераторный потенциал комбинации мозгового нейротрофического фактора (BDNF) и урокиназного активатора плазминогена (uPA) в моделях острого повреждения центральной и периферической нервной системы. Комбинация BDNF и uPA обладала более выраженной нейропротективной активностью в моделях травмы периферического нерва и интрацеребральной посттравматической гематомы (модель геморрагического инсульта) и способностью стимулировать регенерацию нервной ткани в этих моделях по сравнению с действием BDNF или uPA по-отдельности, что дополнительно подтверждалось результатами *in vitro* исследований. В ходе проведенного исследования впервые была продемонстрирована возможность осуществления нейропротекции в модели геморрагического инсульта, причем было показано, что нейропротекция ткани мозга в этой модели может быть стимулирована введением комбинации BDNF и uPA или же секрета мезенхимных стромальных клеток (МСК) при различных путях введения. Было установлено, что наблюдаемый нейропротективный эффект является дозозависимым, видоспецифичным и определяется временем, способом и кратностью введения, а также составом применяемой композиции. Полученные в ходе исследования результаты свидетельствуют о необходимости тщательного изучения каждой новой предлагаемой комбинации молекул для стимуляции процесса регенерации ввиду возможных непрогнозируемых токсических или потенцирующих эффектов, возникающих в биологических системах.

Изучение механизмов нейропротективной и прорегенераторной активности комбинации BDNF и uPA (в виде рекомбинантных белков или в составе секрета МСК) позволило установить, что в ее реализацию вовлечены

механизмы прямой нейропротекции мозговой ткани и нейритогенеза, нейтрализация действия повреждающего фактора (излившаяся кровь) и модуляция активности иммунных клеток в области повреждения, причем, значимую роль в этих процессах играют BDNF и uPA.

В ходе выполнения исследования было создано несколько линий мезенхимных стромальных клеток человека: иммортализованных и генетически модифицированных. Проведенное исследование позволило установить, что процедура иммортализации увеличивает пролиферативный потенциал клеточной культуры и позволяет сохранить стабильность качественного и количественного состава продуцируемого ими секрета в течение по меньшей мере 20 пассажей. Сам секретом иммортализованных МСК по содержанию ростовых факторов значимо не отличается от такового исходной клеточной культуры МСК, не содержит детектируемые количества рекомбинантной теломеразы и не обладает способностью вызывать опухолевую трансформацию первично выделенных клеток.

Факторы роста, с одной стороны, стимулируют процессы регенерации, а, с другой стороны, могут вызывать нежелательные побочные эффекты: опухолевую трансформацию первичных клеток, избыточный нейрито- и ангиогенез, сенсбилизацию органов (для нейротрофинов) и т.п., а при избытке обладать прямым токсическим действием. В рамках оценки безопасности бицистронной генетической конструкции, кодирующей BDNF и uPA, было экспериментально продемонстрировано отсутствие у нее токсического действия при ежедневном хроническом введении в течение 30 суток, генотоксического и мутагенного действия. Было установлено, что данная плазмидная конструкция способна к диссеминации из места введения при курсовом применении, однако, это не приводит к эктопической экспрессии закодированных в ней белков, что позволяет избежать связанных с этим нежелательных побочных эффектов ее применения. Полученные результаты являются оригинальными и получены впервые.

«Результаты проведенного исследования позволили не только лучше понять механизмы повреждения и регенерации нервной ткани, но и выявить потенциальные "точки приложения" для перспективных терапевтических подходов» (стимуляция нейропротекции и нейритогенеза, подавление нейровоспаления), а также установить и экспериментально доказать важный вклад BDNF и uPA в составе секрета МСК для стимуляции нейропротекции ткани головного мозга в модели интрацеребральной посттравматической гематомы. Полученные результаты закладывают основу для разработки перспективных биомедицинских препаратов на основе клеточного секрета для стимуляции регенерации центрального и периферического отдела нервной системы после повреждения.

ВЫВОДЫ

1. Процессы регенерации нервной ткани могут быть стимулированы комбинацией молекул, обладающих комплементарной функциональной активностью. В качестве сочетания факторов, обладающих выраженной нейропротективной и прорегенераторной активностью в отношении нервной ткани, предложена комбинация мозгового нейротрофического фактора (BDNF), стимулирующего трофику и регенерацию нервной ткани, и урокиназного активатора плазминогена (uPA), обладающего способностью активировать фибринолиз, стимулировать активацию факторов роста, миграцию клеток, нейритогенез и ангиогенез.

2. Созданные плазмидные и вирусные генотерапевтические конструкции обеспечивают экспрессию комбинации белков BDNF и uPA в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

3. Комбинированная экспрессия BDNF и uPA, закодированных в составе плазмидной бицистронной генетической конструкции pNCure, стимулирует восстановление функции и структуры поврежденного периферического нерва. Установлено, что бицистронная генотерапевтическая конструкция, кодирующая комбинацию BDNF и uPA, не обладает токсическим и мутагенным действием, а также не приводит к эктопической экспрессии закодированных в ней белков. На основании полученных результатов был разработан прототип комбинированного генотерапевтического препарата для стимуляции нейропротекции и регенерации поврежденных нервных волокон периферического отдела нервной системы.

4. Впервые экспериментально продемонстрирована способность белковой формы урокиназного активатора плазминогена потенцировать нейропротекторную активность мозгового нейротрофического фактора в модели интрацеребральной посттравматической гематомы, что проявляется в снижении тяжести неврологических нарушений у экспериментальных животных и уменьшении размеров очага повреждения. В то же время, комбинация генов BDNF и uPA в составе бицистронных генетических конструкций не обладает

нейропротективной активностью в модели геморрагического инсульта. По крайней мере отчасти, это обусловлено недостаточным уровнем трансфекции клеток мозга целевыми генами в очаге повреждения.

5. Созданы линии МСК: иммортализованные, с конститутивной и индуцируемой гиперэкспрессией BDNF, uPA и проангиогенных факторов (VEGF). Все они обеспечивают продукцию терапевтически значимых концентраций факторов роста BDNF и uPA.

6. Впервые экспериментально обоснована возможность нейропротекции мозговой ткани после интрацеребральной посттравматической гематомы (геморрагического инсульта) с помощью экзогенного введения секрета МСК. Нейропротективный эффект МСК проявляется в увеличении выживаемости животных, снижении тяжести неврологических нарушений и уменьшении объема очага повреждения, причем данный эффект проявляется при различных путях и схемах введения секрета МСК в широком диапазоне его концентраций. Секретом иммортализованных МСК не обладает проканцерогенной трансформирующей активностью. На основании полученных результатов разрабатывается прототип биологического лекарственного препарата на основе секрета МСК для лечения острых повреждений мозговой ткани.

7. Установлено, что нейропротективная активность секрета МСК и комбинации BDNF и uPA, по крайней мере отчасти, обусловлена прямой нейропротекцией нейральных клеток, способностью стимулировать рост нейритов и подавлять иммунно-опосредованные механизмы повреждения нервной ткани (вторичное повреждение). Инактивация BDNF и uPA снижает выраженность нейропротекторных свойств секрета МСК.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

В рамках данного исследования была проведена разработка и оценка эффективности и безопасности ряда генно-клеточных композиций для комплексной нейропротекции и стимуляции регенерации нервной ткани: комбинированная генотерапевтическая конструкция для стимуляции регенерации поврежденного периферического нерва, белковые композиции на основе секрета первично выделенных и геномодифицированных МСК, а также рекомбинантных белков BDNF (мозговой нейротрофический фактор) и uPA (урокиназный активатор плазминогена) человека.

Разработаны подходы иммортализации и генетической модификации первично выделенных МСК с целью стандартизации состава, усиления и/или модификации терапевтической активности их секрета. Показано, что иммортализация клеточной культуры МСК замедляет ее старение, что позволяет на ее основе получать фармакологически значимые количества секрета с относительно постоянным качественным и количественным составом, и делает трансляцию предложенной технологии в клиническую практику принципиально возможной.

Полученные результаты позволяют идентифицировать новые молекулярные и клеточные мишени для разработки перспективных подходов к стимуляции нейропротекции и регенерации нервной ткани. Результаты изучения нейропротективной активности секретов генетически модифицированных МСК свидетельствуют о необходимости тщательного изучения каждой новой предлагаемой комбинации молекул для стимуляции процесса регенерации ввиду возможных непрогнозируемых токсических или потенцирующих эффектов, возникающих в биологических системах.

В исследовании проведен комплексный анализ безопасности бицистронной генетической конструкции, кодирующей BDNF и uPA, (субхроническая токсичность, генотоксичность, канцерогенность, мутагенность и способности диссеминировать из места введения при курсовом применении), который показал, что бицистронная плазмидная конструкция, кодирующая BDNF и uPA,

является безопасной, не вызывает эктопической экспрессии закодированных в ней факторов роста. В исследовании показано отсутствие трансформирующей способности секрета иммортализованных МСК и фактическое отсутствие теломеразы в составе секрета иммортализованных МСК.

Результаты, полученные, в ходе исследования демонстрируют, что разработанные генно-клеточные препараты (бицистронная плазмидная конструкция, кодирующая BDNF и uPA; секретом первично выделенных и иммортализованных МСК) безопасны, обладают выраженной нейропротективной активностью и стимулируют восстановление структуры и функции поврежденной центральной и периферической нервной ткани и после завершения доклинических испытаний «могут быть рекомендованы для разработки подходов к генно-клеточной терапии социально значимых заболеваний человека» [Primak et al., 2024a], таких как: «травматическое повреждение периферических нервных стволов и головного мозга, острые нарушения мозгового кровообращения по геморрагическому и ишемическому типу.

Используемые в работе экспериментальные и методические подходы расширяют потенциал регенеративной медицины и открывают перспективу для разработки и создания эффективных и безопасных генно-клеточных препаратов» [Басалова и др., 2023; Primak et al., 2024a] для стимуляции регенерации и обновления клеток и тканей и терапии патологий без существующего эффективного патогенетического лечения.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ - аденозиндифосфат;
АКТГ4-10 - Фрагмент адренокортикотропного гормона (4-10 аминокислоты);
АТФ - аденозинтрифосфат;
АФК - Активные формы кислорода;
ВК - вместе с кровью (введение плазмидных конструкций в очаг повреждения головного мозга);
ВКМ - Внеклеточный Матрикс;
ГМ-КСФ - Гранулоцитарно-моноцитарный колоние-стимулирующий фактор роста;
ГСК - Гематопоэтические стволовые клетки;
ГЭБ - Гематоэнцефалический барьер;
ДКИ - Доклинические исследования;
иBU - Клеточная линия (или ее секретом), обеспечивающая индуцируемую продукцию BDNF и uPA;
ish - Клеточная линия (или ее секретом), обеспечивающая индуцируемую продукцию shRNA к мРНК VHL;
иМСК - Иммуортиализованные МСК;
иПСК - Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки;
кBU - Клеточная линия (или ее секретом), обеспечивающая конститутивную продукцию BDNF и uPA;
ksh - Клеточная линия (или ее секретом), обеспечивающая конститутивную продукцию shRNA к мРНК VHL;
кДа - килодальтон;
кДНК - кодирующая ДНК;
КИ - Клинические исследования;
кМСК - МСК крысы;
КП - Контроль на повреждение;
ЛВЧ - Лентивирусные частицы;
ЛО - Ложно оперированный;
мВ - миллиВольт;
ММФ - моноцитарно-макрофагальной фракции;
мРНК - матричная РНК;
МРТ - Магнитно-резонансная томография;
мс - миллисекунда;
МСК - Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки;
НС - Нервная Система;
НСК - Нейральные стволовые клетки;
ОНМК - Острое нарушение мозгового кровообращения;
пвМСК - первично выделенные МСК;

ПК - после крови (введение плазмидных конструкций в очаг повреждения головного мозга);

ПНС - Периферическая Нервная Система;

ПО - Программное обеспечение;

СПДН - Суммарный потенциал действия нерва;

ЦНС - Центральная Нервная Система;

чМСК - МСК человека;

ЧМТ - Черепно-мозговая травма;

ЭДТА - Этилендиаминтетрауксусная кислота;

ЭКГ - Электрокардиография;

AAV - Adeno-associated virus (Аденоассоциированный вирус);

aBDNF - нейтрализующие антитела к Brain-Derived Neurotrophic Factor (Мозговой нейротрофический фактор);

АII₁R - Angiotensin-II type-I receptor (Рецептор Ангиотензина-II);

АМФК- α 1 - AMP-activated protein kinase (АМФ-активируемая протекиназа α 1);

ANOVA - ANalysis Of Variance (Дисперсионный анализ);

Bax - BCL2 associated X, Apoptosis Regulator (BCL2-ассоциированный X, регулятор апоптоза);

Bcl-2 - Регулятор апоптоза Bcl-2;

BDNF - Brain-Derived Neurotrophic Factor (Мозговой нейротрофический фактор);

Brain-Derived Neurotrophic Factor (Мозговой нейротрофический фактор);

BMP - Bone morphogenetic protein (Костный морфогенетический белок);

BU - комбинация BDNF и uPA;

CCL2 - C-C motif ligand 2;

CD - Cluster of differentiation (Кластер дифференцировки);

CMV - Citomegalovirus (Цитомегаловирус);

CNTF - Ciliary neurotrophic factor (Цилиарный нейротрофический фактор);

COX2 - Cyclooxygenase-2 (Циклооксигеназа -2);

CTGF - Connective tissue growth factor (Фактор роста соединительной ткани);

CXCL1 - CXC motif chemokine ligand 1 (Хемокиновый лиганд 1, содержащий CXC-мотив);

DAMPs - Damage-associated molecular patterns (Молекулярные паттерны, связанные с повреждениями);

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium (Среда Игла, модифицированная Дульбекко);

DMEM-LG - Dulbecco's Modified Eagle Medium - Low Glucose (Среда Игла, модифицированная Дульбекко, с низким содержанием глюкозы);

DMS - Dimethyl sulfate (Диметилсульфат);

DPBS - Dulbecco's phosphate-buffered saline (Фосфатно-солевой буфер Дульбекко);

EGF - Epidermal Growth Factor (Эпидермальный фактор роста);

ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay (Иммуноферментный анализ);
ERK - Extracellular signal-regulated kinase (Киназа, регулируемая внеклеточными сигналами);
FBS - Fetal bovine serum (Фетальная бычья сыворотка);
FGFR - Fibroblast Growth Factor Receptor (Рецептор фактора роста фибробластов);
GDNF - Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor (Глиальный нейротрофический фактор);
GFP - Green fluorescent protein (зеленый флуоресцентный белок);
GM-CSF - Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор);
GMFB - Glia Maturation Factor Beta (Фактор созревания глии бета);
HCV - Hepatitis C virus (Гепатит вируса С);
HDGF - Heparin Binding Growth Factor (Гепарин-связывающий фактор роста);
HEK293T - Human embryonic kidney 293T (Клетки эмбриональной почки человека 293T);
HGF - Hepatocyte Growth Factor (Гепатоцитарный фактор роста);
HIF-1 α - Hypoxia-inducible factor 1-alpha (Фактор 1-альфа, индуцируемый гипоксией);
HLA-DR - Human Leukocyte Antigen – DR isotype (Лейкоцитарный антиген человека – изотип DR);
IDO - Indoleamine 2,3-dioxygenase (Индоламин 2,3-диоксигеназа);
IFN γ - Interferon gamma (Интерферон гамма);
IGF-I - Insulin-like growth factor 1 (Инсулиноподобный фактор роста 1);
IL-1 β - Interleukin-1 β (Интерлейкин-1 β);
IL4R - Interleukin-4 Receptor (Рецептор интерлейкина-4);
IRAK - Interleukin-1 receptor associated kinase (Киназа, связанная с рецептором интерлейкина-1);
IKK - I κ B kinase (Киназа I κ B);
IRES - Internal ribosome entry site (Сайт внутренней посадки рибосомы);
ISCT - International Society for Cellular Therapy (Международное общество клеточной терапии);
i α PA - ингибитор к α PA;
JAK - Janus kinase (Янус - киназа);
JNK - c-Jun N-terminal kinase (c-Jun N-концевая киназа);
KGF - Keratinocyte Growth Factor (Фактор роста кератиноцитов);
LIF - Leukemia inhibitory factor (Фактор ингибирования лейкемии);
LOQ - Limit of quantification (Предел количественного определения);
MAG - Myelin-associated glycoprotein (Миелин-ассоциированный гликопротеин);
MCP-1 - Monocyte Chemoattractant Protein 1 (Моноцитарный хемоаттрактантный белок 1);

