

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт морфологии человека»
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»

На правах рукописи

Салихова Диана Ирековна

Нейропротективные свойства нейрональных и глиальных клеток-предшественников, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека

Специальность 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научные руководители:

д.б.н., профессор Д.В. Гольдштейн

д.м.н., доцент Т.Х. Фатхудинов

Москва 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. Технологии получения и применения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.....	14
1.1.1. Интеграционные и неинтеграционные методы генетического репрограммирования.....	15
1.1.2. Применение производных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в терапевтических целях	17
1.2. Дифференцировка ИПСК в нейрональном и глиальном направлениях.....	21
1.2.1. Нейральная индукция	22
1.2.2. Специализация нейральных стволовых клеток в нейрональные и глиальные клетки	23
1.3. Патогенез ишемического инсульта	27
1.3.1. Ишемический каскад	27
1.3.2. Основные механизмы клеточной гибели при ишемическом инсульте	28
1.3.3. Роль окислительного стресса при ишемическом инсульте	31
1.3.4. Постишемическое воспаление	32
1.3.5. Повышенная экспрессия матричных металлопротеиназ	35
1.3.6. Современные подходы к терапии ишемического инсульта	35
1.4. Модели оценки нейротрофического и нейропротективного действия биологически активных веществ <i>in vitro</i>	37
1.5. Экспериментальные животные модели ишемического инсульта.....	40
1.5.1. Методы оценки степени тяжести ишемического инсульта	43
1.6. Заключение к обзору литературы.....	45
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	47
2.1. Составы сред для культивирования клеток.....	47
2.2. Протоколы экспериментов	48
2.2.1. Информация о донорах биологического материала	48
2.2.2. Получение первичных культур фибробластов кожи человека	48
2.2.3. Получение ИПСК с помощью генетических конструкций.....	49
2.2.4. Культивирование ИПСК человека	50

2.2.5. Приготовление препаратов метафазных хромосом ИПСК человека	50
2.2.6. Формирование и спонтанная дифференцировка эбриоидных телец	51
2.2.7. Дифференцировка ИПСК в нейрональном и глиальном направлениях ...	51
2.2.8. Иммуноцитохимический анализ.....	52
2.2.9. Проточная цитометрия	52
2.2.10. ПЦР в режиме реального времени	53
2.2.11. Получение кондиционированных сред на основе нейрональных и глиальных клеток-предшественников.....	57
2.2.12. Иммуноферментный анализ.....	57
2.2.13. Выделение мозжечковых нейронов	57
2.2.14. Культивирование и дифференцировка линии SH-SY5Y	58
2.2.15. Моделирование глутаматной эксайтотоксичности	58
2.2.16. Моделирование гипоксии.....	59
2.2.17. Оценка гибели клеток	59
2.2.18. Оценка роста нейритов	60
2.2.19. Процедура протеомного анализа.....	61
2.2.19.1. Измерение концентрации белка.....	61
2.2.19.2. Электрофорез белков в полиакриламидном геле.....	61
2.2.19.3. Гидролиз трипсином в геле.....	62
2.2.19.4 Масс-спектрометрический анализ.....	62
2.2.20. Лабораторные животные	64
2.2.21. Моделирование экспериментального инфаркта мозга.....	65
2.2.22. Внутриаартериальное введение кондиционированных сред	66
2.2.23. Магнитно-резонансная томография	67
2.2.24. Оценка терапевтической эффективности	67
2.2.25. Гистологическое исследование.....	69
2.2.26. Иммуногистохимическое исследование	70
2.2.27. Оценка ангиогенеза.....	70
2.2.28. Статистический анализ.....	71
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	72

3.1.Получение и характеристика нейрональных и глиальных клеток-предшественников путем направленной дифференцировки ИПСК.....	72
3.1.1.Отбор и характеристика полученных линий ИПСК.....	72
3.1.2. Количественный анализ нейральных стволовых клеток в культуре и их характеристика	78
3.1.3. Анализ морфологии нейрональных и глиальных клеток-предшественников.....	80
3.2. Сравнительный анализ секретомов нейрональных и глиальных клеток-предшественников.....	85
3.2.1. Сравнительный протеомный анализ состава секретомов нейрональных и глиальных клеток-предшественников.....	86
3.2.2. Сравнительный иммуноферментный анализ состава секретомов нейрональных и глиальных клеток-предшественников.....	99
3.3. Сравнительный анализ экспрессии генов регуляторных белков нейрональными и глиальными клетками-предшественниками	101
3.4. Сравнительный анализ нейропротективного и прорегенеративного действия нейрональных и глиальных клеток-предшественников в моделях <i>in vitro</i>	104
3.4.1. Сравнительный анализ нейропротективного и прорегенеративного действия нейрональных и глиальных клеток-предшественников на модели гипоксии	104
3.4.1.1. Оценка жизнеспособности клеток в культуре SH-SY5Y	104
3.4.1.2. Количественная оценка некротических и апоптотических клеток.....	106
3.4.1.3. Оценка роста нейритов	108
3.4.2. Сравнительный анализ нейропротективного и прорегенеративного действия нейрональных и глиальных клеток-предшественников на модели глутаматной эксайтотоксичности.....	111
3.4.2.1. Оценка жизнеспособности клеток культуры мозжечковых нейронов.....	111
3.4.2.2.Оценка количества некротических и апоптотических клеток	113
3.4.2.3. Оценка роста нейритов	114

3.5. Анализ нейропротективного действия кондиционированных сред глиальных и нейрональных клеток-предшественников на модели экспериментального инфаркта мозга у крыс.....	119
3.5.1. Терапевтические эффекты внутриартериального введения кондиционированных сред глиальных и нейрональных клеток-предшественников.....	119
3.5.1.1. Оценка выживаемости животных.....	119
3.5.1.2. Оценка неврологического дефицита	119
3.5.1.3. Оценка изменения объема очага инфаркта	120
3.5.1.4. Оценка безопасности кондиционированных сред	121
3.5.2 Гистологическое и молекулярно-генетическое исследование головного мозга крыс при инфузии кондиционированных сред глиальных и нейрональных клеток-предшественников в условиях острой фокальной ишемии	122
3.5.2.1. Оценка изменения профиля экспрессии генов в тканях в области повреждения мозга	122
3.5.2.2. Гистологическое исследование	124
4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	130
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	141
ВЫВОДЫ	142
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	144
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	146
ПРИЛОЖЕНИЕ	166

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Острые нарушения мозгового кровообращения характеризуются клинически быстро возникающими очаговыми и генерализованными нарушениями функций головного мозга сосудистого генеза. Летальность в остром периоде заболевания достигает 35%, около 60% больных после ишемического инсульта становятся тяжелыми инвалидами, нуждающимися в постоянной посторонней помощи, 30% имеют стойкие резидуальные изменения и лишь 10% возвращаются к трудовой деятельности и полноценной жизни. При этом необходимо констатировать, что эффективность существующих методов лечения и реабилитации таких больных остается невысокой (Ceornodolea A.D. et al., 2017). Поэтому поиск новых способов терапии больных с сосудистыми заболеваниями головного мозга является весьма актуальной медико-социальной проблемой.

Основное внимание в терапии острых нарушений мозгового кровообращения уделяют методам тромболизиса и тромбоэкстракции. Своевременное их применение позволяет уменьшить размеры очага инсульта, однако такое лечение эффективно только в острую фазу заболевания, а для восстановления утраченных функций головного мозга не показано (Kim J.T. et al., 2017).

К перспективным направлениям регенеративной медицины, в том числе и сосудистых заболеваний головного мозга, относят бесклеточную терапию (cell free therapy), целью которой является стимуляция эндогенных процессов репарации посредством введения кондиционированных сред, полученных при культивировании стволовых и прогениторных клеток (Baglio S.R. et al., 2012; Rani S. et al., 2015). Данный подход имеет ряд преимуществ по сравнению с введением самих клеток: отсутствие осложнений, связанных с эмболией и иммунным отторжением (Pawitan J.A. et al., 2014). Терапия на основе кондиционированных сред (КС) представляет альтернативу молекулам с одной мишенью, обеспечивая многогранный подход к лечению сосудистых заболеваний головного мозга. Существуют исследования, в которых на различных моделях повреждения

головного мозга и нейродегенеративных заболеваний было показано цитопротективное, нейротрофическое и противовоспалительное действие КС (Mita T. et al., 2015; Yang H.N. et al., 2018; Watanabe T. et al., 2016; Baker E.W et al., 2019; Jiang Y. et al., 2019). Однако в литературе полностью отсутствует информация о влиянии секретируемых веществ нейрональными и глиальными клетками-предшественниками, полученными из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), на регенерацию аксонов и дендритов, выживаемость нейронов и восстановление функций головного мозга после моделирования ишемического инсульта.