M-CSF - Macrophage colony-stimulating factor (Макрофагальный колониестимулирующий фактор);
 MMLV - Moloney Murine Leukemia Virus (Вирус мышиноного лейкоза Молони);
 MMP - Matrix metalloproteinase (Матриксная металлопротеиназа);
 MW - Molecular weight (Молекулярный вес);
 NCAM - Neural cell adhesion molecule 1 (Молекула адгезии нервных клеток 1);
 NEGR1 - Neuronal Growth Regulator 1 (Регулятор роста нейронов 1);
 NENF - Neudesin Neurotrophic Factor (Нейдезин Нейротрофический Фактор);
 NGF - Nerve Growth Factor (Фактор роста нервов);
 NMDA - N-methyl-D-aspartate (N-метил-D-аспартат рецептор);
 NP1 и NP2 - нейропилины 1 и 2;
 NT-3 - Neurotrophin-3 (Нейротрофин-3);
 NT-4/5 - Neurotrophin-4/5 (Нейротрофин-4/5);
 OLFML3 - Olfactomedin-like protein 3 (Ольфактомединоподобный белок 3);
 Omgp - Oligodendrocyte myelin glycoprotein (Олигодендроцитарный миелиновый гликопротеин);
 p75NTR - Low-affinity nerve growth factor receptor (Низкоаффинный рецептор фактора роста нервов);
 PACE - Paired basic amino acid cleaving enzyme (Фермент, расщепляющий парные основные аминокислоты);
 PAI-1 - Plasminogen activator inhibitor-1 (Ингибитор активатора плазминогена-1);
 PAR-1 - Protease-activated receptor-1 (Протеазо-активируемый рецептор-1);
 PC - Prohormone convertases (Конвертаза прогормонов);
 PDGF - Platelet Derived Growth Factor (Фактор роста тромбоцитов);
 PEDF - Pigment epithelium-derived factor (Фактор роста, выделенный из пигментного эпителия);
 PERV - Porcine Endogenous Retroviruses (Эндогенный ретровирус свиней);
 PI3K - Phosphoinositide 3-Kinase (Фосфоинозитид-3-киназа);
 PLC- γ - Phosphoinositide phospholipase C (Фосфоинозитидфосфолипаза C);
 PlGF - Placental growth factor (Плацентарный фактор роста);
 pNCure - Plasmid for nerve Cure (Плаزمид для лечения нервной ткани);
 pVax1-hBDNF - Плазмидная генотерапевтическая конструкция, кодирующая мозговой нейротрофический фактор человека;
 PVDF - Polyvinylidene fluoride (Поливинилиденфторид);
 rBDNF - рекомбинантный BDNF;
 RFP - Red fluorescent protein (Красный флуоресцентный белок);
 RFTN1 - Raftlin, Lipid Raft Linker 1 (Рафтлин, липидный рафт-линкер 1);
 RNA, РНК - Ribonucleic acid (Рибонуклеиновая кислота);
 RT - Reverse transcription (Обратная транскрипция);
 SDF - Stromal cell-derived factor-1 (Фактор-1, полученный из стромальных клеток);

shRNA - Short hairpin RNA (Короткая шпилечная РНК);
SHV - Suid HerpesVirus 1 (Герпесвирус 1);
siRNA - Small interfering RNA (Малая интерферирующая РНК);
SMAD2/3 - Similar to Mothers Against Decapentaplegic;
STAT - Signal Transducer and Activator of Transcription (Преобразователь сигнала и активатор транскрипции);
TCN2 - Transcobalamin 2 (Транскобаламин-2);
TERT - Telomerase reverse transcriptase (Теломераза обратная транскриптаза);
TGFb1 - Transforming Growth Factor beta 1 (Трансформирующий фактор роста бета 1);
TIMP - Tissue inhibitor of metalloproteinase (Тканевой ингибитор металлопротеиназы);
TNF α - Tumor necrosis factor alpha (Фактор некроза опухоли альфа);
tPA - Tissue-type plasminogen activator (Тканевой активатор плазминогена);
trk - tropomyosin receptor kinase (киназа рецептора тропомиозина);
uPA - Urokinase-type plasminogen activator (Урокиназный активатор плазминогена);
uPAR - Urokinase-type plasminogen activator Receptor (Рецептор урокиназного активатора плазминогена);
VASN - Vasorin (Вазорин);
VEGF - Vascular endothelial growth factor (Фактор роста сосудистого эндотелия);
VEGFR - Vascular endothelial growth factor Receptor (Рецептор фактора роста сосудистого эндотелия);
VHL - Von Hippel–Lindau tumor suppressor (Супрессор опухоли фон Хиппель-Линдау);
WHV - Woodchuck hepatitis virus (Вирус гепатита сурка);
WPRE - WHP Posttranscriptional Response Element (Посттранскрипционный элемент вируса гепатита сурка);
 β -Gal - Beta galactosidase (Бета-галактозидаза).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Басалова Н.А., Джауари С.С., Юршев Ю.А. и др. State-of-the-art: применение внеклеточных везикул и препаратов на их основе для нейропротекции и стимуляции регенерации ткани головного мозга. *Нейрохимия* 2023, 40(4): 367-380
2. Борисевич И.В., Журавлева М.В., Мовсесянц А.А. и др. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. — М.: Гриф и К, 2014 — 328 с., раздел 12.1.4.8
3. Вардья И.В. Экспериментальная модель денервационно-реиннервационного синдрома: облегчающие эффекты семакса и урокиназы [диссертация], 2002, <https://istina.msu.ru/dissertations/2492344/>
4. Володеева Е.А., Самарина С.Ю., Глотова М.Е., Куртин А.Н. Эффективность комплексной реабилитации пациентов, перенесших инсульт, с использованием препарата Целлекс. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2020;120(8):34-41. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/jnevro202012008134>
5. Ганнушкина И.В. Мозговое кровообращение при различных видах циркуляторной гипоксии мозга. *Вестник российской академии медицинских наук*, 2000, 9, 22-27.
6. Гомазков ОА - Нейротрофическая регуляция и стволовые клетки мозга, Издательство «Икар», 2006.
7. Горбачева Л.Р., Помыткин И.А., Сурин А.М., Абрамов Е.А., Пинелис В.Г. Астроциты и их роль в патологии центральной нервной системы. *Российский педиатрический журнал*. 21(1):46–53, 2018.
8. Джауари С.С., Изучение нейропротекторных свойств секретора мезенхимных стромальных клеток на модели интрацеребральной посттравматической гематомы (геморрагического инсульта), Кандидатская диссертация, МГУ имени М.В. Ломоносова, 2024, Защищена в совете МГУ.015.7 МГУ имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет
9. Древаль О.Н., Кузнецов А.В., Джинджихадзе Р.С., Пучков В.Л., Берснев В.П., Клинические рекомендации по диагностике и хирургическому лечению повреждений и заболеваний периферической нервной системы, Москва, 2015
10. Калинина Н.И., Сысоева В.Ю., Рубина К.А., Парфенова Е.В., Ткачук В.А. - Мезенхимальные стволовые клетки в процессах роста и репарации тканей, *Acta Naturae*, том 3, № 4(11), с. 32-39
11. Калинина Ю.А., Гилерович Е.Г., Коржевский Д.Э. Астроциты и их участие в механизмах терапевтического действия мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при ишемическом повреждении головного мозга. *Гены и клетки*. 2019,14(1):33-40.
12. Карагяур М.Н., Влияние мезенхимальных стволовых клеток на восстановление периферического нерва после травмы, Кандидатская диссертация, МГУ имени М.В. Ломоносова, 2013, Защищена в совете Д 208.073.01 при Российском кардиологическом научно-производственном комплексе
13. Карагяур М.Н., Макаревич П.И., Шевченко Е.К. и др. Современные подходы к регенерации периферических нервов после травмы: перспективы генной и клеточной терапии. *Гены и клетки* 2017; 12(1): 6-14
14. Клинические рекомендации. Геморрагический инсульт. 2022. Ссылка активна на 17.07.23. https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/523_2
15. Клинические рекомендации. Ишемический инсульт и транзиторная ишемическая атака у взрослых. 2022. Ссылка активна на 17.07.23. https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/171_2
16. Ключихина О.А., Шпрах В.В., Стаховская Л.В., Полунина Е.А. Анализ среднемноголетней заболеваемости и смертности от инсульта в регионах Российской Федерации, вошедших в федеральную программу реорганизации помощи пациентам с инсультом. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2020;120(2):37–41.

17. Кхир Бек М., Алехин А.И., Голубев В.Г., Юлов В.В. Оптимальный способ лечения больных травмой лучевого нерва. Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2011;(12):23-28.
18. Лаврик С.Ю., Борисов А.С., Шпрах В.В. Опыт применения полипептидного препарата Целлекс у пациентов с комплексным и центральным апноэ сна в раннем восстановительном периоде ишемического инсульта. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. 2021;121(3-2):29-32. <https://doi.org/10.17116/jnevro202112103229>
19. Латышева В.Я., Олизарович М.В., Курман В.И., Лызикова Т.В. Неотложные состояния в неврологии и нейрохирургии: учебно методическое пособие для для практических занятий студентов 6 курса лечебного факультета медвузов. Гомель: ГомГМУ; 2011.
20. Макаренко А.Н., Косицын Н.С., Пасикова Н.В., Свинов М.М. Метод моделирования локального кровоизлияния в различных структурах головного мозга у экспериментальных животных. Журнал высшей нервной деятельности имени И.П.Павлова, 2002, 52(6), 765-768.
21. Масгутов Р. Ф., Ризванов А. А., А.А. Богов (Мл.), Галлямов А. Р., Киясов А. П., Богов А. А. Современные тенденции лечения повреждений периферических нервов // ПМ. 2013. №1-2 (69).
22. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д., Васильев А.Н. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с., глава 32, п. 1.4
23. Одинак ММ, Живолупов СА - Заболевания и травмы периферической нервной системы. Санкт-Петербург, Издательство "СпецЛит", 2009.
24. Патент РФ на изобретение №2620167/ 21.12.2015. Бюл. №15. Ткачук В.А., Акопян Ж.А., Ефименко А.Ю., Григорьева О.А., Калинина Н.И., Кочегура Т.Н., Сагарадзе Г.Д., Сысоева В.Ю., Тарасова Е.В., Чапленко А.А. Способ получения средства для стимуляции регенерации на основе продуктов секреции мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека. Ссылка активна на 17.07.23. <https://patentimages.storage.googleapis.com/8c/80/44/9b8a61674da612/RU2620167C1.pdf>
25. Патент РФ на изобретение №2637407/ 01.06.2016. Бюл. №34. Шевела Е.Я., Сахно Л.В., Кафанова М.Ю., Давыдова М.Н., Андрушкевич М.М., Останин А.А., Черных Е.Р. Способ получения кондиционной среды, обладающей регенераторным потенциалом, для интраназального введения при лечении заболеваний центральной нервной системы. Ссылка активна на 17.07.23. <https://patentimages.storage.googleapis.com/0f/97/e5/143cbff816b8c7/RU2637407C1.pdf>
26. Патент РФ на изобретение №2742034/ 04.10.2018. Бюл. №4. Романов Ю.А., Прошкин А.Ю., Прошкин С.Д., Волгина Н.Е., Романов А.Ю., Дугина Т.Н., Смирнов В.Н., Сухих Г.Т. Бесклеточные терапевтические средства для регенеративной медицины и способы их получения. Ссылка активна на 17.07.23. <https://patentimages.storage.googleapis.com/62/09/79/6f3a9dde371307/RU2742034C2.pdf>
27. Патент РФ на изобретение №2803286/ 12.09.2023. Бюл. №26. Ткачук В.А., Акопян Ж.А., Садовничий В.А., Карагяур М.Н., Джауари С.С., Ефименко А.Ю., Басалова Н.А., Попов В.С., Тарасова Е.В., Александрович Н.А., Скрыбина М.Н., Примаков А.Л., Григорьева О.А., Калинина Н.И., Сысоева В.Ю. Композиция для нейропротекции и стимуляции нейрорегенерации головного мозга после повреждения, средство на ее основе, способ его получения и применения. Ссылка активна на 17.12.23. <https://www.fips.ru/iiss/document.xhtml?faces-redirect=true&id=07dd0b8f80a7e8b863e2642c18ea0106>
28. Шанько Ю.Г., Кульчицкий В.А., Смянович А.Ф., Новицкая В.В., Зафранская М.М., Кривенко С.И., Пашкевич С.Г., Стукач-Токальчик Ю.П., Пархач Л.П., Денисов А.А., Танин М.Л., Черныш Е.Ю., Замаро А.С., Нижегородова Д.Б., Игнатович Т.В., Дедюдя Н.И., Бузук Е.С., Марченко С.В., Шабалина Ю.С., Комликов С.Ю., Нехай М.А.,

- Гончаров В.В. Метод лечения инсульта с использованием аутологичных мезенхимных стволовых клеток жировой ткани. Минск. 2018. Ссылка активна на 17.07.23. <http://m.med.by/methods/pdf/242-1218.pdf>
29. Шевелев И.Н. Травматические поражения плечевого сплетения. Москва: 2005.
 30. Шмакова А., Рысенкова К., Ивашкина О. и др. Ранняя индукция генов рецепторов нейротрофинов и микроРНК в головном мозге мышей после пентилентетразол-индуцированной нервной активности, *Биохимия* 2021; 86(10): 1513–1530
 31. Abbadessa G, Mainero C, Bonavita S. Hemostasis Components as Therapeutic Targets in Autoimmune Demyelination. *Clin Pharmacol Ther.* 2022 Apr;111(4):807-816. doi: 10.1002/cpt.2532
 32. Akassoglou K, Yu WM, Akpinar P, Strickland S. Fibrin inhibits peripheral nerve remyelination by regulating Schwann cell differentiation. *Neuron.* 2002 Mar 14;33(6):861-75. doi: 10.1016/s0896-6273(02)00617-7
 33. Alegre M, Bartman C, Chong A. Microbes and allogeneic transplantation. *Transplantation.* 2014;97(1):5-11. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3182a2037f>
 34. Aleksandrushkina, N.A.; Danilova, N.V.; Grigorieva, O.A.; Mal'kov, P.G.; Popov, V.S.; Efimenko, A.Yu; Makarevich, P.I. Cell Sheets of Mesenchymal Stromal Cells Effectively Stimulate Healing of Deep Soft Tissue Defects. *Bull Exp Biol Med*, 2019, 167, 159–163. doi: 10.1007/s10517-019-04482-4
 35. Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, Barua NU, Patel NK. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol Ther.* 2013 May;138(2):155-75. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.01.004.
 36. Amer M.H., White L.J., Shakesheff K.M. The effect of injection using narrow-bore needles on mammalian cells: administration and formulation considerations for cell therapies. *J. Pharm. Pharmacol.* 2015; 67(5): 640-50.
 37. Andres R, Horie N, Slikker W, Keren-Gill H, Zhan K, Sun G, Manley N, Pereira M, Sheikh L, McMillan E, Schaar B, Svendsen C, Bliss T, Steinberg G. Human neural stem cells enhance structural plasticity and axonal transport in the ischaemic brain. *Brain.* 2011;134(Pt 6):1777-89. <https://doi.org/10.1093/brain/awr094>
 38. Andrzejewska A, Dabrowska S, Lukomska B, Janowski M. Mesenchymal Stem Cells for Neurological Disorders. *Advanced Science.* 2021;8(7):2002944. <https://doi.org/10.1002/advs.202002944>
 39. Atkinson E, Dickman R. Growth factors and their peptide mimetics for treatment of traumatic brain injury. *Bioorg Med Chem.* 2023 Jul 15;90:117368. doi: 10.1016/j.bmc.2023.117368.
 40. Ávalos A, Haza AI, Drosopoulou E, Mavragani-Tsipidou P, Morales P. In vivo genotoxicity assesment of silver nanoparticles of different sizes by the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) on *Drosophila*. *Food Chem Toxicol* 2015;85:114–119.
 41. Bagnard D., Vaillant C., Khuth S.T. et al. Semaphorin 3A-vascular endothelial growth factor-165 balance mediates migration and apoptosis of neural progenitor cells by the recruitment of shared receptor. *J. Neurosci.* 2001; 21(10): 3332-41.
 42. Baharoglu M, Cordonnier C, Al-Shahi Salman R, de Gans K, Koopman M, Brand A, Majoie C, Beenen L, Marquering H, Vermeulen M, Nederkoorn P, de Haan R, Roos Y; PATCH Investigators. Platelet transfusion versus standard care after acute stroke due to spontaneous cerebral haemorrhage associated with antiplatelet therapy (PATCH): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 2016;387(10038):2605-2613. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30392-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30392-0)
 43. Balakrishnan A, Belfiore L, Chu TH, Fleming T, Midha R, Biernaskie J, Schuurmans C. Insights Into the Role and Potential of Schwann Cells for Peripheral Nerve Repair From Studies of Development and Injury. *Front Mol Neurosci.* 2021 Jan 25;13:608442. doi: 10.3389/fnmol.2020.608442
 44. Baltrusch S. The Role of Neurotropic B Vitamins in Nerve Regeneration. *Biomed Res Int.* 2021 Jul 13;2021:9968228. doi: 10.1155/2021/9968228.

45. Barres BA, Raff MC - Axonal Control of Oligodendrocyte Development (1999) *The Journal of Cell Biology*, Volume 147, No 6: 1123–1128.
46. Bathina S, Das UN. Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. *Arch Med Sci*. 2015 Dec 10;11(6):1164-78. doi: 10.5114/aoms.2015.56342
47. Bauer, G., Anderson, J.S. (2014). Principles of Gene Therapy. In: *Gene Therapy for HIV*. SpringerBriefs in Biochemistry and Molecular Biology. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0434-1_1
48. Bazley L.A., Gullick W.J. The epidermal growth factor receptor family. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12 Suppl 1: S17-27.
49. Becher B, Spath S, Goverman J. Cytokine networks in neuroinflammation. *Nat Rev Immunol*. 2017 Jan;17(1):49-59. doi: 10.1038/nri.2016.123
50. Bernardo-Castro S, Sousa J, Brás A, Cecília C, Rodrigues B, Almendra L, Machado C, Santo G, Silva F, Ferreira L, Santana I, Sargento-Freitas J. Pathophysiology of Blood-Brain Barrier Permeability Throughout the Different Stages of Ischemic Stroke and Its Implication on Hemorrhagic Transformation and Recovery. *Frontiers in neurology*. 2020;11:594672. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.594672>
51. Birch J, Gil J. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes Dev*. 2020 Dec 1;34(23-24):1565-1576. doi: 10.1101/gad.343129.120
52. Bleier R, Albrecht R, Cruce JA. Supraependymal cells of hypothalamic third ventricle: identification as resident phagocytes of the brain. *Science*. 1975 Jul 25;189(4199):299-301. doi: 10.1126/science.1145204
53. Bolshakov A, Tret'yakova L, Kvichansky A, Gulyaeva N. Glucocorticoids: Dr. Jekyll and Mr. Hyde of Hippocampal Neuroinflammation. *Biochemistry (Moscow)*. 2021;86(2):156-167. <https://doi.org/10.1134/S0006297921020048>
54. Bonilla C, Zurita M. Cell-Based Therapies for Traumatic Brain Injury: Therapeutic Treatments and Clinical Trials. *Biomedicines*. 2021;9(6):669. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9060669>
55. Borlongan C, Hadman M, Sanberg C, Sanberg P. Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. *Stroke*. 2004;35(10):2385-9. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000141680.49960.d7>
56. Bottcher R.T., Niehrs C. Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocr. Rev.* 2005; 26(1): 63-77
57. Boyd JG, Gordon T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *Mol Neurobiol*. 2003 Jun;27(3):277-324. doi: 10.1385/MN:27:3:277.
58. Brown DR. Neurons depend on astrocytes in a coculture system for protection from glutamate toxicity. *Mol Cell Neurosci*. 1999 May;13(5):379-89. doi: 10.1006/mcne.1999.0751
59. Bruno S, Deregibus MC, Camussi G. The secretome of mesenchymal stromal cells: Role of extracellular vesicles in immunomodulation. *Immunol Lett*. 2015 Dec;168(2):154-8. doi: 10.1016/j.imlet.2015.06.007.
60. Calabrese F, Rossetti AC, Racagni G, Gass P, Riva MA, Molteni R. Brain-derived neurotrophic factor: a bridge between inflammation and neuroplasticity. *Front Cell Neurosci*. 2014 Dec 22;8:430. doi: 10.3389/fncel.2014.00430.
61. Cantinieaux D, Quertainmont R, Blacher S, Rossi L, Wanet T, Noël A, Brook G, Schoenen J, Franzen R. Conditioned medium from bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves recovery after spinal cord injury in rats: an original strategy to avoid cell transplantation. *PLoS One*. 2013;8(8):e69515. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069515>
62. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006 Aug 1;98(5):1076-84. doi: 10.1002/jcb.20886
63. Carroll JF, Zenebe WJ, Strange TB. Cardiovascular function in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension*. 2006 Jul;48(1):65-72. doi: 10.1161/01.HYP.0000224147.01024.77.

64. Chantry A., Gregson N., Glynn P. Degradation of myelin basic protein by a membrane-associated metalloprotease: neural distribution of the enzyme. *Neurochem. Res.* 1992; 17(9): 861-7.
65. Chattopadhyay M., Walter C., Mata M. et al. Neuroprotective effect of herpes simplex virus-mediated gene transfer of erythropoietin in hyperglycemic dorsal root ganglion neurons. *Brain* 2009; 132(Pt. 4): 879-88.
66. Chelyshev Yu.A., Mukhamedshina Yu.O., Shaimardanova G.F. et. al. Direct delivery of therapeutic genes for stimulation of post-traumatic neuroregeneration. *Nevrologicheskyy vestnik* 2012; XLIV(1): 76-83 [russian].
67. Chen B, Gao X, Yang C, Tan S, Sun Z, Yan N, Pang Y, Yuan M, Chen G, Xu G, Zhang K, Yuan Q. Neuroprotective effect of grafting GDNF gene-modified neural stem cells on cerebral ischemia in rats. *Brain research.* 2009;1284:1-11. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.05.100>
68. Chen L, Tredget E, Wu P, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One.* 2008;3(4):e1886. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001886>
69. Chen A, Xiong LJ, Tong Y, Mao M. The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury. *Biomed Rep.* 2013 Mar;1(2):167-176. doi: 10.3892/br.2012.48.
70. Chen JH, Ke KF, Lu JH, Qiu YH, Peng YP. Protection of TGF- β 1 against neuroinflammation and neurodegeneration in A β 1-42-induced Alzheimer's disease model rats. *PLoS One.* 2015 Feb 6;10(2):e0116549. doi:10.1371/journal.pone.0116549.
71. Chen Y., Wang D., Wang Z. et al. Effect of adenovirus expressing NGF on sciatic nerve injury in rats. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2009; 23(8): 947-53.
72. Chien Y, Scuoppo C, Wang X, Fang X, Balgley B, Bolden JE, Premisrut P, Luo W, Chicas A, Lee CS, Kogan SC, Lowe SW. Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev.* 2011 Oct 15;25(20):2125-36. doi: 10.1101/gad.17276711
73. Chrostek M, Fellows E, Crane A, Grande A, Low W. Efficacy of stem cell-based therapies for stroke. *Brain research.* 2019;1722:146362. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146362>
74. Claes M, De Groef L, Moons L. Target-Derived Neurotrophic Factor Deprivation Puts Retinal Ganglion Cells on Death Row: Cold Hard Evidence and Caveats. *Int J Mol Sci.* 2019 Sep 3;20(17):4314. doi: 10.3390/ijms20174314
75. Combination of Conditioned Medium and Umbilical Cord-Mesenchymal Stem Cells Therapy for Acute Stroke Infarct. #NCT05008588. *ClinicalTrials.gov.* Accessed July 17, 2023. <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT05008588?term=NCT05008588&rank=1>
76. Coelho-Castelo AA, Trombone AP, Rosada RS, et al. Tissue distribution of a plasmid DNA encoding Hsp65 gene is dependent on the dose administered through intramuscular delivery. *Genet Vaccines Ther* 2006;4:1.
77. Colucci-D'Amato L, Speranza L, Volpicelli F. Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 21;21(20):7777. doi: 10.3390/ijms21207777.
78. Cordonnier C, Demchuk A, Ziai W, Anderson C. Intracerebral haemorrhage: current approaches to acute management. *Lancet.* 2018;392(10154):1257-1268. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31878-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31878-6)
79. Costa RO, Perestrello T, Almeida RD. PRoneurotrophins and CONsequences. *Mol Neurobiol.* 2018 Apr;55(4):2934-2951. doi: 10.1007/s12035-017-0505-7.
80. Crowley M, Tajiri N. Exogenous stem cells pioneer a biobridge to the advantage of host brain cells following stroke: New insights for clinical applications. *Brain Circulation.* 2017;3(3):130-134. https://doi.org/10.4103/bc.bc_17_17
81. Cui L, Golubczyk D, Tolppanen A, Boltze J, Jolkkonen J. Cell therapy for ischemic stroke: Are differences in preclinical and clinical study design responsible for the translational loss of efficacy? *Annals of neurology.* 2019;86(1):5-16. <https://doi.org/10.1002/ana.25493>

82. Cunningham O, Campion S, Perry VH, Murray C, Sidenius N, Docagne F, Cunningham C. Microglia and the urokinase plasminogen activator receptor/uPA system in innate brain inflammation. *Glia*. 2009 Dec;57(16):1802-14. doi: 10.1002/glia.20892
83. Cunningham C, Redondo-Castro E, Allan S. The therapeutic potential of the mesenchymal stem cell secretome in ischaemic stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2018;38(8):1276-1292. <https://doi.org/10.1177/0271678X18776802>
84. Cunningham C, Wong R, Barrington J, Tamburrano S, Pinteaux E, Allan S. Systemic conditioned medium treatment from interleukin-1 primed mesenchymal stem cells promotes recovery after stroke. *Stem cell research & therapy*. 2020;11(1):32. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-1560-y>
85. Cuzner ML, Opdenakker G. Plasminogen activators and matrix metalloproteases, mediators of extracellular proteolysis in inflammatory demyelination of the central nervous system. *J Neuroimmunol*. 1999 Feb 1;94(1-2):1-14. doi: 10.1016/s0165-5728(98)00241-0
86. D'Alessio S.B., Blasi F. The urokinase receptor as an entertainer of signal transduction. *Bioscience* 2009; 14: 4575-87.
87. Das AT, Tenenbaum L, Berkhout B. Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression. *Curr Gene Ther*. 2016;16(3):156-67. doi: 10.2174/1566523216666160524144041
88. Davis GE, Pintar Allen KA, Salazar R, Maxwell SA. Matrix metalloproteinase-1 and -9 activation by plasmin regulates a novel endothelial cell-mediated mechanism of collagen gel contraction and capillary tube regression in three-dimensional collagen matrices. *J Cell Sci*. 2001 Mar;114(Pt 5):917-30. doi: 10.1242/jcs.114.5.917
89. Davis S, Donnan G. 4.5 hours: the new time window for tissue plasminogen activator in stroke. *Stroke*. 2009;40(6):2266-7. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.544171>
90. Davis C, Savitz SI, Satani N. Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicles for Repairing the Neurovascular Unit after Ischemic Stroke. *Cells*. 2021 Mar 31;10(4):767. doi: 10.3390/cells10040767.
91. Dean DA, Dean BS, Muller S, Smith LC. Sequence requirements for plasmid nuclear import. *Exp Cell Res*. 1999 Dec 15;253(2):713-22. doi: 10.1006/excr.1999.4716.
92. Del Bigio MR, Hosain S, Altumbabic M. Localization of urokinase-type plasminogen activator, its receptor, and inhibitors in mouse forebrain during postnatal development. *Int J Dev Neurosci*. 1999 Jul;17(4):387-99. doi: 10.1016/s0736-5748(99)00031-3
93. Denner J. Porcine Endogenous Retroviruses and Xenotransplantation, 2021. *Viruses*. 2021;13(11):2156. <https://doi.org/10.3390/v13112156>
94. Diaz A, Merino P, Manrique LG, Cheng L, Yepes M. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) protects the tripartite synapse in the ischemic brain via ezrin-mediated formation of peripheral astrocytic processes. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2019 Nov;39(11):2157-2171. doi: 10.1177/0271678X18783653
95. Ding H, Chen J, Su M, Lin Z, Zhan H, Yang F, Li W, Xie J, Huang Y, Liu X, Liu B, Zhou X. BDNF promotes activation of astrocytes and microglia contributing to neuroinflammation and mechanical allodynia in cyclophosphamide-induced cystitis. *J Neuroinflammation*. 2020 Jan 13;17(1):19. doi: 10.1186/s12974-020-1704-0
96. Official Journal of the European (20.10.2010) Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes, L 276:33-79.
97. Doeppner, T.R.; Kaltwasser, B.; Bähr, M.; Hermann, D.M. Effects of neural progenitor cells on post-stroke neurological impairment—a detailed and comprehensive analysis of behavioral tests. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8, 338. doi: 10.3389/fncel.2014.00338
98. Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.J.; Keating, A.; Prockop, D.J., Horwitz, E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytother*, 2006, 8, 315-317. doi: 10.1080/14653240600855905

99. Dono R. Fibroblast growth factors as regulators of central nervous system development and function. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 2003; 284(4): R867-81
100. Doudna JA. The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature*. 2020 Feb;578(7794):229-236. doi: 10.1038/s41586-020-1978-5
101. Drago D, Cossetti C, Iraci N, Gaude E, Musco G, Bachi A, Pluchino S. The stem cell secretome and its role in brain repair. *Biochimie*. 2013 Dec;95(12):2271-85. doi: 10.1016/j.biochi.2013.06.020
102. Dzshauari S, Litvinova S, Efimenko A, Aleksandrushkina N, Basalova N, Abakumov M, Danilova N, Malkov P, Balabanyan V, Bezuglova T, Balayants V, Mnikhovich M, Gulyaev M, Skryabina M, Popov V, Stambolsky D, Voronina T, Tkachuk V, Karagyaur M. Urokinase-Type Plasminogen Activator Enhances the Neuroprotective Activity of Brain-Derived Neurotrophic Factor in a Model of Intracerebral Hemorrhage. *Biomedicines*. 2022 Jun 8;10(6):1346. doi: 10.3390/biomedicines10061346
103. Dzshauari S, Basalova N, Primak A, Balabanyan V, Efimenko A, Skryabina M, Popov V, Velichko A, Bozov K, Akopyan Z, Malkov P, Stambolsky D, Tkachuk V, Karagyaur M. The Secretome of Mesenchymal Stromal Cells in Treating Intracerebral Hemorrhage: The First Step to Bedside. *Pharmaceutics*. 2023;15(6):1608. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15061608>
104. Eagleson KL, Campbell DB, Thompson BL, Bergman MY, Levitt P. The autism risk genes MET and PLAU8 differentially impact cortical development. *Autism Res*. 2011 Feb;4(1):68-83. doi: 10.1002/aur.172
105. Edstrom A., Ekstrom P.A. Role of phosphatidylinositol 3-kinase in neuronal survival and axonal outgrowth of adult mouse dorsal root ganglia explants. *J. Neurosci. Res*. 2003; 74(5): 726-35.
106. Efimenko A, Starostina E, Kalinina N, Stolzing A. Angiogenic properties of aged adipose derived mesenchymal stem cells after hypoxic conditioning. *Journal of translational medicine*. 2011;9:10. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-10>
107. Efimenko A, Kalinina N, Rubina K, Semina E, Sysoeva V, Akopyan Z, Tkachuk V. Secretome of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells as a Promising Treatment and for Rehabilitation of Patients with the Novel Coronaviral Infection. *Herald of the Russian Academy of Sciences*. 2021;91(2):170-175. <https://doi.org/10.1134/S101933162102012X>
108. Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med*. 2014 Dec 3;6(265):265sr6. doi: 10.1126/scitranslmed.3009337
109. Ernfors P, Lee KF, Jaenisch R. Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature*. 1994 Mar 10;368(6467):147-50. doi: 10.1038/368147a0
110. Seyda A., Gosiewska A. Regeneration and repair of neural tissue following injury. European patent 2379089B1. December 19, 2009.
111. Fairbairn N.G., Meppelink A.M., Ng-Glazier J. et al. Augmenting peripheral nerve regeneration using stem cells: A review of current opinion. *World J. Stem Cells* 2015; 7(1): 11-26.
112. Fakhri S, Kiani A, Jalili C, Abbaszadeh F, Piri S, Farzaei MH, Rastegari-Pouyani M, Mohammadi-Noori E, Khan H. Intrathecal Administration of Melatonin Ameliorates the Neuroinflammation-Mediated Sensory and Motor Dysfunction in A Rat Model of Compression Spinal Cord Injury. *Curr Mol Pharmacol*. 2021 Oct 25;14(4):646-657. doi: 10.2174/1874467213666201230101811.
113. Fang Y., Mo X., Guo W. et al. A new type of Schwann cell graft transplantation to promote optic nerve regeneration in adult rats. *J. Tissue Eng. Regen. Med*. 2010; 4(8): 581-9.
114. Fang X, Ding S, Du X, Wang J, Li X. Ferroptosis-A Novel Mechanism With Multifaceted Actions on Stroke. *Frontiers in neurology*. 2022;13:881809. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.881809>

115. Fantacci C, Capozzi D, Ferrara P, Chiaretti A. Neuroprotective role of nerve growth factor in hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Sci.* 2013 Jun 25;3(3):1013-22. doi: 10.3390/brainsci3031013
116. Fathi-Kazerooni M, Fattah-Ghazi S, Darzi M, Makarem J, Nasiri R, Salahshour F, Dehghan-Manshadi SA, Kazemnejad S. Safety and efficacy study of allogeneic human menstrual blood stromal cells secretome to treat severe COVID-19 patients: clinical trial phase I & II. *Stem Cell Res Ther.* 2022 Mar 7;13(1):96. doi: 10.1186/s13287-022-02771-w.
117. Feldman AT, Wolfe D. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods Mol Biol.* 2014;1180:31-43. doi: 10.1007/978-1-4939-1050-2_3
118. Feldman RA. Microglia orchestrate neuroinflammation. *Elife.* 2022 Aug 22;11:e81890. doi: 10.7554/eLife.81890
119. Fitch MT, Silver J. CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp Neurol.* 2008 Feb;209(2):294-301. doi: 10.1016/j.expneurol.2007.05.014
120. Fleitas C, Piñol-Ripoll G, Marfull P, Rocandio D, Ferrer I, Rampon C, Egea J, Espinet C. proBDNF is modified by advanced glycation end products in Alzheimer's disease and causes neuronal apoptosis by inducing p75 neurotrophin receptor processing. *Mol Brain.* 2018 Nov 14;11(1):68. doi: 10.1186/s13041-018-0411-6.
121. Fonarow GC, Smith EE, Saver JL, Reeves MJ, Hernandez AF, Peterson ED, Sacco RL, Schwamm LH. Improving door-to-needle times in acute ischemic stroke: the design and rationale for the American Heart Association/American Stroke Association's Target: Stroke initiative. *Stroke.* 2011 Oct;42(10):2983-9. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.621342.
122. Fredette BJ, Ranscht B - T-Cadherin expression delineates specific regions of the developing motor axon-hindlimb projection pathway (1994) *The Journal of Neuroscience*, 14(12): 7331-7346.
123. Fugleholm K, Schmalbruch H, and Krarup C (2000) Post reinnervation maturation of myelinated nerve fibers in the cat tibial nerve: chronic electrophysiological and morphometric studies. *J Peripher Nerv Syst* 5(2):82-95.
124. Fumiko Higashikawa and Lung-Ji Chang - Kinetic Analyses of Stability of Simple and Complex Retroviral Vectors. *Virology* (2001), 280, 124-131, doi:10.1006/viro.2000.074
125. Ge J., Li Y., Zhuo Y. et al. Peripheral nerve and transgene cells transplantation in the treatment of experimental neuropathy of SD rats. *Yan Ke Xue Bao* 1998; 14(3): 121-5.
126. Genomic DNA Preparation Protocol. https://medschool.ucsd.edu/research/moores/shared-resources/transgenic-core/starting/Documents/Tail_Genomic_DNA_Prep.pdf
127. George P, Oh B, Dewi R, Hua T, Cai L, Levinson A, Liang X, Krajina B, Bliss T, Heilshorn S, Steinberg G. Engineered stem cell mimics to enhance stroke recovery. *Biomaterials.* 2018;178:63-72. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.06.010>
128. Georgiou M., Bunting S.C., Davies H.A. et al. Engineered neural tissue for peripheral nerve repair. *Biomaterials* 2013; 34(30): 7335-43.
129. Ghaderi A, Abtahi S. Mesenchymal Stem Cells: Miraculous Healers or Dormant Killers? *Stem Cell Reviews and Reports.* 2018;14(5):722-733. <https://doi.org/10.1007/s12015-018-9824-y>
130. Ghozy S, Reda A, Varney J, Elhawary A, Shah J, Murry K, Sobeeh M, Nayak S, Azzam A, Brinjikji W, Kadirvel R, Kallmes D. Neuroprotection in Acute Ischemic Stroke: A Battle Against the Biology of Nature. *Frontiers in neurology.* 2022;13:870141. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.870141>
131. Gill D, Pringle I, Hyde S. Progress and Prospects: The design and production of plasmid vectors. *Gene Ther* 2009;16:165–171.
132. Giovannelli L, Bari E, Jommi C, Tartara F, Armocida D, Garbossa D, Cofano F, Torre ML, Segale L. Mesenchymal stem cell secretome and extracellular vesicles for neurodegenerative diseases: Risk-benefit profile and next steps for the market access. *Bioact Mater.* 2023 Jun 28;29:16-35. doi: 10.1016/j.bioactmat.2023.06.013.

133. Goldberg JL. How does an axon grow? *Genes Dev.* 2003 Apr 15;17(8):941-58. doi: 10.1101/gad.1062303.
134. Gordon T. The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. *Neurosurg Focus.* 2009 Feb;26(2):E3. doi: 10.3171/FOC.2009.26.2.E3.
135. Gordon T. Peripheral Nerve Regeneration and Muscle Reinnervation. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 17;21(22):8652. doi: 10.3390/ijms21228652.
136. Gray K, Ellis V. Activation of pro-BDNF by the pericellular serine protease plasmin. *FEBS Lett.* 2008 Mar 19;582(6):907-10. doi: 10.1016/j.febslet.2008.02.026
137. Guduric-Fuchs J, O'Connor A, Camp B, O'Neill CL, Medina RJ, Simpson DA. Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types. *BMC Genomics.* 2012 Aug 1;13:357. doi: 10.1186/1471-2164-13-357
138. Gulyaeva N. Biochemical Mechanisms and Translational Relevance of Hippocampal Vulnerability to Distant Focal Brain Injury: The Price of Stress Response. *Biochemistry (Moscow).* 2019;84(11):1306-1328. <https://doi.org/10.1134/S0006297919110087>
139. Gupta R., Tongers J., Losordo D.W. Human studies of angiogenic gene therapy. *Circ. Res.* 2009; 105(8): 724-36.
140. Gusarova GA, Trejo HE, Dada LA, Briva A, Welch LC, Hamanaka RB, Mutlu GM, Chandel NS, Prakriya M, Sznajder JI. Hypoxia leads to Na,K-ATPase downregulation via Ca(2+) release-activated Ca(2+) channels and AMPK activation. *Mol Cell Biol.* 2011 Sep;31(17):3546-56. doi: 10.1128/MCB.05114-11.
141. Gutiérrez-Fernández M, Rodríguez-Frutos B, Alvarez-Grech J, Vallejo-Cremades M, Expósito-Alcaide M, Merino J, Roda J, Díez-Tejedor E. Functional recovery after hematic administration of allogenic mesenchymal stem cells in acute ischemic stroke in rats. *Neuroscience.* 2011;175:394-405. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.11.054>
142. Han H, Hu J, Yan Q, Zhu J, Zhu Z, Chen Y, Sun J, Zhang R. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells rescue injured H9c2 cells via transferring intact mitochondria through tunneling nanotubes in an in vitro simulated ischemia/reperfusion model. *Molecular Medicine Reports.* 2016;13(2):1517-24. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4726>
143. Han, Y., Yang, J., Fang, J. et al. The secretion profile of mesenchymal stem cells and potential applications in treating human diseases. *Sig Transduct Target Ther* 7, 92 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00932-0>
144. Hardee CL, Arévalo-Soliz LM, Hornstein BD, Zechiedrich L. Advances in Non-Viral DNA Vectors for Gene Therapy. *Genes (Basel)* 2017;8(2):65.
145. Hasan A, Deeb G, Rahal R, Atwi K, Mondello S, Marei H, Gali A, Sleiman E. Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Traumatic Brain Injury. *Frontiers in neurology.* 2017;8:28. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00028>
146. Hawkes MA, Carpani F, Farez MF, Ameriso SF. Door-to-Needle Time in Acute Stroke Treatment and the "July Effect". *Neurohospitalist.* 2018 Jan;8(1):24-28. doi: 10.1177/1941874417733108.
147. Hayes CA, Valcarcel-Ares MN, Ashpole NM. Preclinical and clinical evidence of IGF-1 as a prognostic marker and acute intervention with ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2021 Oct;41(10):2475-2491. doi: 10.1177/0271678X211000894.
148. Hazelwood HS, Frank JA, Maglinger B, McLouth CJ, Trout AL, Turchan-Cholewo J, Stowe AM, Pahwa S, Dornbos DL 3rd, Fraser JF, Pennypacker KR. Plasma protein alterations during human large vessel stroke: A controlled comparison study. *Neurochem Int.* 2022 Nov;160:105421. doi: 10.1016/j.neuint.2022.105421.
149. He Y, Gao Y, Zhang Q, Zhou G, Cao F, Yao S. IL-4 Switches Microglia/macrophage M1/M2 Polarization and Alleviates Neurological Damage by Modulating the JAK1/STAT6 Pathway Following ICH. *Neuroscience.* 2020 Jun 15;437:161-171. doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.03.008
150. Heistad D, Faraci F. Gene therapy for cerebral vascular disease. *Stroke.* 1996;27(9):1688-93. <https://doi.org/10.1161/01.str.27.9.1688>