Таким образом, изучение состава секретомов (кондиционированных сред) нейрональных и глиальных клеток-предшественников, полученных из ИПСК, и сопоставление биологических эффектов на моделях химической гипоксии, глутаматной эксайтотоксичности *in vitro* и ишемического инсульта *in vivo* позволит определить тип культуры с оптимальным нейропротективным, противовоспалительным и прорегенеративным потенциалом для разработки новых подходов к терапии сосудистых заболеваний головного мозга.

Целью исследования является сравнительная оценка нейропротективных свойств секретомов (кондиционированных сред) нейрональных и глиальных клеток-предшественников, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, на моделях глутаматной эксайтотоксичности и гипоксии *in vitro*, транзиторной окклюзии средней мозговой артерии *in vivo*.

В работе были поставлены следующие **задачи исследования**:

1. С помощью вирусных векторов, несущих гены репрограммирования Oct4, Sox2, Klf4, L-Мyc (C-Мyc), получить линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека и дифференцировать их в нейрональные и глиальные клетки-предшественники. Охарактеризовать молекулярно-генетические, морфологические и функциональные особенности полученных культур.
2. Провести протеомный и иммуноферментный анализы секретомов (кондиционированных культуральных сред) нейрональных и глиальных клеток-предшественников.

3. Определить относительную экспрессию генов регуляторных белков, нейротрофинов, факторов роста, цитокинов и белков теплового шока в нейрональных и глиальных клетках-предшественниках.
4. Изучить нейропротективное и нейротрофическое действия кондиционированных сред, полученных при культивировании нейрональных и глиальных клеток-предшественников, на моделях химической гипоксии и глутаматной эксайтотоксичности *in vitro*.
5. Оценить прорегенеративные свойства кондиционированных сред, полученных при культивировании нейрональных и глиальных клеток-предшественников, при транзиторной окклюзии средней мозговой артерии у крыс.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует пункту 2, 5 и 6 области исследования паспорта специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Научная новизна исследования

Дана сравнительная оценка эффективности нейрональных и глиальных клеток-предшественников, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, в паракринной регуляции репаративных процессов нервной ткани.

Впервые с помощью протеомного анализа установлено, что глиальные клетки-предшественники секретируют 304 белка, а нейрональные клетки-предшественники - 243. Сравнительный анализ кондиционированных сред двух культур показал, что 31% глиального секретома и 45% нейронального секретома составляют уникальные белки. Различия заключаются в секреции нейрональными и глиальными клетками-предшественниками ряда факторов, способствующих цитопротекции, ангиогенезу, росту нейритов и обладающих иммуномодулирующими свойствами. При этом наибольшую концентрацию нейротрофического фактора мозга (BDNF), глиального нейротрофического фактора (GDNF), фактора роста нервов (NGF) и цилиарного нейротрофического фактора (CNTF), определяемую иммуноферментным анализом, содержит

глиальный секретом. Различия между двумя культурами были подтверждены посредством экспрессии генов соответствующих секретируемым белкам.

Впервые продемонстрированы эффекты от сокультивирования нейрональных и глиальных клеток-предшественников и добавления кондиционированных ими сред на клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y в модели гипоксии и первичной культуре мозжечковых нейронов в модели глутаматной эксайтотоксичности. Кондиционированная среда, содержащая продукты секреции глиальных клеток-предшественников, эффективнее увеличивала жизнеспособность и способствовала росту нейритов нейробластомы в условиях гипоксии. Ее добавление культуре мозжечковых нейронов приводило к повышению жизнеспособности и более быстрой регенерации последних после глутаматной эксайтотоксичности. Кондиционированная среда нейрональных клеток-предшественников в данной модели не оказывала положительного действия. Такие же эффекты наблюдали при сокультивировании данных типов культур с клеточной линией SH-SY5Y и первичной культурой мозжечковых нейронов.