151. Hems T.E. Timing of surgical reconstruction for closed traumatic injury to the supraclavicular brachial plexus. *J. Hand Surg. Eur.* Vol. 2015; 40(6): 568-72.
152. Hengge UR, Dexling B, Mirmohammadsadegh A. Safety and pharmacokinetics of naked plasmid DNA in the skin: studies on dissemination and ectopic expression. *J Invest Dermatol.* 2001;116(6):979–982.
153. High K, Roncarolo M. Gene Therapy. *The New England Journal of Medicine.* 2019;381(5):455-464. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1706910>
154. Ho I, Lam P. Signaling molecules and pathways involved in MSC tumor tropism. *Histology and Histopathology.* 2013;28(11):1427-38. <https://doi.org/10.14670/HH-28.1427>
155. Hobson M.I., Green C.J., Terenghi G. VEGF enhances intraneural angiogenesis and improves nerve regeneration after axotomy. *J. Anat.* 2000; 197 (Pt4): 591-605.
156. Hoffman O, Weber R. Pathophysiology and treatment of bacterial meningitis. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders.* 2009;2(6):1-7. <https://doi.org/10.1177/1756285609337975>
157. Hoke A., Redett R., Hameed H. et al. Schwann cells express motor and sensory phenotypes that regulate axon regeneration. *J. Neurosci.* 2006; 26(38): 9646-55.
158. Horita Y, Honmou O, Harada K, Houkin K, Hamada H, Kocsis J. Intravenous administration of glial cell line-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in the adult rat. *Journal of neuroscience research.* 2006;84(7):1495-504. <https://doi.org/10.1002/jnr.21056>
159. Hu, Y.; Li, J.; Liu, P.; Chen, X.; Guo, D.H.; Li, Q.S.; Rahman, K. Protection of SH-SY5Y Neuronal Cells from Glutamate-Induced Apoptosis by 3,6'-Disinapoyl Sucrose, a Bioactive Compound Isolated from Radix Polygala, *BioMed Res Int*, 2012, 2012, 728342. doi: 10.1155/2012/728342
160. Huang L, Wu Z, Zhuge Q, Zheng W, Shao B, Wang B, Sun F, Jin K. Glial scar formation occurs in the human brain after ischemic stroke. *International journal of medical sciences.* 2014;11(4):344-8. <https://doi.org/10.7150/ijms.8140>
161. Huang Q, Wei H, Wu Z, et al. Preferentially Expressed Antigen of Melanoma Prevents Lung Cancer Metastasis. *PLoS One* 2016;11(7):e0149640.
162. Huang X, Li Y, Fu M, Xin HB. Polarizing Macrophages In Vitro. *Methods Mol Biol.* 2018;1784:119-126. doi: 10.1007/978-1-4939-7837-3_12
163. Ide C. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res.* 1996 Jun;25(2):101-21. doi: 10.1016/0168-0102(96)01042-5
164. Idrisova KF, Zeinalova AK, Masgutova GA, Bogov AA, Allegrucci C, Syromiatnikova VY, Salafutdinov II, Garanina EE, Andreeva DI, Kadyrov AA, Rizvanov AA, Masgutov RF. Application of neurotrophic and proangiogenic factors as therapy after peripheral nervous system injury. *Neural Regen Res.* 2022 Jun;17(6):1240-1247. doi: 10.4103/1673-5374.327329.
165. Ito W, Chehab M, Thakur S, Li J, Morozov A. BDNF-restricted knockout mice as an animal model for aggression. *Genes Brain Behav.* 2011 Apr;10(3):365-74. doi: 10.1111/j.1601-183X.2010.00676.x
166. Jaiswal RK, Varshney AK, Yadava PK. Diversity and functional evolution of the plasminogen activator system. *Biomed Pharmacother.* 2018;98:886–898.
167. Jäkel S, Dimou L. Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Front Cell Neurosci.* 2017 Feb 13;11:24. doi: 10.3389/fncel.2017.00024.
168. Jang HS, Kim HJ, Kim JM, Lee YS, Kim KL, Kim JA, Lee JY, Suh W, Choi JH, Jeon ES, Byun J, Kim DK. A novel ex vivo angiogenesis assay based on electroporation-mediated delivery of naked plasmid DNA to skeletal muscle. *Mol Ther.* 2004 Mar;9(3):464-74. doi: 10.1016/j.ymthe.2003.12.002.

169. Janockova J, Slovinska L, Harvanova D, Spakova T, Rosocha J. New therapeutic approaches of mesenchymal stem cells-derived exosomes. *J Biomed Sci.* 2021 May 25;28(1):39. doi: 10.1186/s12929-021-00736-4
170. Jiang, W., Hua, R., Wei, M. et al. An optimized method for high-titer lentivirus preparations without ultracentrifugation. *Sci Rep* 5, 13875 (2015) doi:10.1038/srep13875
171. Jodeiri Farshbaf M, Alviña K. Multiple Roles in Neuroprotection for the Exercise Derived Myokine Irisin. *Front Aging Neurosci.* 2021 Apr 16;13:649929. doi: 10.3389/fnagi.2021.649929.
172. Jubin R, Vantuno NE, Kieft JS, Murray MG, Doudna JA, Lau JY, Baroudy BM. Hepatitis C virus internal ribosome entry site (IRES) stem loop IIIId contains a phylogenetically conserved GGG triplet essential for translation and IRES folding. *J Virol.* 2000 Nov;74(22):10430-7. doi: 10.1128/jvi.74.22.10430-10437.2000.
173. Kabekkodu SP, Shukla V, Varghese VK, D' Souza J, Chakrabarty S, Satyamoorthy K. Clustered miRNAs and their role in biological functions and diseases. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2018 Nov;93(4):1955-1986. doi: 10.1111/brv.12428
174. Kadir RRA, Alwjwaj M, Bayraktutan U. MicroRNA: An Emerging Predictive, Diagnostic, Prognostic and Therapeutic Strategy in Ischaemic Stroke. *Cell Mol Neurobiol.* 2022 Jul;42(5):1301-1319. doi: 10.1007/s10571-020-01028-5.
175. Kalinina N., Kharlampieva D., Loguinova M. et al. Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes. *Stem Cell Res. Ther.* 2015; 6: 221-32.
176. Kalra S, Malik R, Singh G, Bhatia S, Al-Harrasi A, Mohan S, Albratty M, Albarrati A, Tambuwala MM. Pathogenesis and management of traumatic brain injury (TBI): role of neuroinflammation and anti-inflammatory drugs. *Inflammopharmacology.* 2022 Aug;30(4):1153-1166. doi: 10.1007/s10787-022-01017-8
177. Karagyaur M., Dyikanov D., Makarevich P. et al. Non-viral transfer of BDNF and uPA stimulates peripheral nerve regeneration. *Biomed. Pharmacother.* 2015; 74: 63-70.
178. Karagyaur MN, Rubtsov YP, Vasiliev PA, Tkachuk VA. Practical Recommendations for Improving Efficiency and Accuracy of the CRISPR/Cas9 Genome Editing System. *Biochemistry (Mosc).* 2018 Jun;83(6):629-642. doi: 10.1134/S0006297918060020
179. Karagyaur M, Rostovtseva A, Semina E, Klimovich P, Balabanyan V, Makarevich P, Popov V, Stambolsky D, Tkachuk V. A Bicistronic Plasmid Encoding Brain-Derived Neurotrophic Factor and Urokinase Plasminogen Activator Stimulates Peripheral Nerve Regeneration After Injury. *J Pharmacol Exp Ther.* 2020 Mar;372(3):248-255. doi: 10.1124/jpet.119.261594.
180. Karagyaur M, Dzhauari S, Basalova N, Aleksandrushkina N, Sagaradze G, Danilova N, Malkov P, Popov V, Skryabina M, Efimenko A, Tkachuk V. MSC Secretome as a Promising Tool for Neuroprotection and Neuroregeneration in a Model of Intracerebral Hemorrhage. *Pharmaceutics.* 2021;13(12):2031. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122031>
181. Karagyaur M., Rostovceva A., Dzhauari S. Biodistribution and safety studies of a bicistronic plasmid for nerve repair. *Tissue Engineering - Part C: Methods* 2021a; 27(6): 391-400
182. Karagyaur M, Primak A, Efimenko A, Skryabina M, Tkachuk V. The Power of Gene Technologies: 1001 Ways to Create a Cell Model. *Cells.* 2022 Oct 14;11(20):3235. doi: 10.3390/cells11203235
183. Katoh-Semba R., Matsuda M., Kato K. et al. Chondroitin sulphate proteoglycans in the rat brain: candidates for axon barriers of sensory neurons and the possible modification by laminin of their actions. *Eur. J. Neurosci.* 1995; 7(4): 613-21.
184. Kibbe M.R., Hirsch A.T., Mendelsohn F.O. et al. Safety and efficacy of plasmid DNA expressing two isoforms of hepatocyte growth factor in patients with critical limb ischemia. *Gene Ther.* 2016; 23(4): 306-12.

185. Kim SY, Lee JH, Kim HJ, Park MK, Huh JW, Ro JY, Oh YM, Lee SD, Lee YS. Mesenchymal stem cell-conditioned media recovers lung fibroblasts from cigarette smoke-induced damage. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012 May 1;302(9):L891-908. doi: 10.1152/ajplung.00288.2011.
186. Kim JY, Barua S, Huang MY, Park J, Yenari MA, Lee JE. Heat Shock Protein 70 (HSP70) Induction: Chaperonotherapy for Neuroprotection after Brain Injury. *Cells*. 2020 Sep 2;9(9):2020. doi: 10.3390/cells9092020
187. Kim HJ, Bayarsaikhan D, Lee J, Bayarsaikhan G, Lee B. Brain-Derived Neurotrophic Factor Secreting Human Mesenchymal Stem Cells Improve Outcomes in Rett Syndrome Mouse Models. *Front Neurosci*. 2021 Oct 6;15:725398. doi: 10.3389/fnins.2021.725398
188. Kim KH, Ro YS, Park JH, Jeong J, Shin SD, Moon S. Association between time to emergency neurosurgery and clinical outcomes for spontaneous hemorrhagic stroke: A nationwide observational study. *PLoS One*. 2022 Apr 28;17(4):e0267856. doi: 10.1371/journal.pone.0267856.
189. Kim KH, Ro YS, Park JH, Jeong J, Shin SD, Moon S. Association between time to emergency neurosurgery and clinical outcomes for spontaneous hemorrhagic stroke: A nationwide observational study. *PLoS One*. 2022 Apr 28;17(4):e0267856. doi: 10.1371/journal.pone.0267856.
190. Kimpinski K., Mearow K. Neurite growth promotion by nerve growth factor and insulin-like growth factor-1 in cultured adult sensory neurons: role of phosphoinositide 3-kinase and mitogen activated protein kinase. *J. Neurosci. Res*. 2001; 63(6): 486-99.
191. Klimaschewski L., Hausott B., Angelov D.N. The pros and cons of growth factors and cytokines in peripheral axon regeneration. *Int. Rev. Neurobiol*. 2013; 108: 137-71.
192. Kodama F, Umeda M, Tsutsui T. Mutagenic effect of sodium nitrite on cultured mouse cells. *Mutat Res*. 1976 Apr;40(2):119-24. doi: 10.1016/0165-1218(76)90006-9
193. Konca K, Lankoff A, Banasik A. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mut Res* 2003;534(1-2):15-20.
194. Kondziolka D, Steinberg G, Wechsler L, Meltzer C, Elder E, Gebel J, Decesare S, Jovin T, Zafonte R, Lebowitz J, Flickinger J, Tong D, Marks M, Jamieson C, Luu D, Bell-Stephens T, Teraoka J. Neurotransplantation for patients with subcortical motor stroke: a phase 2 randomized trial. *Journal of neurosurgery*. 2005;103(1):38-45. <https://doi.org/10.3171/jns.2005.103.1.0038>
195. Konofaos P., Ver Halen J.P. Nerve repair by means of tubulization: past, present, future. *J. Reconstr. Microsurg*. 2013; 29(3): 149-64.
196. Koss K, Churchward MA, Tsui C, Todd KG. In Vitro Priming and Hyper-Activation of Brain Microglia: an Assessment of Phenotypes. *Mol Neurobiol*. 2019 Sep;56(9):6409-6425. doi: 10.1007/s12035-019-1529-y
197. Kozak M. Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res*. 1984 Jan 25;12(2):857-72. doi: 10.1093/nar/12.2.857.
198. Koziol J, Peyman GA, Sanders DR, Vichek J, Goldberg MF. Urokinase in experimental vitreous hemorrhage. *Ophthalmic Surg*. 1975 Fall;6(3):79-82.
199. Kuriakose D, Xiao Z. Pathophysiology and Treatment of Stroke: Present Status and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(20):7609. <https://doi.org/10.3390/ijms21207609>
200. Kurtz A. Mesenchymal stem cell delivery routes and fate. *International journal of stem cells*. 2008;1(1):1-7. <https://doi.org/10.15283/ijsc.2008.1.1.1>
201. Kwon BK, Borisoff JF, Tetzlaff W - Molecular Targets for Therapeutic Intervention after Spinal Cord Injury (2002) *Molecular Interventions*, 2: 244-258.
202. Lalu M, Montroy J, Dowlatshahi D, Hutton B, Juneau P, Wesch N, Y Zhang S, McGinn R, Corbett D, Stewart D, A Fergusson D. From the Lab to Patients: a Systematic Review and

- Meta-Analysis of Mesenchymal Stem Cell Therapy for Stroke. *Translational stroke research*. 2020;11(3):345-364. <https://doi.org/10.1007/s12975-019-00736-5>
203. Lananna BV, McKee CA, King MW, Del-Aguila JL, Dimitry JM, Farias FHG, Nadarajah CJ, Xiong DD, Guo C, Cammack AJ, Elias JA, Zhang J, Cruchaga C, Musiek ES. Chi311/YKL-40 is controlled by the astrocyte circadian clock and regulates neuroinflammation and Alzheimer's disease pathogenesis. *Sci Transl Med*. 2020 Dec 16;12(574):eaax3519. doi: 10.1126/scitranslmed.aax3519
 204. Lazaridis C, Rusin CG, Robertson CS. Secondary brain injury: Predicting and preventing insults. *Neuropharmacology*. 2019 Feb;145(Pt B):145-152. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.06.005
 205. Lee R, Pulin A, Seo M, Kota D, Ylostalo J, Larson B, Semprun-Prieto L, Delafontaine P, Prockop D. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell stem cell*. 2009;5(1):54-63. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.003>
 206. Lee SJ, Baek JH, Kim YH. Brain-derived Neurotrophic Factor Is Associated with Cognitive Impairment in Elderly Korean Individuals. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 2015 Dec 31;13(3):283-7. doi: 10.9758/cpn.2015.13.3.283
 207. Letourneau P. Axonal Pathfinding: Extracellular Matrix Role. In: Squire L.R., editor. *Encyclopedia of Neuroscience*. V. 1. Oxford: Academic Press; 2009. p. 1139-45.
 208. Li J, Zhang Q, Wang W, Lin F, Wang S, Zhao J. Mesenchymal stem cell therapy for ischemic stroke: A look into treatment mechanism and therapeutic potential. *Journal of neurology*. 2021;268(11):4095-4107. <https://doi.org/10.1007/s00415-020-10138-5>
 209. Li R, Li DH, Zhang HY, Wang J, Li XK, Xiao J. Growth factors-based therapeutic strategies and their underlying signaling mechanisms for peripheral nerve regeneration. *Acta Pharmacol Sin*. 2020 Oct;41(10):1289-1300. doi: 10.1038/s41401-019-0338-1
 210. Li W, Shi L, Hu B, Hong Y, Zhang H, Li X, Zhang Y. Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Stroke: Current Understanding and Challenges. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2021;15:628940. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.628940>
 211. Li X, Guan Y, Li C, Zhang T, Meng F, Zhang J, Li J, Chen S, Wang Q, Wang Y, Peng J, Tang J. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in peripheral nerve injury. *Stem Cell Res Ther*. 2022 Jan 15;13(1):18. doi: 10.1186/s13287-021-02690-2
 212. Lim DA, Alvarez-Buylla A. The Adult Ventricular-Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016 May 2;8(5):a018820. doi: 10.1101/cshperspect.a018820.
 213. Lin P, Lin Y, Lennon DP, Correa D, Schluchter M, Caplan AI. Efficient lentiviral transduction of human mesenchymal stem cells that preserves proliferation and differentiation capabilities. *Stem Cells Transl Med*. 2012 Dec;1(12):886-97. doi: 10.5966/sctm.2012-0086.
 214. Liu W, Wang X, O'Connor M, Wang G, Han F. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Its Potential Therapeutic Role in Stroke Comorbidities. *Neural Plast*. 2020 Jan 27;2020:1969482. doi: 10.1155/2020/1969482.
 215. Lloyd RA, Butler JE, Gandevia SC, Ball IK, Toson B, Stoodley MA, Bilston LE. Respiratory cerebrospinal fluid flow is driven by the thoracic and lumbar spinal pressures. *J Physiol*. 2020 Dec;598(24):5789-5805. doi: 10.1113/JP279458.
 216. Lok J, Leung W, Murphy S, Butler W, Noviski N, Lo EH. Intracranial hemorrhage: mechanisms of secondary brain injury. *Acta Neurochir Suppl*. 2011;111:63-9. doi: 10.1007/978-3-7091-0693-8_11.
 217. Lopatina T., Kalinina N., Karagyaur M. et al. Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo. *PLoS One* 2011; 6(3).
 218. Lu D, Xu Y, Liu Q, Zhang Q. Mesenchymal Stem Cell-Macrophage Crosstalk and Maintenance of Inflammatory Microenvironment Homeostasis. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Jun 25;9:681171. doi: 10.3389/fcell.2021.681171.

219. Luan X, Qiu H, Hong X, Wu C, Zhao K, Chen H, Zhu Z, Li X, Shen H, He J. High serum nerve growth factor concentrations are associated with good functional outcome at 3 months following acute ischemic stroke. *Clin Chim Acta*. 2019 Jan;488:20-24. doi: 10.1016/j.cca.2018.10.030.
220. Lukavsky PJ. Structure and function of HCV IRES domains. *Virus Res*. 2009 Feb;139(2):166-71. doi: 10.1016/j.virusres.2008.06.004.
221. Lunsford L, McKeever U, Eckstein V, Hedley M. Tissue Distribution and Persistence in Mice of Plasmid DNA Encapsulated in a PLGA-Based Microsphere Delivery Vehicle, *J Drug Target* 2000;8(1):39-50.
222. Ma W, Rogers K, Zbar B, Schmidt L. Effects of different fixatives on beta-galactosidase activity. *J Histochem Cytochem*. 2002 Oct;50(10):1421-4. doi: 10.1177/002215540205001015.
223. Ma T, Chen Y, Chen Y, Meng Q, Sun J, Shao L, Yu Y, Huang H, Hu Y, Yang Z, Yang J, Shen Z. MicroRNA-132, Delivered by Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes, Promote Angiogenesis in Myocardial Infarction. *Stem Cells Int*. 2018 Sep 9;2018:3290372. doi: 10.1155/2018/3290372
224. Maida C, Norrito R, Daidone M, Tuttolomondo A, Pinto A. Neuroinflammatory Mechanisms in Ischemic Stroke: Focus on Cardioembolic Stroke, Background, and Therapeutic Approaches. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(18):6454. <https://doi.org/10.3390/ijms21186454>
225. Makarevich P.I., Rubina K.A., Diyanov D.T. et al. Therapeutic Angiogenesis Using Growth Factors: Current State and Prospects for Development. *Kardiologija* 2015; 55(9): 59-71.
226. Makridakis M., Roubelakis M.G., Vlahou A. Stem cells: insights into the secretome. *Biochim. Biophys. Acta* 2013; 1834(11): 2380-4.
227. Manning MC, Chou DK, Murphy BM, Payne RW, Katayama DS. Stability of protein pharmaceuticals: an update. *Pharm Res*. 2010 Apr;27(4):544-75. doi: 10.1007/s11095-009-0045-6
228. Manthorpe M, Cornefert-Jensen F, Hartikka J, Felgner J, Rundell A, Margalith M, Dwarki V. Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice. *Hum Gene Ther*. 1993 Aug;4(4):419-31. doi: 10.1089/hum.1993.4.4-419
229. Marklund N, Bellander BM, Godbolt AK, Levin H, McCrory P, Thelin EP. Treatments and rehabilitation in the acute and chronic state of traumatic brain injury. *J Intern Med*. 2019 Jun;285(6):608-623. doi: 10.1111/joim.12900
230. Martin K.R., Quigley H.A., Zack D.J. et al. Gene therapy with brain-derived neurotrophic factor as a protection: retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2003; 44(10): 4357-65.
231. Masgutov R.F., Salafutdinov I.I., Bogov A.A. (jn.), etc. Stimulation of post-traumatic regeneration of the rat sciatic nerve with the plasmid expressing vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. *Cell transplantology and tissue engineering* 2011; VI(3): 67-70 [russian].
232. Mason M.R., Tannemaat M.R., Malessy M.J. et al. Gene therapy for the peripheral nervous system: a strategy to repair the injured nerve? *Curr. Gene Ther*. 2011; 11(2): 75-89.
233. Matthay M, Calfee C, Zhuo H, Thompson B, Wilson J, Levitt J, Rogers A, Gotts J, Wiener-Kronish J, Bajwa E, Donahoe M, McVerry B, Ortiz L, Exline M, Christman J, Abbott J, Delucchi K, Caballero L, McMillan M, McKenna D, Liu K. Treatment with allogeneic mesenchymal stromal cells for moderate to severe acute respiratory distress syndrome (START study): a randomised phase 2a safety trial. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2019;7(2):154-162. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(18\)30418-1](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30418-1)
234. Maucksch C., Connor B., Rudolph C. - Plasmid DNA Concatemers: Influence of Plasmid Structure on Transfection Efficiency, Minicircle and Miniplasmid DNA Vectors: The Future

- of Nonviral and Viral Gene Transfer (book), 2013, 235pp, <https://doi.org/10.1002/9783527670420.ch5>
235. Mayer S, Brun N, Begtrup K, Broderick J, Davis S, Diringer M, Skolnick B, Steiner T; FAST Trial Investigators. Efficacy and safety of recombinant activated factor VII for acute intracerebral hemorrhage. *The New England Journal of Medicine*. 2008;358(20):2127-37. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0707534>
 236. Mayhan WG. VEGF increases permeability of the blood-brain barrier via a nitric oxide synthase/cGMP-dependent pathway. *Am J Physiol*. 1999 May;276(5):C1148-53. doi: 10.1152/ajpcell.1999.276.5.C1148.
 237. McColl BK, Baldwin ME, Roufail S, Freeman C, Moritz RL, Simpson RJ, Alitalo K, Stacker SA, Achen MG. Plasmin activates the lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D. *J Exp Med*. 2003 Sep 15;198(6):863-8. doi: 10.1084/jem.20030361
 238. McGinn MJ, Povlishock JT. Pathophysiology of Traumatic Brain Injury. *Neurosurg Clin N Am*. 2016 Oct;27(4):397-407. doi: 10.1016/j.nec.2016.06.002.
 239. McGraw, C.P.; Pashayan, A.G.; Wendel, O.T.; Cerebral infarction in the Mongolian gerbil exacerbated by phenoxyben-zamine treatment. *Stroke*, 1976, 7(5), 485-488. doi: 10.1161/01.str.7.5.485.
 240. Meeker RB, Williams KS. The p75 neurotrophin receptor: at the crossroad of neural repair and death. *Neural Regen Res*. 2015 May;10(5):721-5. doi: 10.4103/1673-5374.156967.
 241. Mendelow A, Gregson B, Rowan E, Murray G, Gholkar A, Mitchell P; STICH II Investigators. Early surgery versus initial conservative treatment in patients with spontaneous supratentorial lobar intracerebral haematomas (STICH II): a randomised trial. *Lancet*. 2013;382(9890):397-408. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60986-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60986-1)
 242. Merino P, Diaz A, Manrique LG, Cheng L, Yepes M. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) promotes ezrin-mediated reorganization of the synaptic cytoskeleton in the ischemic brain. *J Biol Chem*. 2018 Jun 15;293(24):9234-9247. doi: 10.1074/jbc.RA118.002534
 243. Merino P, Diaz A, Torre ER, Yepes M. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) regulates the expression and function of growth-associated protein 43 (GAP-43) in the synapse. *J Biol Chem*. 2020 Jan 10;295(2):619-630. doi: 10.1074/jbc.RA119.010644
 244. Molina C, Montaner J, Abilleira S, Ibarra B, Romero F, Arenillas J, Alvarez-Sabín J. Timing of spontaneous recanalization and risk of hemorrhagic transformation in acute cardioembolic stroke. *Stroke*. 2001;32(5):1079-84. <https://doi.org/10.1161/01.str.32.5.1079>
 245. Moll G, Hoogduijn MJ, Ankrum JA. Editorial: Safety, Efficacy and Mechanisms of Action of Mesenchymal Stem Cell Therapies. *Front Immunol*. 2020 Feb 18;11:243. doi: 10.3389/fimmu.2020.00243
 246. Mu J, Bakreen A, Juntunen M, Korhonen P, Oinonen E, Cui L, Myllyniemi M, Zhao S, Miettinen S, Jolkkonen J. Combined Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell Therapy and Rehabilitation in Experimental Stroke. *Frontiers in Neurology*. 2019;10:235. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00235>
 247. Muzio L, Viotti A, Martino G. Microglia in Neuroinflammation and Neurodegeneration: From Understanding to Therapy. *Frontiers in neuroscience*. 2021;15:742065. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.742065>
 248. Myers JP, Santiago-Medina M, Gomez TM. Regulation of axonal outgrowth and pathfinding by integrin-ECM interactions. *Dev Neurobiol*. 2011 Nov;71(11):901-23. doi: 10.1002/dneu.20931
 249. Mykhailenko V., Kyrychenko V., Bragin A. and Chuiko D. - Generation, Evaluation, and Prospects of Further Use of Mutations Based on New Homozygous Self-Pollinated Sunflower Lines, Genotoxicity and Mutagenicity - Mechanisms and Test Methods, 2019, doi: 10.5772/intechopen.89563
 250. Nadeau CA, Dietrich K, Wilkinson CM, Crawford AM, George GN, Nichol HK, Colbourne F. Prolonged Blood-Brain Barrier Injury Occurs After Experimental Intracerebral

- Hemorrhage and Is Not Acutely Associated with Additional Bleeding. *Transl Stroke Res.* 2019 Jun;10(3):287-297. doi: 10.1007/s12975-018-0636-9.
251. Nagoshi N, Tsuji O, Kitamura K, Suda K, Maeda T, Yato Y, Abe T, Hayata D, Matsumoto M, Okano H, Nakamura M. Phase I/II Study of Intrathecal Administration of Recombinant Human Hepatocyte Growth Factor in Patients with Acute Spinal Cord Injury: A Double-Blind, Randomized Clinical Trial of Safety and Efficacy. *J Neurotrauma.* 2020 Aug 1;37(15):1752-1758. doi: 10.1089/neu.2019.6854.
252. Naldini L, Vigna E, Bardelli A, Follenzi A, Galimi F, Comoglio PM. Biological activation of pro-HGF (hepatocyte growth factor) by urokinase is controlled by a stoichiometric reaction. *J Biol Chem.* 1995 Jan 13;270(2):603-11. doi: 10.1074/jbc.270.2.603
253. Naldini L, Blömer U, Gage FH, Trono D, Verma IM. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Oct 15;93(21):11382-8. doi: 10.1073/pnas.93.21.11382
254. Namioka A, Namioka T, Sasaki M, Kataoka-Sasaki Y, Oka S, Nakazaki M, Onodera R, Suzuki J, Sasaki Y, Nagahama H, Kocsis J, Honmou O. Intravenous infusion of mesenchymal stem cells for protection against brainstem infarction in a persistent basilar artery occlusion model in the adult rat. *Journal of neurosurgery.* 2018;1:1-9. <https://doi.org/10.3171/2018.4.JNS173121>
255. Nampoothiri, M.; Reddy, N.D.; John, J.; Kumar, N.; Kutty Nampurath, G.; Rao Chamallamudi M. Insulin blocks glutamate-induced neurotoxicity in differentiated SH-SY5Y neuronal cells. *Behav Neurol*, 2014, 2014, 674164. doi:10.1155/2014/674164
256. Narayanaswamy PB, Baral TK, Haller H, Dumler I, Acharya K, Kiyan Y. Transcriptomic pathway analysis of urokinase receptor silenced breast cancer cells: a microarray study. *Oncotarget.* 2017 Sep 28;8(60):101572-101590. doi: 10.18632/oncotarget.21351
257. Neupokoeva OV, Lopatina KA, Voronova OL, Safonova EA, Zueva EP, Churin AA. Mutagenic characteristics research of $\alpha(1,2)$ -l-rhamno- $\alpha(1,4)$ -d-galactopiranoziluronan *Acorus calamus* L. *Pacif Med J* 2015;2:22–23.
258. Ng S, Lee A. Traumatic Brain Injuries: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets. *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 2019;13:528. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00528>
259. Nijs J, Meeus M, Versijpt J, et al. Brain-derived neurotrophic factor as a driving force behind neuroplasticity in neuropathic and central sensitization pain: a new therapeutic target? *Expert Opin Ther Targets* 2015;19(4):565–576.
260. Charles R. Noback , Norman L. Strominger , Robert J. Demarest , David A. Ruggiero - *The Human Nervous System. Structure and Function*, 6th ed. 2005, Humana press
261. Novelli EL, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GM, Rodrigues HG, Mani F, Fernandes AA, Cicogna AC, Novelli Filho JL. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim.* 2007 Jan;41(1):111-9. doi: 10.1258/002367707779399518.
262. Nykjaer A, Petersen CM, Møller B, Andreasen PA, Gliemann J. Identification and characterization of urokinase receptors in natural killer cells and T-cell-derived lymphokine activated killer cells. *FEBS Lett.* 1992 Mar 23;300(1):13-7. doi: 10.1016/0014-5793(92)80154-9
263. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Health Effects/ TG 489 In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay
264. Olive, P., Banáth, J. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc* 2006;1: 23–29.
265. Onda T, Honmou O, Harada K, Houkin K, Hamada H, Kocsis J. Therapeutic benefits by human mesenchymal stem cells (hMSCs) and Ang-1 gene-modified hMSCs after cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.* 2008;28(2):329-40. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600527>

266. Onzi GR, Ledur PF, Hainzenreder LD, Bertoni AP, Silva AO, Lenz G, Wink MR. Analysis of the safety of mesenchymal stromal cells secretome for glioblastoma treatment. *Cytotherapy*. 2016 Jul;18(7):828-37. doi: 10.1016/j.jcyt.2016.03.299
267. Ouellette MM, McDaniel LD, Wright WE, Shay JW, Schultz RA. The establishment of telomerase-immortalized cell lines representing human chromosome instability syndromes. *Hum Mol Genet*. 2000 Feb 12;9(3):403-11. doi: 10.1093/hmg/9.3.403
268. Pajarinen J, Lin T, Gibon E, Kohno Y, Maruyama M, Nathan K, Lu L, Yao Z, Goodman SB. Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing. *Biomaterials*. 2019 Mar;196:80-89. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.12.025
269. Pawitan JA. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *Biomed Res Int*. 2014;2014:965849. doi: 10.1155/2014/965849.
270. Paxinos, G.; Watson, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6th Edition. Cambridge: Academic Press, 2007
271. Pereira Lopes F.R., Martin P.K., Frattini F. et al. Double gene therapy with granulocyte colony-stimulating factor and vascular endothelial growth factor acts synergistically to improve nerve regeneration and functional outcome after sciatic nerve injury in mice. *Neuroscience* 2013; 230: 184-97.
272. Perígolo-Vicente R, Ritt K, Gonçalves-de-Albuquerque CF, Castro-Faria-Neto HC, Paes-de-Carvalho R, Giestal-de-Araujo E. IL-6, A1 and A2aR: a crosstalk that modulates BDNF and induces neuroprotection. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Jul 11;449(4):477-82. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.036
273. Pesirikan N., Chang W., Zhang X. et al. Characterization of schwann cells in self-assembled sheets from thermoresponsive substrates. *Tissue Eng. Part A* 2013; 19(13-14): 1601-9.
274. Petrenko Y, Vackova I, Kekulova K, Chudickova M, Koci Z, Turnovcova K, Kupcova Skalnikova H, Vodicka P, Kubinova S. A Comparative Analysis of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells derived from Different Sources, with a Focus on Neuroregenerative Potential. *Scientific reports*. 2020;10(1):4290. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61167-z>
275. Pischiutta F, Caruso E, Lugo A, Cavaleiro H, Stocchetti N, Citerio G, Salgado A, Gallus S, Zanier E. Systematic review and meta-analysis of preclinical studies testing mesenchymal stromal cells for traumatic brain injury. *NPJ Regenerative Medicine*. 2021;6(1):71. <https://doi.org/10.1038/s41536-021-00182-8>
276. Pittman R.I., Ivins J.K., Buettner H.M. Neuronal Plasminogen Activators: Cell Surface Binding Sites and Involvement in Neurite Outgrowth *The Journal of Neuroscience* 1989; 9(12): 4269-86.
277. Ploug J, Kjeldgaard NO. Isolation of a plasminogen activator (urokinase) from urine. *Arch Biochem Biophys*. 1956 Jun;62(2):500-1. doi: 10.1016/0003-9861(56)90149-7
278. Porter GA, O'Connor JC. Brain-derived neurotrophic factor and inflammation in depression: Pathogenic partners in crime? *World J Psychiatry*. 2022 Jan 19;12(1):77-97. doi: 10.5498/wjp.v12.i1.77
279. Powell R.J., Goodney P., Mendelsohn F.O. et al. Safety and efficacy of patient specific intramuscular injection of HGF plasmid gene therapy on limb perfusion and wound healing in patients with ischemic lower extremity ulceration: results of the HGF-0205 trial. *J. Vasc. Surg*. 2010; 52(6): 1525-30.
280. Primak A., Kalinina N., Skryabina M. et al. Novel Immortalized Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Line for Studying Hormonal Signaling, *International Journal of Molecular Sciences* 2024; 25(4): 2421.
281. Primak A., Skryabina M., Dzhanuari S. et al. The secretome of mesenchymal stromal cells as a new hope in the treatment of acute brain tissue injuries, *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova* 2024; 124: 83-91

282. Ramos-Zaldívar HM, Polakovicova I, Salas-Huenuleo E, Corvalán AH, Kogan MJ, Yefi CP, Andia ME. Extracellular vesicles through the blood-brain barrier: a review. *Fluids Barriers CNS*. 2022 Jul 25;19(1):60. doi: 10.1186/s12987-022-00359-3
283. Rao F, Wang Y, Zhang D, Lu C, Cao Z, Sui J, Wu M, Zhang Y, Pi W, Wang B, Kou Y, Wang X, Zhang P, Jiang B. Aligned chitosan nanofiber hydrogel grafted with peptides mimicking bioactive brain-derived neurotrophic factor and vascular endothelial growth factor repair long-distance sciatic nerve defects in rats. *Theranostics*. 2020 Jan 1;10(4):1590-1603. doi: 10.7150/thno.36272.
284. Reddi D., Curran N. Chronic pain after surgery: pathophysiology, risk factors and prevention. *Postgrad. Med. J.* 2014; 90(1062): 222-7.
285. Ridder K, Sevko A, Heide J, Dams M, Rupp AK, Macas J, Starmann J, Tjwa M, Plate KH, Sültmann H, Altevogt P, Umansky V, Momma S. Extracellular vesicle-mediated transfer of functional RNA in the tumor microenvironment. *Oncoimmunology*. 2015 Mar 19;4(6):e1008371. doi: 10.1080/2162402X.2015.1008371
286. Rolland AP, Mumper RJ. Plasmid delivery to muscle: Recent advances in polymer delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;30(1-3):151–172.
287. Roslavtceva, V.; Evgeniy Bushmelev, Pavel Astanin, Tatyana Zabrodskaya, Alla Salmina, Semen Prokopenko, Vera Laptenkova & Michael Sadovsky (2020). Blood Plasma Trophic Growth Factors Predict the Outcome in Patients with Acute Ischemic Stroke. In: Rojas, I., Valenzuela, O., Rojas, F., Herrera, L., Ortuño, F. (eds) *Bioinformatics and Biomedical Engineering. IWBBIO 2020. Lecture Notes in Computer Science()*, vol 12108. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-45385-5_3.
288. Rothman SM, Olney JW. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic--ischemic brain damage. *Ann Neurol*. 1986 Feb;19(2):105-11. doi: 10.1002/ana.410190202
289. Rubtsov Y, Goryunov K, Romanov A, Suzdaltseva Y, Sharonov G, Tkachuk V. Molecular Mechanisms of Immunomodulation Properties of Mesenchymal Stromal Cells: A New Insight into the Role of ICAM-1. *Stem Cells Int*. 2017;2017:6516854. doi: 10.1155/2017/6516854.
290. Rufino-Ramos D, Albuquerque PR, Carmona V, Perfeito R, Nobre RJ, Pereira de Almeida L. Extracellular vesicles: Novel promising delivery systems for therapy of brain diseases. *J Control Release*. 2017 Sep 28;262:247-258. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.07.001.
291. Russo V.C., Gluckman P.D., Feldman E.L. et al. The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain. *Endocr. Rev*. 2005; 26(7): 916-43.
292. Sagaradze, G.; Grigorieva, O.; Nimiritsky, P.; Basalova, N.; Kalinina, N.; Akopyan, Z.; Efimenko A. Conditioned Medium from Human Mesenchymal Stromal Cells: Towards the Clinical Translation. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(7), 1656. doi: 10.3390/ijms20071656
293. Sagaradze G, Basalova N, Efimenko A, Tkachuk V. Mesenchymal Stromal Cells as Critical Contributors to Tissue Regeneration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020;8:576176. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.576176>
294. Saint-Pol J, Gosselet F, Duban-Deweert S, Pottiez G, Karamanos Y. Targeting and Crossing the Blood-Brain Barrier with Extracellular Vesicles. *Cells*. 2020 Apr 1;9(4):851. doi: 10.3390/cells9040851
295. Sakata H, Niizuma K, Wakai T, Narasimhan P, Maier C, Chan P. Neural stem cells genetically modified to overexpress Cu/Zn-superoxide dismutase enhance amelioration of ischemic stroke in mice. *Stroke*. 2012;43(9):2423-9. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.112.656900>
296. Saloheimo P, Juvela S, Riutta A, Pyhtinen J, Hillbom M. Thromboxane and prostacyclin biosynthesis in patients with acute spontaneous intracerebral hemorrhage. *Thrombosis research*. 2005;115(5):367-73. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2004.08.026>
297. Salzer JL, Zalc B. Myelination. *Curr Biol*. 2016 Oct 24;26(20):R971-R975. doi: 10.1016/j.cub.2016.07.074
298. Sanes J.R., Lichtman J.W. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu. Rev. Neurosci*. 1999; 22: 389-442.