Впервые было показано, что системное введение кондиционированной среды глиальных клеток-предшественников (КС-ГКП) улучшало функциональное восстановление головного мозга у животных после экспериментального инсульта, уменьшая степень неврологического дефицита. Терапевтическое действие заключалось в снижении уровня мРНК генов позитивного регулятора апоптоза *Bax* и провоспалительного цитокина *Tnfa* и увеличении экспрессии генов противовоспалительных цитокинов *Il4*, *Il10* и *Il13*. При этом она обладала выраженным противовоспалительным действием, уменьшая количество CD68⁺-клеток (маркер фагоцитирующих клеток), и способствовала ангиогенезу, повышая экспрессию гена *Vegfa* и увеличивая количество новообразованных сосудов в ишемизированной зоне головного мозга. Кондиционированная среда нейрональных клеток-предшественников (КС-НКП) в данном эксперименте стимулировала лишь увеличение объемной плотности сосудов и повышение

экспрессии гена *Vegfa* и не обладала противовоспалительным действием и способностью к уменьшению неврологического дефицита.

Впервые проведено сопоставление паракринного механизма действия двух клеточных культур нейрональных и глиальных клеток-предшественников на моделях химической гипоксии и глутаматной эксайтотоксичности *in vitro* и модели ишемического инсульта *in vivo*. Показано, что факторы, секретируемые глиальными клетками-предшественниками, в большей степени, чем нейрональными клетками-предшественниками, обладают нейропротективными, противовоспалительными и прорегенеративными свойствами.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость исследования заключается в определении роли нейрональных (НКП) и глиальных клеток-предшественников (ГКП) в паракринной регуляции репаративных процессов нервной ткани. Выявлены ключевые факторы, секретируемые НКП и ГКП и стимулирующие регенерацию нервной ткани.

Обоснован новый подход бесклеточной терапии (cell free therapy) сосудистых заболеваний головного мозга, базирующийся на использовании секретома ГКП, который продемонстрировал безопасность и эффективность в моделях *in vitro* и *in vivo*. Результаты работы являются экспериментальным обоснованием использования культур ГКП, полученных из ИПСК человека, для выделения видоспецифических белков и полипептидов и создания на их основе персонализированных ноотропных лекарственных препаратов. При этом технология получения дифференцированных производных из ИПСК позволяет исключить применение фетального материала, а также проблемы, связанные с экспансией клеточных культур. В перспективе КС-ГКП может представлять собой основу для поиска новых лекарственных средств стимуляции регенерации различных тканей и органов.

Методология и методы исследования

Методология исследования заключалась в сравнительной оценке воздействия секретируемых факторов НКП и ГКП на репаративные процессы нервной ткани.

В рамках данной работы были получены линии ИПСК из фибробластов кожи здоровых доноров с применением интеграционного и неинтеграционного методов вирусной доставки генов транскрипционных факторов Oct4, Sox2, Klf4 и L-Мус (С-Мус). На основе анализа данных научной литературы были подобраны условия дифференцировки ИПСК в нейрональном и глиальном направлениях. Для изучения нейропротективных, нейротрофических и прорегенеративных свойств секретомов НКП и ГКП были использованы модели химической гипоксии и глутаматной эксайтотоксичности *in vitro* и ишемического инсульта *in vivo*, а также комплекс морфологических (фазово-контрастная и флуоресцентная микроскопии, компьютерная морфометрия гистологических препаратов, иммуногистохимический и иммуноцитохимический анализы), биохимических (иммуноферментный анализ, МТТ и ЛДГ-тесты), молекулярно-биологических (ПЦР в режиме реального времени) методов, протеомных исследований, поведенческих тестов и статистического анализа данных.

Положения, выносимые на защиту

1. Линии ИПСК, полученные интеграционным и неинтеграционным методами, дифференцируются в нейральном направлении с различной эффективностью генерации PAX6⁺-клеток (маркер нейральных стволовых клеток) в культуре.
2. Уникальные белки составляют 31% глиального секретома и 45% нейронального секретома. Культуры нейрональных и глиальных клеток-предшественников секретируют нейротрофический фактор мозга (BDNF), фактор роста нервов (NGF), глиальный (GDNF) и цилиарный нейротрофические факторы (CNTF), при этом наибольшую концентрацию перечисленных нейротрофинов содержит глиальная кондиционированная среда.
3. Секретом ГКП обеспечивает выраженный нейропротективный и нейротрофический эффекты, повышая выживаемость и стимулируя регенерацию нейритов клеток нейробластомы линии SH-SY5Y при гипоксии и мозжечковых нейронов в условиях глутаматной эксайтотоксичности.
4. Секретом ГКП при острой фокальной ишемии головного мозга крыс оказывает выраженный терапевтический и прорегенеративный эффекты, уменьшая степень