299. Schachtrup C, Lu P, Jones LL, Lee JK, Lu J, Sachs BD, Zheng B, Akassoglou K. Fibrinogen inhibits neurite outgrowth via beta 3 integrin-mediated phosphorylation of the EGF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jul 10;104(28):11814-9. doi: 10.1073/pnas.0704045104
300. Schülke S. Induction of Interleukin-10 Producing Dendritic Cells As a Tool to Suppress Allergen-Specific T Helper 2 Responses. *Front Immunol*. 2018 Mar 19;9:455. doi: 10.3389/fimmu.2018.00455.
301. Seiradake E, Jones EY, Klein R. Structural Perspectives on Axon Guidance. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2016 Oct 6;32:577-608. doi: 10.1146/annurev-cellbio-111315-125008
302. Semina, E.V., Rubina, K.A., Sysoeva, V.Y. et al. Three-dimensional model of biomatrix as a method of studying blood vessels and nerve growth in tissue engineering structures. *Moscow Univ. Chem. Bull.* 71, 172–177 (2016). <https://doi.org/10.3103/S0027131416030081>
303. Semina E, Rubina K, Sysoeva V, Rysenkova K, Klimovich P, Plekhanova O, Tkachuk V. Urokinase and urokinase receptor participate in regulation of neuronal migration, axon growth and branching. *Eur J Cell Biol*. 2016 Sep;95(9):295-310. doi: 10.1016/j.ejcb.2016.05.003
304. Shao Z, Tu S, Shao A. Pathophysiological Mechanisms and Potential Therapeutic Targets in Intracerebral Hemorrhage. *Front Pharmacol*. 2019 Sep 19;10:1079. doi: 10.3389/fphar.2019.01079.
305. Shevchenko E.K., Makarevich P.I., Tsokolaeva Z.I. et al. Transplantation of modified human adipose derived stromal cells expressing VEGF165 results in more efficient angiogenic response in ischemic skeletal muscle. *J. Transl. Med*. 2013; 11: 138-52.
306. Shi J, Song X, Traub B, Luxenhofer M, Kornmann M. Involvement of IL-4, IL-13 and Their Receptors in Pancreatic Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 15;22(6):2998. doi: 10.3390/ijms22062998.
307. Shi L, Zhang Y, Dong X, Pan Y, Ying H, Chen J, Yang W, Zhang Y, Fei H, Liu X, Wei C, Lin H, Zhou H, Zhao C, Yang A, Zhou F, Zhang S. Toxicity from a single injection of human umbilical cord mesenchymal stem cells into rat ovaries. *Reprod Toxicol*. 2022 Jun;110:9-18. doi: 10.1016/j.reprotox.2022.03.006.
308. Shmakova AA, Balatskiy AV, Kulebyakina MA, et al. Urokinase Receptor uPAR Overexpression in Mouse Brain Stimulates the Migration of Neurons into the Cortex during Embryogenesis. *Russian Journal of Developmental Biology*. 2021;52(1):53-63. <https://doi.org/10.1134/S1062360421010069>
309. Shmakova AA, Rysenkova KD, Ivashkina OI, Gruzdeva AM, Klimovich PS, Popov VS, Rubina KA, Anokhin KV, Tkachuk VA, Semina EV. Early Induction of Neurotrophin Receptor and miRNA Genes in Mouse Brain after Pentilenetetrazole-Induced Neuronal Activity. *Biochemistry (Mosc)*. 2021 Oct;86(10):1326-1341. doi: 10.1134/S0006297921100138
310. Shmakova AA, Klimovich PS, Rysenkova KD, Popov VS, Gorbunova AS, Karpukhina AA, Karagyaur MN, Rubina KA, Tkachuk VA, Semina EV. Urokinase Receptor uPAR Downregulation in Neuroblastoma Leads to Dormancy, Chemoresistance and Metastasis. *Cancers (Basel)*. 2022 Feb 16;14(4):994. doi: 10.3390/cancers14040994
311. Shmakova AA, Semina EV, Neyfeld EA, Tsygankov BD, Karagyaur MN. Analiz svyazi geneticheskikh faktorov s riskom razvitiya shizofrenii [An analysis of the relationship between genetic factors and the risk of schizophrenia]. *Zh Nevrol Psikiatr Im S S Korsakova*. 2023;123(2):26-36. Russian. doi: 10.17116/jnevro202312302126
312. Shoichet MS, Tator CH, Poon P, Kang C, Baumann MD. Intrathecal drug delivery strategy is safe and efficacious for localized delivery to the spinal cord. *Prog Brain Res*. 2007;161:385-92. doi: 10.1016/S0079-6123(06)61027-3.
313. Siconolfi L.B., Seeds N.W. Induction of the plasminogen activator system accompanies peripheral nerve regeneration after sciatic nerve crush. *J. Neurosci*. 2001; 21(12): 4336-47.

314. Sifat A, Vaidya B, Abbruscato T. Blood-Brain Barrier Protection as a Therapeutic Strategy for Acute Ischemic Stroke. *The AAPS Journal*. 2017;19(4):957-972. <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0091-7>
315. Silver DF, Hempling RE, Piver MS, Repasky EA. Flt-3 ligand inhibits growth of human ovarian tumors engrafted in severe combined immunodeficient mice. *Gynecol Oncol*. 2000 Jun;77(3):377-82. doi: 10.1006/gyno.2000.5782
316. Simmons DA. Modulating Neurotrophin Receptor Signaling as a Therapeutic Strategy for Huntington's Disease. *J Huntingtons Dis*. 2017;6(4):303-325. doi: 10.3233/JHD-170275
317. Simons M., Trajkovic K. Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *J. Cell Sci*. 2006; 119(Pt 21): 4381-9.
318. Snow D.M., Lemmon V., Carrino D.A. et al. Sulfated proteoglycans in astroglial barriers inhibit neurite outgrowth in vitro. *Exp. Neurol*. 1990; 109(1): 111-30.
319. Snyder J, Wu Z. Origins of nervous tissue susceptibility to ferroptosis. *Cell Insight*. 2023 Mar 27;2(3):100091. doi: 10.1016/j.cellin.2023.100091
320. Sobrino T, Rodríguez-Yáñez M, Campos F, Iglesias-Rey R, Millán M, de la Ossa NP, Dávalos A, Delgado-Mederos R, Martínez-Domeño A, Martí-Fábregas J, Castellanos M, Serena J, Lago A, Díez-Tejedor E, Castillo J. Association of High Serum Levels of Growth Factors with Good Outcome in Ischemic Stroke: a Multicenter Study. *Transl Stroke Res*. 2020 Aug;11(4):653-663. doi: 10.1007/s12975-019-00747-2.
321. Sodhi RK, Bansal Y, Singh R, Saroj P, Bhandari R, Kumar B, Kuhad A. IDO-1 inhibition protects against neuroinflammation, oxidative stress and mitochondrial dysfunction in 6-OHDA induced murine model of Parkinson's disease. *Neurotoxicology*. 2021 May;84:184-197. doi: 10.1016/j.neuro.2021.03.009.
322. Song M., Chen S.Z., Han H. et al. An experimental study on repair of peripheral nerve injury by transplantation of microcapsulated NGF-expressing NIH 3T3 cells. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi* 2005; 21(1): 53-7.
323. Sorby-Adams A, Marcoionni A, Dempsey E, Woenig J, Turner R. The Role of Neurogenic Inflammation in Blood-Brain Barrier Disruption and Development of Cerebral Oedema Following Acute Central Nervous System (CNS) Injury. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(8):1788. <https://doi.org/10.3390/ijms18081788>
324. Stiles J, Jernigan TL. The basics of brain development. *Neuropsychol Rev*. 2010 Dec;20(4):327-48. doi: 10.1007/s11065-010-9148-4.
325. Stolp HB, Molnár Z. Neurogenic niches in the brain: help and hindrance of the barrier systems. *Front Neurosci*. 2015 Feb 3;9:20. doi: 10.3389/fnins.2015.00020.
326. Storkebaum E., Carmeliet P. VEGF: a critical player in neurodegeneration. *J. Clin. Invest*. 2004; 113(1): 14-8.
327. Su X, Qiao L, Liu Q, Shang Y, Guan X, Xiu M, Zhang X. Genetic polymorphisms of BDNF on cognitive functions in drug-naive first episode patients with schizophrenia. *Sci Rep*. 2021 Oct 8;11(1):20057. doi: 10.1038/s41598-021-99510-7
328. Sun H, Bénardais K, Stanslowsky N, Thau-Habermann N, Hensel N, Huang D, Claus P, Dengler R, Stangel M, Petri S. Therapeutic potential of mesenchymal stromal cells and MSC conditioned medium in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)--in vitro evidence from primary motor neuron cultures, NSC-34 cells, astrocytes and microglia. *PLoS One*. 2013;8(9):e72926. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072926>
329. Sun D. The potential of endogenous neurogenesis for brain repair and regeneration following traumatic brain injury. *Neural Regen Res*. 2014 Apr 1;9(7):688-92. doi: 10.4103/1673-5374.131567
330. Suzuki Y, Nagai N, Umemura K. A Review of the Mechanisms of Blood-Brain Barrier Permeability by Tissue-Type Plasminogen Activator Treatment for Cerebral Ischemia. *Front Cell Neurosci*. 2016 Jan 25;10:2. doi: 10.3389/fncel.2016.00002.
331. Tajbakhsh A, Mokhtari-Zaer A, Rezaee M, et al. Therapeutic Potentials of BDNF/TrkB in Breast Cancer; Current Status and Perspectives. *J Cell Biochem* 2017;118(9):2502–2515.

332. Tannemaat M.R., Verhaagen J., Malesy M. The application of viral vectors to enhance regeneration after peripheral nerve repair. *Neurol. Res.* 2008; 30(10): 1039-46.
333. Tayler H, Miners J, Güzel Ö, MacLachlan R, Love S. Mediators of cerebral hypoperfusion and blood-brain barrier leakiness in Alzheimer's disease, vascular dementia and mixed dementia. *Brain Pathology.* 2021;31(4):e12935. <https://doi.org/10.1111/bpa.12935>
334. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J. Anat.* 1999; 194: 1-14.
335. Traktuev DO, Tsokolaeva ZI, Shevelev AA, Talitskiy KA, Stepanova VV, Johnstone BH, Rahmat-Zade TM, Kapustin AN, Tkachuk VA, March KL, Parfyonova YV. Urokinase gene transfer augments angiogenesis in ischemic skeletal and myocardial muscle. *Mol Ther.* 2007 Nov;15(11):1939-46. doi: 10.1038/sj.mt.6300262
336. Tyurin-Kuzmin PA, Karagyaur MN, Kulebyakin KY, Dyikanov DT, Chechekhin VI, Ivanova AM, Skryabina MN, Arbatskiy MS, Sysoeva VY, Kalinina NI, Tkachuk VA. Functional Heterogeneity of Protein Kinase A Activation in Multipotent Stromal Cells. *Int J Mol Sci.* 2020 Jun 22;21(12):4442. doi: 10.3390/ijms21124442.
337. Unal M, Peyman GA. The efficacy of plasminogen-urokinase combination in inducing posterior vitreous detachment. *Retina.* 2000;20(1):69-75. doi: 10.1097/00006982-200001000-00013.
338. Ichim T., Patel A. Inducing and accelerating post-stroke recovery by administration of amniotic fluid derived stem cells. US patent 20180071342A1. September 12, 2017.
339. Uyeda A, Muramatsu R. Molecular Mechanisms of Central Nervous System Axonal Regeneration and Remyelination: A Review. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 30;21(21):8116. doi: 10.3390/ijms21218116.
340. Vidal, Справочник лекарственных средств, Гиалуронидаза, <https://www.vidal.ru/drugs/molecule/1438>
341. Viswanathan, S.; Shi, Y.; Galipeau, J.; Krampera, M.; Leblanc, K.; Martin, I.; Nolta, J.; Phinney, D.G.; Sensebe, L. Mesen-chymal Stem versus Stromal Cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell Committee Position Statement on Nomenclature. *Cytother*, 2019, 21 (10), 1019–1024. doi: 10.1016/j.jcyt.2019.08.002
342. Vleggeert-Lankamp CLAM (2007) The role of evaluation methods in the assessment of peripheral nerve regeneration through synthetic conduits: a systematic review laboratory investigation. *J Neurosurg* 107(6):1168-1189.
343. Vogel DY, Glim JE, Stavenuiter AW, Breur M, Heijnen P, Amor S, Dijkstra CD, Beelen RH. Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared. *Immunobiology.* 2014 Sep;219(9):695-703. doi: 10.1016/j.imbio.2014.05.002
344. Wang Y, Chang CF, Morales M, Chiang YH, Hoffer J. Protective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor in ischemic brain injury. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 May;962:423-37. doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04086.x
345. Wang H, Li X, Shan L, Zhu J, Chen R, Li Y, Yuan W, Yang L, Huang J. Recombinant hNeuritin Promotes Structural and Functional Recovery of Sciatic Nerve Injury in Rats. *Front Neurosci.* 2016 Dec 22;10:589. doi: 10.3389/fnins.2016.00589.
346. Wang Y, Yu P, Li Y, Zhao Z, Wu X, Zhang L, Feng J, Hong JS. Early-Released Interleukin-10 Significantly Inhibits Lipopolysaccharide-Elicited Neuroinflammation In Vitro. *Cells.* 2021 Aug 24;10(9):2173. doi: 10.3390/cells10092173.
347. Watts ME, Pocock R, Claudianos C. Brain Energy and Oxygen Metabolism: Emerging Role in Normal Function and Disease. *Front Mol Neurosci.* 2018 Jun 22;11:216. doi: 10.3389/fnmol.2018.00216
348. Wertz A, Trenholm S, Yonehara K, Hillier D, Raics Z, Leinweber M, Szalay G, Ghanem A, Keller G, Rozsa B, Conzelmann KK, Roska B - PRESYNAPTIC NETWORKS. Single-cell-initiated monosynaptic tracing reveals layer-specific cortical network modules. *Science.* 2015 Jul 3;349(6243):70-4. doi: 10.1126/science.aab1687

349. Stroke, Cerebrovascular accident. World Health Organization. <https://www.emro.who.int/health-topics/stroke-cerebrovascular-accident/index.html>
350. Wijeratne T, Gillard Crewther S, Sales C, Karimi L. COVID-19 Pathophysiology Predicts That Ischemic Stroke Occurrence Is an Expectation, Not an Exception-A Systematic Review. *Frontiers in Neurology*. 2021;11:607221. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.607221>
351. Wilkinson DA, Pandey AS, Thompson BG, Keep RF, Hua Y, Xi G. Injury mechanisms in acute intracerebral hemorrhage. *Neuropharmacology*. 2018 May 15;134(Pt B):240-248. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.09.033.
352. Winkler E, Minter D, Yue J, Manley G. Cerebral Edema in Traumatic Brain Injury: Pathophysiology and Prospective Therapeutic Targets. *Neurosurgery Clinics*. 2016;27(4):473-88. <https://doi.org/10.1016/j.nec.2016.05.008>
353. Witcher KG, Eiferman DS, Godbout JP. Priming the inflammatory pump of the CNS after traumatic brain injury. *Trends Neurosci*. 2015 Oct;38(10):609-620. doi: 10.1016/j.tins.2015.08.002
354. Wojtyla A, Gladych M, Rubis B. Human telomerase activity regulation. *Mol Biol Rep*. 2011 Jun;38(5):3339-49. doi: 10.1007/s11033-010-0439-x
355. Wu H, Zheng J, Xu S, Fang Y, Wu Y, Zeng J, Shao A, Shi L, Lu J, Mei S, Wang X, Guo X, Wang Y, Zhao Z, Zhang J. Mer regulates microglial/macrophage M1/M2 polarization and alleviates neuroinflammation following traumatic brain injury. *J Neuroinflammation*. 2021 Jan 5;18(1):2. doi: 10.1186/s12974-020-02041-7
356. Xiao L, Hareendran S, Loh YP. Function of exosomes in neurological disorders and brain tumors. *Extracell Vesicles Circ Nucl Acids*. 2021;2:55-79. doi: 10.20517/evcna.2021.04.
357. Xin H, Li Y, Liu Z, Wang X, Shang X, Cui Y, Zhang Z, Chopp M. MiR-133b promotes neural plasticity and functional recovery after treatment of stroke with multipotent mesenchymal stromal cells in rats via transfer of exosome-enriched extracellular particles. *Stem Cells*. 2013;31(12):2737-46. <https://doi.org/10.1002/stem.1409>
358. Xin H, Liu Z, Buller B, Li Y, Golembieski W, Gan X, Wang F, Lu M, Ali MM, Zhang ZG, Chopp M. MiR-17-92 enriched exosomes derived from multipotent mesenchymal stromal cells enhance axon-myelin remodeling and motor electrophysiological recovery after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2021 May;41(5):1131-1144. doi: 10.1177/0271678X20950489
359. Xiong Y, Song J, Huang X, Pan Z, Goldbrunner R, Stavrinou L, Lin S, Hu W, Zheng F, Stavrinou P. Exosomes Derived From Mesenchymal Stem Cells: Novel Effects in the Treatment of Ischemic Stroke. *Frontiers in Neuroscience*. 2022;16:899887. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.899887>
360. Yang Y, Rosenberg G. Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease. *Stroke*. 2011;42(11):3323-8. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.608257>
361. Yao MY, Liu T, Zhang L, Wang MJ, Yang Y, Gao J. Role of ferroptosis in neurological diseases. *Neurosci Lett*. 2021 Mar 16;747:135614. doi: 10.1016/j.neulet.2020.135614
362. Yao Y, Zhang Y, Liao X, Yang R, Lei Y, Luo J. Potential Therapies for Cerebral Edema After Ischemic Stroke: A Mini Review. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2021;12:618819. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.618819>
363. Yperzeele L, Van Hooff R, De Smedt A, Valenzuela Espinoza A, Van de Casseye R, Hubloue I, De Keyser J, Brouns R. Prehospital stroke care: limitations of current interventions and focus on new developments. *Cerebrovascular Diseases*. 2014;38(1):1-9. <https://doi.org/10.1159/000363617>.
364. Zachary I. Neuroprotective role of vascular endothelial growth factor: signalling mechanisms, biological function, and therapeutic potential. *Neurosignals* 2005; 14(5): 207-21.
365. Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Zhang R, Davies K, Powers C, Bruggen Nv, Chopp M. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest*. 2000 Oct;106(7):829-38. doi: 10.1172/JCI9369

366. Zhang Y, Sun T, Jiang C. Biomacromolecules as carriers in drug delivery and tissue engineering. *Acta Pharm Sin B*. 2018 Jan;8(1):34-50. doi: 10.1016/j.apsb.2017.11.005
367. Zhang H, Caudle Y, Wheeler C, Zhou Y, Stuart C, Yao B, Yin D. TGF- β 1/Smad2/3/Foxp3 signaling is required for chronic stress-induced immune suppression. *J Neuroimmunol*. 2018 Jan 15;314:30-41. doi: 10.1016/j.jneuroim.2017.11.005.
368. Zhang J, Li Y, Chen J, Yang M, Katakowski M, Lu M, Chopp M. Expression of insulin-like growth factor 1 and receptor in ischemic rats treated with human marrow stromal cells. *Brain research*. 2004;1030(1):19-27. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.09.061>
369. Zhang J, Mu X, Breker DA, Li Y, Gao Z, Huang Y. Atorvastatin treatment is associated with increased BDNF level and improved functional recovery after atherothrombotic stroke. *Int J Neurosci*. 2017 Jan;127(1):92-97. doi: 10.3109/00207454.2016.1146882.
370. Zhang Q, Chen Z, Zhao Y, Liu B, Liu N, Ke C, Tan H. Bone Marrow Stromal Cells Combined With Sodium Ferulate and n-Butylidenephthalide Promote the Effect of Therapeutic Angiogenesis via Advancing Astrocyte-Derived Trophic Factors After Ischemic Stroke. *Cell Transplantation*. 2017;26(2):229-242. <https://doi.org/10.3727/096368916X693536>
371. Zhang S, Lachance B, Moiz B, Jia X. Optimizing Stem Cell Therapy after Ischemic Brain Injury. *Journal of Stroke*. 2020;22(3):286-305. <https://doi.org/10.5853/jos.2019.03048>
372. A Zietzer, M.R Hosen, P.R Goody, N Werner, G Nickenig, F Jansen, HnRNPU regulates intra- and intercellular microRNA trafficking in a sequence specific manner, *European Heart Journal*, Volume 41, Issue Supplement_2, November 2020, ehaa946.3611, <https://doi.org/10.1093/ehjci/ehaa946.3611>
373. Zietzer A, Hosen MR, Wang H, Goody PR, Sylvester M, Latz E, Nickenig G, Werner N, Jansen F. The RNA-binding protein hnRNPU regulates the sorting of microRNA-30c-5p into large extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2020 Jul 2;9(1):1786967. doi: 10.1080/20013078.2020.1786967
374. Zoerle T, Carbonara M, Zanier E, Ortolano F, Bertani G, Magnoni S, Stocchetti N. Rethinking Neuroprotection in Severe Traumatic Brain Injury: Toward Bedside Neuroprotection. *Frontiers in neurology*. 2017;8:354. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00354>
375. Zubkova ES, Dergilev KV, Beloglazova IB, Molokotina YD, Boldyreva MA, Tsokolaeva ZI, Stafeev IS, Menshikov MY, Parfyonova YV. Features of the Population of Mouse Peritoneal Macrophages Isolated after Stimulation with Concanavalin A and Thioglycolate. *Bull Exp Biol Med*. 2021 Aug;171(4):532-540. doi: 10.1007/s10517-021-05265-6
376. Zvereva MI, Shcherbakova DM, Dontsova OA. Telomerase: structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry (Mosc)*. 2010 Dec;75(13):1563-83. doi: 10.1134/s0006297910130055

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1. Праймеры и параметры амплификации, использованные в работе

Раздел (Задача)	Ген (Homo sapiens)	Последовательность (5'→3')	Температура отжига*, °C	Длина ампликона, п.н.
Раздел 2.4 (Создание бицистронной генотерапевтической конструкции)	BDNF (кДНК)	TTTTGCTAGCCACCATGGCGACCATC CTTTTCSTTACTATGGTTATTTTCATAC TTTGG	63	771
		TATTAAGCTTTTCATCTTCCCCTTTTAA TGGTCAATGTACATACACAAGAAGTG TCTATC		
	uPA (кДНК)	TTTAGGTACCAGAGCCCTGCTGGCGC GCCTGCTTCTCTGC	68	1315
		TATCGCGGCCGCTCAGAGGGCCAGGC CATTCTCTTCCTTGGTGTGAC		
Разделы 2.14-2.16, 2.20 (Иммортализация клеточной линии и оценка экспрессии целевых генов в ней)	TERT (кДНК)	CCACCGAATTCGCCACCATGCCGCGC GCTCCCCGCTGCCGAGCCGTGCGCT GCGTCGTGCGACTCAGTCCAGGATGGT CTTGAAGTCTGAGGGCAGTGCCGGGT TG	68	3430
		CCACCGTGCACCCTGTGGAATGTGTG TCAGTTAGGGTGTGGAAAG		
	Кассета устойчивости к пуромицину	CCACCGGTACCTGTTCCATCTGTTCCCT GACCTTGATCTGAACTTCTCTATTCTC AGTTATGTA	64	1190
		ACCGTGGTTTTCTGTGTGGTG TCGCTGAGGAGTAGAGGAA		
	TERT (qPCR)	TTAGGGGTCAAGGTGGGCTA AGGCTCCAAGGGAAGTGTG	57	236
		ATTGCGACTGCCTGAATGGA TCCGACCTGCACATAACACC		
	BDNF (qPCR)	ATCAAACCTCACCAAGGCCAG AGGCCACAGGGAACGC	58.5	183
		ACCACACCGGCACAAATTCT ATCCCAACGCTGACATGGAAT		
	uPA (qPCR)	AGTAGCAACCAACGGGAAGG ATGTAATGCAGCAGCCGTGA	58	256
		TGCAATAACCACCCCTGACC ATTTGCCGAAGAGCCCTCAG		
	VEGFA	CTCTCTGCCATCAAGAGCCC TCCCAAAGTAGACCTGCCCA	58	181
		TTTGCTGCCTCCAAGAACAC GTTCCCTGTCGAGCCGTTTCA		
	HGF	TGCTCTGTTGCCTGGTCTCT GTCTGGGTCTTGTTCTCAGC	58.5	296
		CATCCGCTCCTCAATCCTCTC GGTCTTCTCGATGGCACTG		
	IL1A	CAACCCCAAGTATCAGACG GGAGGAACTGAGCAGCATGT	58	161
		AAGTGGACATCAACGGGTTC GAGGCAGAAGTTGGCATGGT		
	IL6	CGACCTGGAAGTCCAACACTAC	53	109
		TNFA		
	IL4			
	IL10			
	IL13			
	IDO			
	TGFB1			
36B4				

		ATCTGCTGCATCTGCTTG		
Раздел 2.14 (Выключение/ подавление экспрессии гена VHL)	gRNA для VHL	CACCGGTCCCAGTTCTCCGCCCTC	-	-
		AAACGAGGGCGGAGAACTGGGACC		
	VHL (qPCR)	ACACACGATGGGCTTCTGG	58	256
		GATGTGCAATGCGCTCCTG		
	VHL (секвенирование)	TAGCCTCGCTCCGTTACAA	59	495
		GCCGTCGAAGTTGAGCCATA		
shRNA (синтетический)	AATCCATTGGTAGGACCA	48	35	
	AAAAAAAAAAAAAAAAATCTGGTCCTA			
Раздел 2.21 (Активация генов- мишеней NF-κB)	COX2	ATGAGATTGTGGAAAAATTGCT	51	299
		GATCATCTCTGCCTGAGTATC		
	CXCL1	AGTCATAGCCACACTCAAGAATGG	56	51
		GATGCAGGATTGAGGCAAGC		
	CXCL2	AGATCAATGTGACGGCAGGG	56	234
		TCTCTGCTCTAACACAGAGGGA		
	IL1B	GCCTGAAGCCCTTGCTGTAGT	57	51
		GCGGCATCCAGCTACGAAT		
	IL6	ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG	53	149
		CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG		

* - расчетная температура отжига для использования ПЦР смесей, содержащих полимеразы Taq, Pfu, с учетом степени комплементарности матрицы

Таблица 2. Результаты общего анализа крови самцов крыс при исследовании подострой токсичности pNCure

Группа	Параметр	Гемоглобин, г/дл	Гематокрит, %	Эритроциты, 10 ¹² /л	Тромбоциты, 10 ⁹ /л	Лейкоциты, 10 ⁹ /л	Нейтрофилы, %	Базофилы, %	Эозинофилы, %	Моноциты, %	Лимфоциты, %
30 суток											
Тох1	Животных в гр.	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	14.38	48.18	8.87	302.42	9.36	24.47	0.07	1.23	2.23	64.92
	Медиана	14.19	48.9	9	302.3	9.48	25.51	0.06	1.2	2.25	64.8
	Ст. откл.	0.41	1.8	0.31	34.11	0.31	3.46	0.03	0.1	0.1	2.57
	Ст.ош.средн.	0.18	0.8	0.14	15.25	0.14	1.55	0.01	0.04	0.04	1.15
Тох2	Животных в гр.	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	14.49	46.64	8.9	291.36	9.23	26.46	0.09	1.24	1.99	66.06
	Медиана	14.46	47.04	8.84	265.5	9.32	26.99	0.11	1.24	1.95	66.6
	Ст. откл.	0.35	1.23	0.21	48.73	0.28	2.84	0.04	0.09	0.14	3.98
	Ст.ош.средн.	0.16	0.55	0.09	21.79	0.13	1.27	0.02	0.04	0.06	1.78
Тох3	Животных в гр.	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	14.91	47.77	8.79	328.18	9.15	23.3	0.07	1.2	2.06	65.12
	Медиана	14.9	48.48	8.74	340.1	9.05	22.12	0.06	1.18	2.05	63.3
	Ст. откл.	0.16	1.72	0.24	23.65	0.3	2.64	0.02	0.07	0.14	3.12
	Ст.ош.средн.	0.07	0.77	0.11	10.58	0.13	1.18	0.01	0.03	0.06	1.4
60 суток											
Тох1	Животных в гр.	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	14.77	46.66	8.93	290.1	9.13	25.39	0.08	1.32	2.21	64.52
	Медиана	14.82	47.16	9.04	288.2	9.15	25.07	0.07	1.31	2.25	63.7
	Ст. откл.	0.29	1.17	0.22	36.82	0.19	2.68	0.02	0.05	0.23	3
	Ст.ош.средн.	0.13	0.52	0.1	16.47	0.08	1.2	0.01	0.02	0.1	1.34
Тох2	Животных в группе	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	14.38	46.4	8.85	318.12	8.95	27.2	0.08	1.25	2.26	63.22
	Медиана	14.21	46.57	8.99	346.7	8.9	28.47	0.08	1.27	2.26	60.7
	Ст. откл.	0.3	0.88	0.35	40.58	0.15	3.93	0.03	0.1	0.06	3.7
	Ст.ош.средн.	0.13	0.39	0.16	18.15	0.07	1.76	0.01	0.04	0.03	1.65
Тох3	Животных в гр.	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	14.56	47.91	8.84	304.18	9.25	27.39	0.08	1.21	2.15	64.54
	Медиана	14.4	48.55	8.99	303.9	9.28	28.77	0.08	1.23	2.2	65.7
	Ст. откл.	0.24	1.54	0.25	30.83	0.08	4.03	0.04	0.04	0.21	2.31
	Ст.ош.средн.	0.11	0.69	0.11	13.79	0.04	1.8	0.02	0.02	0.09	1.03

Таблица 3. Результаты общего анализа крови самок крыс при исследовании подострой токсичности pNCure

Группа	Параметр	Гемоглобин, г/дл	Гематокрит, %	Эритроциты, 10 ¹² /л	Тромбоциты, 10 ⁹ /л	Лейкоциты, 10 ⁹ /л	Нейтрофилы, %	Базофилы, %	Эозинофилы, %	Моноциты, %	Лимфоциты, %
30 сутки											
Tox1	Животных в гр.	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	13.68	42.66	8.04	303.82	9.59	24.88	0.08	1.27	2.18	63
	Медиана	13.79	43.45	8.11	314.7	9.72	25.07	0.1	1.28	2.13	62.7
	Ст. откл.	1.31	1.79	0.2	21.51	0.27	2.43	0.03	0.09	0.19	1.14
	Ст.ош.средн.	0.59	0.8	0.09	9.62	0.12	1.09	0.01	0.04	0.08	0.51
Tox2	Животных в гр.	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	13.63	42.38	8.13	310.3	9.84	26.3	0.06	1.25	2.29	65.32
	Медиана	13.5	41.43	8.15	312	9.93	27.61	0.05	1.31	2.34	65
	Ст. откл.	0.64	1.63	0.13	13.24	0.42	3.23	0.03	0.11	0.24	3.46
	Ст.ош.средн.	0.29	0.73	0.06	5.92	0.19	1.44	0.01	0.05	0.11	1.55
Tox3	Животных в гр.	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	13.44	42.74	8.09	301.14	9.71	23.21	0.09	1.28	2.14	65.94
	Медиана	13.2	42.74	8.11	301.2	9.71	23.25	0.09	1.28	2.21	68
	Ст. откл.	1.59	1.67	0.19	11.98	0.3	1.28	0.01	0.09	0.16	4.17
	Ст.ош.средн.	0.71	0.75	0.08	5.36	0.13	0.57	0	0.04	0.07	1.86
60 сутки											
Tox1	Животных в гр.	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	13.91	43.4	7.98	311.7	9.65	25.09	0.07	1.21	2.22	64.56
	Медиана	14.23	43.67	7.95	311.4	9.49	26.41	0.08	1.16	2.18	64.3
	Ст. откл.	0.94	1.08	0.18	20.57	0.32	3.12	0.03	0.1	0.2	2.7
	Ст.ош.средн.	0.42	0.48	0.08	9.2	0.14	1.4	0.01	0.04	0.09	1.21
Tox2	Животных в гр.	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	14.34	42.11	8.06	315.72	10.23	23.18	0.09	1.2	2.2	65.18
	Медиана	14.99	41.64	8.08	315.6	10.19	23.39	0.08	1.22	2.25	65.8
	Ст. откл.	1.23	1.21	0.15	12.98	0.15	1.69	0.03	0.07	0.18	3.07
	Ст.ош.средн.	0.55	0.54	0.07	5.8	0.07	0.76	0.01	0.03	0.08	1.37
Tox3	Животных в гр.	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	13.74	42.47	7.99	302.08	10.07	25	0.08	1.29	2.02	67.54
	Медиана	13.76	42.68	7.92	300.6	10.27	25.48	0.08	1.34	1.87	67.5
	Ст. откл.	1.44	1.41	0.18	17.19	0.54	2.2	0.03	0.09	0.27	1.73
	Ст.ош.средн.	0.64	0.63	0.08	7.69	0.24	0.98	0.01	0.04	0.12	0.77

Таблица 4. Результаты биохимического анализа крови самцов крыс при изучении подострой токсичности рNCure

Группа	Параметр	Общий белок, г/дл	АсАТ, МЕ/л	АлАТ, МЕ/л	ЛД, МЕ/л	ЩФ, МЕ/л	Мочевина мг/дл	Креатинин мг/дл	Глюкоза мг/дл	Общий билирубин, мг/дл	Na, мМ	K, мМ	Ca, мМ	P, мМ
30 сутки														
Тох1	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	66.3	70.68	58.48	334.33	267.12	13.65	0.42	120.12	0.14	138.76	4.3	9.76	5.81
	Медиана	66.4	66	55.8	351.13	243	13.04	0.45	119.3	0.13	137.7	4.32	9.71	5.69
	Ст. откл.	2.55	8.44	7.37	32.57	77.27	1.32	0.06	5.6	0.01	2.91	0.17	0.26	0.48
	Ст.ош.средн.	1.14	3.77	3.29	14.57	34.56	0.59	0.03	2.51	0.01	1.3	0.08	0.12	0.21
Тох2	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	66.8	75.2	59.48	329.89	309.24	15.14	0.45	117.74	0.12	139.06	4.44	10.13	6
	Медиана	66	75.38	56.8	342.25	348.6	15.47	0.48	115.8	0.12	139.2	4.55	10.19	5.94
	Ст. откл.	2.16	6.02	9.71	36.79	74.68	1.75	0.07	6.71	0.02	2.63	0.29	0.23	0.35
	Ст.ош.средн.	0.96	2.69	4.34	16.45	33.4	0.78	0.03	3	0.01	1.17	0.13	0.1	0.16
Тох3	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	65.66	77.36	63.6	303.33	296.52	15.49	0.42	121.98	0.13	139.82	4.3	9.83	5.8
	Медиана	66.4	80.78	66.6	298.96	276	15.51	0.42	126	0.14	139.1	4.3	9.67	5.75
	Ст. откл.	3.05	10.18	8.3	16.79	42.14	1.2	0.07	6.27	0.02	1.83	0.29	0.35	0.31
	Ст.ош.средн.	1.37	4.55	3.71	7.51	18.84	0.54	0.03	2.8	0.01	0.82	0.13	0.15	0.14
60 сутки														
Тох1	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	65.9	72.3	58.28	318.72	284.04	15.79	0.38	115.1	0.12	139.86	4.64	10.04	6.09
	Медиана	64.2	72.6	59.6	317.09	339	16.82	0.38	114.4	0.12	140.9	4.74	10.16	6.22
	Ст. откл.	3.5	7.76	3.87	34.05	81.8	1.74	0.05	4.07	0.01	2.48	0.18	0.3	0.27
	Ст.ош.средн.	1.56	3.47	1.73	15.23	36.58	0.78	0.02	1.82	0.01	1.11	0.08	0.13	0.12
Тох2	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	63.7	81.38	62	295.26	271.8	14.86	0.39	120.02	0.12	140.38	4.44	10.11	5.79
	Медиана	64	82.8	62.8	297.48	271.2	14.49	0.36	120.9	0.11	141	4.41	10.08	5.82
	Ст. откл.	2.58	4.36	6.72	20.97	39.96	1.84	0.07	4.65	0.02	2.59	0.26	0.16	0.19
	Ст.ош.средн.	1.15	1.95	3	9.38	17.87	0.82	0.03	2.08	0.01	1.16	0.11	0.07	0.08
Тох3	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	65.32	82.31	65.28	316.87	270.12	14.87	0.42	118.84	0.14	139.96	4.33	10	5.89
	Медиана	63.3	83.7	64	318.94	271.2	14.64	0.41	118.8	0.14	139.4	4.38	9.78	5.87
	Ст. откл.	3.7	6.53	6.22	43.93	36.86	1.62	0.03	5.37	0.02	2.69	0.16	0.33	0.38
	Ст.ош.средн.	1.65	2.92	2.78	19.65	16.49	0.72	0.01	2.4	0.01	1.2	0.07	0.15	0.17

АсАТ – аспаратаминотрансфераза; АлАТ – аланинаминотрансфераза; ЛД – лактатдегидрогеназа; ЩФ – щелочная фосфатаза.