неврологического дефицита, способствуя ангиогенезу и снижению количества фагоцитирующих клеток в ишемизированной области головного мозга.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов диссертационной работы обоснована достаточным количеством наблюдений и экспериментальных групп. Результаты проведенных исследований были получены с использованием современных молекулярно-генетических, гистологических, иммуноцитохимических и биохимических методов, которые соответствуют поставленным в работе целям и задачам, и корректной статистической обработкой данных. Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, обоснованы полученными результатами исследования и наглядно представлены в таблицах и рисунках. Результаты проведенных исследований были доложены на научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2018), конференциях «ПОСТГЕНОМ 2018» (Казань, 2018) и «Translational Research in Cell Therapy» (Москва, 2018), IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2019), IV Российском национальном конгрессе «Трансплантация и донорство органов» (Москва, 2019), 3-м Сеченовском международном биомедицинском саммите (Москва, 2019), конгрессе «Federation of the European Biochemical Societies (FEBS)» (Краков, 2019), 24-ой Международной школе-конференции молодых ученых «Биология наука XXI века» (Пущино, 2020).

Личное участие автора заключалось в планировании и проведении экспериментов, выборе методов исследования, подборе адекватных моделей, заборе материала для исследования, анализе экспериментальных данных и их статистической обработке, обобщении результатов исследования и подготовке публикаций.

Публикации. Автором опубликовано 14 научных работ, из них 5 статей в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки, и международную реферативную базу данных Scopus. Получено 2 патента на изобретения.

Внедрение результатов работы

Результаты диссертационной работы внедрены в лекционные курсы для аспирантов и ординаторов в ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова».

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 170 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка используемых сокращений и списка литературы, включающего 410 источников. Работа содержит 6 таблиц и 40 рисунков.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Технологии получения и применения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

В настоящее время ИПСК рассматривают как наиболее перспективный инструмент для регенеративной медицины, позволяющий получать клеточные популяции любого фенотипа на разных этапах дифференцировки. При этом проблемы дефицита донорского материала и этические вопросы, возникающие при применении культур эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), полностью отсутствуют.

В 2012 году К. Такахаши и Ш. Яманака была присуждена Нобелевская Премия по физиологии и медицине за открытие возможности «перепрограммирования» зрелых клеток в плюрипотентное состояние. Японские исследователи проводили отбор 24 генов, экспрессия которых коррелировала с плюрипотентным состоянием ЭСК мыши. В поисках минимально необходимого набора для репрограммирования фибробласты мыши были трансфицированы различными комбинациями выбранных генов. В итоге стало известно, что ретровирусная доставка в сочетании четырех транскрипционных факторов Oct4, Sox2, Klf4, С-Мус в соматические клетки возвращало их к плюрипотентному состоянию. Данный процесс получил название прямого генетического репрограммирования. Клетки, полученные таким образом, назвали индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (Takahashi K., Yamanaka S., 2006). После появились сообщения об успешном репрограммировании фибробластов человека с использованием того же набора транскрипционных факторов (Takahashi K. et al., 2007), а также различных типов клеток человека: кератиноцитов (Aasen T. et al., 2008), нейрональных клеток (Eminli S. et al., 2008), клеток печени и желудка (Aoi T. et al., 2008), терминально дифференцированных лимфоцитов, а также эндотелия (Lagarkova M.A. et al., 2010). В дальнейшем была показана возможность получения ИПСК из соматических клеток различных млекопитающих: свиней (Kwon D.J. et al., 2013),

крыс (Li W. et al., 2009), макак-резусов (Liu H. et al., 2008). Эти исследования доказывают универсальность процесса репрограммирования.