Таблица 5. Результаты биохимического анализа крови самок крыс при изучении подострой токсичности рNCure

Группа	Параметр	Общий белок, г/дл	АсАТ, МЕ/л	АлАТ, МЕ/л	ЛД, МЕ/л	ЩФ, МЕ/л	Мочевина мг/дл	Креатинин мг/дл	Глюкоза мг/дл	Общий билирубин, мг/дл	Na, мМ	K, мМ	Ca, мМ	P, мМ
30 сутки														
Тох1	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	64.9	79.77	62.08	320.72	317.16	14.39	0.4	122.48	0.12	139.08	4.62	10.19	5.7
	Медиана	64.6	85.28	59.4	336.7	322.2	14.05	0.42	125.8	0.11	140.3	4.58	10.25	5.64
	Ст. откл.	2.04	11.13	6.78	31.61	43.43	2	0.07	6.33	0.02	2.98	0.11	0.24	0.27
	Ст.ош.средн.	0.91	4.98	3.03	14.14	19.42	0.89	0.03	2.83	0.01	1.33	0.05	0.11	0.12
Тох2	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	66.7	78.62	52.88	346.25	285.12	13.3	0.41	122.22	0.13	141.04	4.39	9.89	5.89
	Медиана	68.4	80.93	49.6	346.32	292.2	13.08	0.42	121.8	0.13	143.3	4.46	9.85	5.89
	Ст. откл.	3.41	10.87	7.81	13.61	65.93	1.1	0.07	3.01	0.02	4.69	0.33	0.19	0.17
	Ст.ош.средн.	1.53	4.86	3.49	6.08	29.48	0.49	0.03	1.35	0.01	2.1	0.15	0.09	0.07
Тох3	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	67.04	75.38	51.72	304.21	318.48	14.87	0.41	119.96	0.12	139.6	4.28	10.07	6.17
	Медиана	67.2	77.78	50.8	301.92	328.8	14.3	0.43	122.6	0.12	141	4.28	10.02	6.25
	Ст. откл.	2.61	8.86	4.09	28.59	62.51	1.19	0.05	6.37	0.01	3.6	0.25	0.19	0.33
	Ст.ош.средн.	1.17	3.96	1.83	12.79	27.96	0.53	0.02	2.85	0	1.61	0.11	0.08	0.15
60 сутки														
Тох1	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	66.48	80.7	54.12	314.28	249	15.34	0.42	113.88	0.12	139.96	4.19	10.16	6.01
	Медиана	67	88.5	50.8	310.8	239.4	15.67	0.42	113.7	0.12	137.9	4.11	10.41	5.94
	Ст. откл.	2.5	11.6	6.15	29.06	67.9	1.34	0.06	3.3	0.01	4.38	0.19	0.42	0.35
	Ст.ош.средн.	1.12	5.19	2.75	13	30.37	0.6	0.03	1.48	0.01	1.96	0.09	0.19	0.16
Тох2	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	65.9	72.38	63.48	308.36	224.52	14.47	0.37	121.64	0.13	140.46	4.41	9.93	5.92
	Медиана	66.1	71.1	62.4	303.03	204.6	14.67	0.35	121.1	0.13	139.9	4.41	10.07	5.86
	Ст. откл.	3.78	10.86	5.21	24.46	46.07	1.87	0.06	5.9	0.01	3.02	0.15	0.34	0.45
	Ст.ош.средн.	1.69	4.86	2.33	10.94	20.6	0.84	0.03	2.64	0	1.35	0.07	0.15	0.2
Тох3	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	63.82	71.36	61.52	306.29	309.96	16.16	0.42	123.34	0.13	141.96	4.41	10.16	5.89
	Медиана	63.9	67.88	60.6	315.24	321.6	16.34	0.42	124.9	0.13	142.3	4.45	10.29	5.97
	Ст. откл.	2.49	10.69	3.65	36.39	54.62	0.52	0.02	6.53	0.02	2.27	0.22	0.28	0.36
	Ст.ош.средн.	1.11	4.78	1.63	16.28	24.43	0.23	0.01	2.92	0.01	1.02	0.1	0.13	0.16

АсАТ – аспаратаминотрансфераза; АлАТ – аланинаминотрансфераза; ЛД – лактатдегидрогеназа; ЩФ – щелочная фосфатаза

Таблица 6. Результаты ЭКГ исследования (II отведение) у самцов крыс при изучении подострой токсичности рNCure

Группа	Параметр	ЧСС, уд./мин.	RR, мс	QRS, мс	ЭОС, градусов	PR, мс	QT, мс	P, мВ	R, мВ	S, мВ	ST, мВ	T, мВ
30 сутки												
Тох1	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	400.6	313.8	59.8	-23.6	95.2	160.6	0.47	0.15	-0.5	-0.17	0.31
	Медиана	397	316	60	-22	91	164	0.47	0.16	-0.49	-0.17	0.35
	Ст. откл.	37.64	4.32	8.26	4.93	14.01	12.34	0.05	0.02	0.05	0.01	0.07
	Ст.ош.средн.	16.83	1.93	3.69	2.2	6.26	5.52	0.02	0.01	0.02	0.01	0.03
Тох2	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	379	295.8	57.4	-23.2	96.8	160.4	0.44	0.15	-0.55	-0.15	0.3
	Медиана	369	294	58	-23	95	161	0.44	0.15	-0.57	-0.15	0.31
	Ст. откл.	38.48	8.47	7.06	5.12	5.81	14.54	0.05	0.01	0.06	0.02	0.05
	Ст.ош.средн.	17.21	3.79	3.16	2.29	2.6	6.5	0.02	0	0.03	0.01	0.02
Тох3	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	392.8	311.4	53.6	-24.6	96.8	153.8	0.44	0.11	-0.46	-0.15	0.28
	Медиана	397	314	45	-23	95	151	0.44	0.15	-0.48	-0.14	0.27
	Ст. откл.	35.77	8.65	14.22	3.65	8.04	11.82	0.05	0.05	0.1	0.01	0.06
	Ст.ош.средн.	16	3.87	6.36	1.63	3.6	5.29	0.02	0.02	0.04	0.01	0.03
60 сутки												
Тох1	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	378.8	305.2	55.4	-26.4	97.4	155.4	0.44	0.14	-0.5	-0.14	0.31
	Медиана	388	307	52	-30	101	155	0.42	0.14	-0.43	-0.13	0.27
	Ст. откл.	52.07	11.26	12.4	7.3	13.96	10.14	0.06	0.01	0.13	0.04	0.08
	Ст.ош.средн.	23.29	5.03	5.55	3.26	6.24	4.53	0.02	0	0.06	0.02	0.03
Тох2	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	408.2	304.4	49.8	-24.2	106.8	155	0.41	0.15	-0.46	-0.14	0.27
	Медиана	423	305	46	-21	108	145	0.42	0.15	-0.4	-0.13	0.28
	Ст. откл.	56.8	8.38	10.76	6.83	7.66	17.03	0.02	0.01	0.11	0.02	0.05
	Ст.ош.средн.	25.4	3.75	4.81	3.06	3.43	7.62	0.01	0.01	0.05	0.01	0.02
Тох3	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	373	305.2	53.6	-21	91.8	159.6	0.45	0.16	-0.51	-0.13	0.26
	Медиана	383	308	50	-19	91	160	0.45	0.17	-0.51	-0.13	0.25
	Ст. откл.	49.11	11.39	8.05	4.53	11.69	14.57	0.04	0.02	0.08	0.03	0.04
	Ст.ош.средн.	21.96	5.09	3.6	2.02	5.23	6.52	0.02	0.01	0.03	0.01	0.02

ЧСС - частота сердечных сокращений, ЭОС - электрическая ось сердца

Таблица 7. Результаты ЭКГ исследования (II отведение) у самок крыс при изучении подострой токсичности pNCure

Группа	Параметр	ЧСС, уд./мин.	RR, мс	QRS, мс	ЭОС, градусов	PR, мс	QT, мс	P, мВ	R, мВ	S, мВ	ST, мВ	T, мВ
30 сутки												
Тох1	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	362.6	296.2	55.8	-23.8	92.8	149.8	0.47	0.16	-0.46	-0.13	0.29
	Медиана	365	295	57	-23	94	149	0.47	0.16	-0.43	-0.12	0.31
	Ст. откл.	50	10.16	4.44	7.05	4.21	5.22	0.03	0.01	0.07	0.03	0.05
	Ст.ош.средн.	22.36	4.54	1.98	3.15	1.88	2.33	0.01	0.01	0.03	0.01	0.02
Тох2	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	384.6	302.2	51.8	-24	97	164	0.48	0.16	-0.47	-0.14	0.29
	Медиана	405	307	47	-24	93	168	0.48	0.16	-0.44	-0.13	0.29
	Ст. откл.	54.22	13.85	9.47	5	11.11	11.25	0.02	0.02	0.08	0.03	0.05
	Ст.ош.средн.	24.25	6.19	4.24	2.24	4.97	5.03	0.01	0.01	0.04	0.01	0.02
Тох3	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	325.4	303.8	50	-21.4	107.2	162.4	0.49	0.15	-0.57	-0.17	0.29
	Медиана	328	305	52	-21	106	164	0.49	0.15	-0.62	-0.17	0.28
	Ст. откл.	11.41	11.21	8.51	4.34	4.76	3.91	0.03	0.01	0.12	0.03	0.07
	Ст.ош.средн.	5.1	5.01	3.81	1.94	2.13	1.75	0.01	0	0.05	0.01	0.03
60 сутки												
Тох1	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	355.6	297.6	65	-24	89.8	155.4	0.42	0.15	-0.48	-0.15	0.33
	Медиана	353	292	67	-24	86	156	0.41	0.15	-0.5	-0.15	0.35
	Ст. откл.	37.65	11.87	4.3	5.92	10.57	9.81	0.04	0.01	0.07	0.01	0.06
	Ст.ош.средн.	16.84	5.31	1.92	2.65	4.73	4.39	0.02	0	0.03	0	0.03
Тох2	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	366.6	300.6	48.8	-23.8	97.8	164.2	0.43	0.16	-0.57	-0.17	0.29
	Медиана	364	295	53	-23	102	172	0.43	0.17	-0.54	-0.17	0.26
	Ст. откл.	44.79	11.37	6.72	3.96	9.31	13.97	0.04	0.01	0.06	0.02	0.05
	Ст.ош.средн.	20.03	5.09	3.01	1.77	4.16	6.25	0.02	0.01	0.03	0.01	0.02
Тох3	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	363	302.2	57.6	-24.8	100	166.6	0.44	0.15	-0.5	-0.15	0.29
	Медиана	354	302	54	-26	98	168	0.45	0.16	-0.5	-0.15	0.27
	Ст. откл.	20.71	11.88	7.77	4.09	8.57	7.02	0.05	0.02	0.11	0.03	0.06
	Ст.ош.средн.	9.26	5.31	3.47	1.83	3.83	3.14	0.02	0.01	0.05	0.01	0.03

ЧСС - частота сердечных сокращений, ЭОС - электрическая ось сердца

Таблица 8. Результаты поведенческого теста в открытом поле у самцов крыс при изучении подострой токсичности рNCure

Группа	Параметр	Исслед. нор	Стойки	Время груминга, с	Дефекации	Путь, квадрато в	Время активности , с	Актов движ.	Выходов в центр	Задержка до выхода в центр, с	Время активн. в центре, с	Путь в центре, квадратов	Актов движ. в центре
30 сутки													
Тох1	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	8.4	9.4	47.72	1.8	46	84.54	47.6	4.8	100.07	2.57	2.4	1.2
	Медиана	10	9	51.3	2	36	75.92	51	5	118.48	3.52	3	1
	Ст. откл.	2.7	5.55	7.95	1.3	19.8	33.06	15.18	1.64	46.53	2.14	1.52	0.84
	Ст.ош.средн.	1.21	2.48	3.55	0.58	8.85	14.78	6.79	0.73	20.81	0.96	0.68	0.37
Тох2	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	9.4	10.6	30.64	0.8	55.6	72.8	53.2	2.8	70.77	2.04	1.6	2.2
	Медиана	9	11	25	1	63	61.8	53	2	71.13	2.17	1	3
	Ст. откл.	0.89	4.28	13.7	0.84	19.26	31.79	19.89	2.59	47.24	1.33	1.34	1.1
	Ст.ош.средн.	0.4	1.91	6.13	0.37	8.61	14.22	8.9	1.16	21.12	0.59	0.6	0.49
Тох3	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	6.4	7.6	38.46	1.2	39.8	100.42	43.4	4.8	75.18	3.48	1.6	2
	Медиана	6	7	39.2	1	41	105.72	44	5	87.75	3.96	1	2
	Ст. откл.	1.67	2.97	9.66	1.3	10.23	25.11	13.43	1.48	37.7	1.14	0.89	1.22
	Ст.ош.средн.	0.75	1.33	4.32	0.58	4.58	11.23	6	0.66	16.86	0.51	0.4	0.55
60 сутки													
Тох1	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	6.8	10.8	43.78	1.6	57.2	95.89	50.4	1.8	78.86	1.85	3	1.6
	Медиана	7	11	43	2	61	110.8	51	2	74.2	1.73	4	1
	Ст. откл.	1.92	3.56	8.79	1.52	14.38	22.45	16.58	1.79	40.93	0.81	1.41	1.34
	Ст.ош.средн.	0.86	1.59	3.93	0.68	6.43	10.04	7.41	0.8	18.31	0.36	0.63	0.6
Тох2	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	6.8	8.2	38.06	1.4	46.4	97.19	53	3.4	81.37	1.56	1.2	1.2
	Медиана	7	8	41.6	1	48	105.84	58	4	81.1	1.3	0	0
	Ст. откл.	2.68	4.6	13.03	1.14	14.12	36.32	13.06	2.19	32.73	1.71	1.79	1.64
	Ст.ош.средн.	1.2	2.06	5.83	0.51	6.31	16.24	5.84	0.98	14.64	0.77	0.8	0.73
Тох3	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	6.6	8	42.56	1.6	51.8	67.27	48.6	3.2	73.81	2.25	2	2.2
	Медиана	6	5	43.9	1	51	57.11	45	3	80.1	2.05	2	2
	Ст. откл.	2.7	5.15	11.38	1.34	19.84	29.83	8.68	2.28	45.04	1.85	1.41	0.84
	Ст.ош.средн.	1.21	2.3	5.09	0.6	8.87	13.34	3.88	1.02	20.14	0.83	0.63	0.37

Таблица 9. Результаты поведенческого теста в открытом поле у самок крыс при изучении подострой токсичности рNCure

Группа	Параметр	Исслед. нор	Стойки	Время груминга, с	Дефекации	Путь, квадратов	Время активности, с	Актов движ.	Выходов в центр	Задержка до выхода в центр, с	Время активн. в центре, с	Путь в центре, квадратов	Актов движ. в центре
30 сутки													
Тох1	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	8.8	11	38.8	1.6	48.2	103.93	56.2	3.8	85.43	2.48	3.6	1.4
	Медиана	10	10	41.8	2	47	108.83	53	5	69.82	3.13	4	2
	Ст. откл.	2.77	2.92	10.48	1.14	13.75	30.75	15.35	2.77	41.02	1.52	0.89	1.34
	Ст.ош.средн.	1.24	1.3	4.69	0.51	6.15	13.75	6.87	1.24	18.35	0.68	0.4	0.6
Тох2	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	6.4	9.2	34.58	2	40.2	112.6	43.6	3.2	87.12	2.89	0.6	1.2
	Медиана	6	11	36.7	2	48	119.89	41	4	93.31	2.85	0	2
	Ст. откл.	1.67	4.55	9.03	0.71	23.85	17.91	14.42	2.77	36.89	1.42	0.89	1.1
	Ст.ош.средн.	0.75	2.03	4.04	0.32	10.66	8.01	6.45	1.24	16.5	0.63	0.4	0.49
Тох3	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	8.2	12	38.72	2.4	45.4	94.12	44.8	2	63.4	2.94	1.8	2.2
	Медиана	9	13	33.5	2	33	112.81	38	2	41.88	3.56	1	2
	Ст. откл.	2.59	3.39	15.98	0.55	26.43	35.38	13.59	1.22	44.74	1.38	1.64	0.84
	Ст.ош.средн.	1.16	1.52	7.15	0.24	11.82	15.82	6.08	0.55	20.01	0.62	0.73	0.37
60 сутки													
Тох1	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	8.4	7.2	36.52	1.2	49.4	69.59	46.2	4.8	77.72	2.37	1.6	2.2
	Медиана	9	7	36.8	1	57	63.75	50	5	59.97	2.46	1	3
	Ст. откл.	2.61	4.02	16.46	0.84	20.71	24.2	15.06	2.28	39.71	0.76	1.34	1.1
	Ст.ош.средн.	1.17	1.8	7.36	0.37	9.26	10.82	6.73	1.02	17.76	0.34	0.6	0.49
Тох2	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	7.4	8	37.68	1	56.4	79.83	61.8	3	75.2	3.65	3	1.4
	Медиана	7	8	37.1	1	63	66.35	73	2	77.88	3.68	4	1
	Ст. откл.	1.82	2.92	15.18	0.71	16.82	32.53	17.91	2.35	37.14	0.59	1.41	1.14
	Ст.ош.средн.	0.81	1.3	6.79	0.32	7.52	14.55	8.01	1.05	16.61	0.26	0.63	0.51
Тох3	Животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Среднее	7.6	11.6	44.5	1.2	48.4	79.09	62.2	3.2	58.48	1.66	1.8	1.6
	Медиана	8	15	45.6	1	45	60.46	64	1	48.93	1.01	1	2
	Ст. откл.	2.7	5.86	11.47	1.3	19.01	39.85	6.94	3.03	38.76	1.18	1.64	1.14
	Ст.ош.средн.	1.21	2.62	5.13	0.58	8.5	17.82	3.1	1.36	17.33	0.53	0.73	0.51