Независимо от способа получения ИПСК должны обладать всеми свойствами ЭСК, а именно: высокой активностью щелочной фосфатазы, экспрессией протеогликанов Tra-1-60 и Tra-1-81, гликолипида SSEA4 и внутриклеточных маркеров Oct4, Nanog, Sox2, иметь нормальный кариотип, а также способность к дифференцировке во всех направлениях. ИПСК должны также формировать эмбрионидные тельца в отсутствие фидерного слоя, которые в дальнейшем могут дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков. *In vivo* такие тельца способны образовывать тератомы при введении иммунодефицитным мышам или крысам (Wesselschmidt et al., 2011).

1.1.1. Интеграционные и неинтеграционные методы генетического репрограммирования

Для доставки ключевых генов репрограммирования в клетки взрослого организма используют как стабильную, так и транзientную трансфекцию (векторы на основе вирусов, невирусные способы). Первыми для репрограммирования были выбраны векторы на основе ретровирусов и лентивирусов (Augustyniak J. et al., 2014; Takahashi K. et al., 2007). Данные способы позволяют добиться встраивания векторов в геном клетки случайным образом и вызвать стабильную экспрессию генов репрограммирования. Однако процесс репрограммирования является сложным механизмом, в результате которого должна происходить сначала активация трансгенов, а затем их замолкание и включение собственных генов клетки-хозяина, что крайне сложно контролировать. Именно поэтому встает вопрос об использовании индуцибельных векторов, которые позволяют «выключить» трансгены в нужный момент. Имеются данные об успешном применении лентивирусных векторов с Dox-индуцибельной системой доставки, либо с трансгенами, фланкированными LoxP-сайтами (Kaji K. et al., 2009; Maherali N. et al., 2008). Однако это не позволяет решить проблему случайного встраивания векторов в геном, что может повлечь за

собой риск развития злокачественных опухолей. Именно поэтому наиболее популярными для доставки генов репрограммирования в настоящее время являются неинтегрирующиеся векторы (аденовирусные, парамиксовирусные, плазмиды). Продемонстрированы методы с использованием piggyBac транспозона (Woltjen K. et al., 2009), синтетической РНК, аденовирусных векторов (Zhou W., Freed C.R., 2009), вируса Сендай (Fusaki N. et al., 2009), эписомных векторов (Yu J. et al., 2011), белков (Kim D. et al., 2009). Наибольший интерес представляет собой способ получения ИПСК путем использования векторов на основе вируса Сендай (Fusaki N. et al., 2009), который относится к семейству РНК-содержащих парамиксовирусов (содержит одноцепочечную РНК). Данный вирус активен только в цитоплазме, т.к. не проходит стадию репликации через ДНК и, соответственно, не интегрируется в геном клетки. Это обеспечивает полную безопасность его применения как в лабораторной, так и в клинической практике. На сегодняшний день технология получения ИПСК является трудозатратным и низкоэффективным процессом, так как выход репрограммированных клеток составляет 1-2%. Для повышения эффективности репрограммирования могут быть использованы малые молекулы, которые, как известно, влияют на эпигенетический статус клетки и деконденсацию хроматина. Так, например, добавление молекулы SB432542, которая является ингибитором TGF-бета сигнальных путей, позволяет увеличить эффективность репрограммирования в несколько раз (Zhou H. et al., 2009). Добавление малых молекул VixG9a и Bayak8644, заменяющие транскрипционные факторы Sox2 и С-Мус, существенно повышает выход репрограммированных клеток (Shi Y. et al., 2008). В связи с этим представляется возможным, что в ближайшие годы будет разработан протокол получения ИПСК из клеток взрослого человека путем использования всего лишь малых молекул.

1.1.2. Применение производных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в терапевтических целях

ИПСК представляют собой уникальный объект, на основе которого можно создавать банки клеток и по мере необходимости использовать для научных исследований, персонализированной клеточной терапии и в тест-системах для отбора потенциальных лекарственных соединений. В настоящее время работы по созданию криохранилищ для таких клеток ведутся многими научными группами (Рисунок 1).

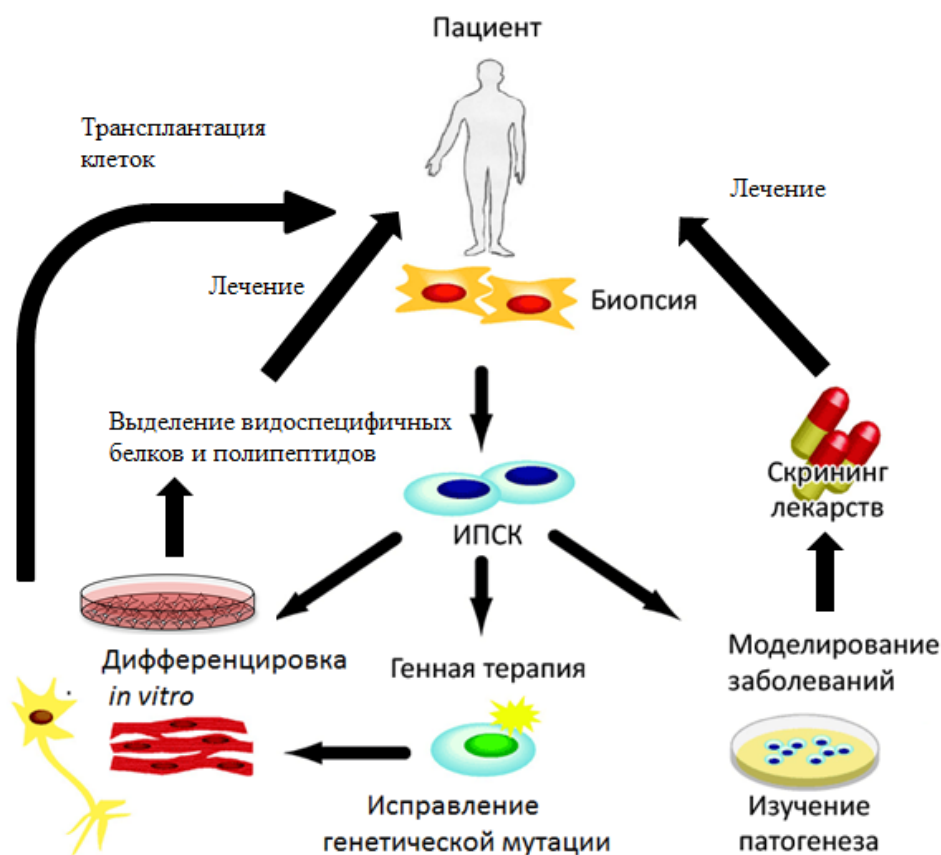


Рисунок 1. Перспективы применения ИПСК для биомедицины (Abeliovich A., 2009).

Создание эффективных и безопасных лекарственных препаратов для терапии заболеваний является актуальной проблемой современной фармакологии. Для высокопроизводительного скрининга потенциальных лекарственных соединений необходимы адекватные модельные системы, которые могут воспроизводить все

процессы, происходящие в организме при развитии того или иного заболевания. Технология репрограммирования позволяет получать ИПСК из индивидуальных соматических клеток больных для создания персонализированных модельных клеточных линий (Edwards A. et al., 2018; Grskovic M. et al., 2011; Gunaseeli I. et al., 2010; Scott C. et al., 2013; Singh V. et al., 2015). Данная технология позволит не только сократить эксперименты по тестированию перспективных для фармакологии соединений, но и более детально изучить патогенез заболевания. За последние несколько лет появилось значительное количество сообщений о получении линий ИПСК от пациентов с различными заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз и болезнь Паркинсона, которые с трудом моделировались на лабораторных животных (Ehrhardt T. et al., 2019; Jung M. et al., 2019; Rodríguez-Traver E. et al., 2019; Sun X. et al., 2019). Также были получены ИПСК от пациентов с серповидноклеточной анемией и лейкозом путем репрограммирования стволовых клеток крови (Bhargava N. et al., 2019; Haro-Mora J. et al., 2020; Neff Newitt V. et al., 2018). С. Хирата и его коллеги сообщили о получении ИПСК от пациентов с врожденной мегакариоцитарной тромбоцитопенией. Данное заболевание опосредовано мутацией в гене *MPL* (рецептор тромбопоэтина) и приводит к снижению количества тромбоцитов и мегакариоцитов в организме. Мыши с нокаутом гена *MPL* не повторяют патогенез данного заболевания человека (Hirata S. et al., 2013).

Терапевтические эффекты клеточной терапии с применением дифференцированных производных ИПСК были продемонстрированы с использованием экспериментальных моделей нейродегенеративных заболеваний, ишемического инсульта, бокового амиотрофического склероза, серповидноклеточной анемии, инфаркта миокарда, рассеяного склероза, поражения сетчатки и др. (Ababneh N. et al., 2019; Akiba R. et al., 2020; Amin N. et al., 2019; Ben-Hur T. et al., 2011; Guan X. et al., 2020; Ishida M. et al., 2019; Mangin G. et al., 2019; Palma-Tortosa S. et al., 2020; Ruscio Di A. et al., 2015; Takagi S. et al., 2019). Э.М. Хартфилд с коллегами показали, что ИПСК могут быть последовательно дифференцированы сначала в нейральные стволовые клетки, а

затем в дофаминергические нейроны *in vitro* (Hartfield E.M. et al., 2014). Кроме того, при трансплантации дофаминергических нейронов в мозг крысы с болезнью Паркинсона было обнаружено, что клетки выживают и в конечном итоге облегчают состояние животных (Kikuchi T. et al., 2011; Stoddard-Bennett T. et al., 2019). Ю. Шiba в своих работах на модели инфаркта миокарда у приматов показал, что аллогенная трансплантация кардиомиоцитов, полученных из ИПСК, приводила к интеграции клеток в сердечную мышцу и улучшению сократительной способности сердца (Shiba Y. et al., 2016). В другой серии экспериментов на модели серповидноклеточной анемии был показан положительный результат трансплантации гемопоэтических производных ИПСК с отредактированным геномом. В полученных линиях ИПСК была произведена замена гена серповидного гемоглобина на аллель дикого типа с использованием стандартных методов генного таргетирования. Эти скорректированные линии ИПСК были впоследствии дифференцированы в гемопоэтические клетки-предшественники и пересажены мышам-донорам с серповидноклеточной анемией, что приводило к восстановлению синтеза функционального белка гемоглобина и улучшению состояния животных (Hanna J. et al., 2007). Эти исследования являются доказательством эффективности использования клеточной терапии с применением производных ИПСК для лечения различных заболеваний и генетических нарушений.

ИПСК способны к бесконечному самообновлению и дифференцировке во все типы клеток. На сегодняшний день известны протоколы дифференцировок ИПСК в нейроны, инсулин-продуцирующие панкреатические клетки, кардиомиоциты, клетки эндотелия и пигментного эпителия сетчатки (Brandl C. et al., 2019; D'antonio-Chronowska A. et al., 2019; Garcia A. et al., 2019; Pellegrini S. et al., 2020; Pre D. et al., 2014; Shi Y. et al., 2012; Yoder M. et al., 2015; Zhang D. et al., 2009). Данные клетки можно получать в неограниченном количестве и использовать для выделения видоспецифических белков, полипептидов, а также экзосом, которые можно применять при комплексном лечении тех или иных заболеваний (Kumar P. et al., 2019; Shiue S. et al., 2019). Недавно начатые исследования по изучению

нейродегенеративных заболеваний, таких как боковой амиотрофический склероз, болезнь Паркинсона и Хантингтона, направлены на выяснение нейропротективных свойств нейротрофических факторов, продуцируемых стволовыми клетками. Имеются данные, свидетельствующие о том, что НСК секретируют GDNF, BDNF, которые могут защищать дисфункциональные моторные нейроны животных с боковым амиотрофическим склерозом, тем самым продлевая их продолжительность жизни (Abati E. et al., 2019; Baloh R. et al., 2018). Кроме того, было показано, что НСК секретируют NGF и нейротрофин-3 (NT-3), которые поддерживают функциональную активность нейронов и стимулируют рост синапсов. Установлено, что в повышении жизнеспособности дофаминергических нейронов в моделях заболевания Паркинсона *in vitro* и *in vivo* участвуют нейротрофины GDNF, BDNF и NGF, секретируемые НСК. Высвобождение противовоспалительных молекул данными клетками также ослабляет активацию микроглии, тем самым защищая дофаминергические нейроны от апоптоза (Willis C. et al., 2020). Были опубликованы работы, посвящённые трансплантации мезенхимальных стромальных клеток (МСК) костного мозга животным с инфарктом миокарда, которые показали положительное терапевтическое действие трансплантата за счет секретируемых факторов: фактора роста фибробластов 2 (FGF2), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), фактора роста тромбоцитов (PDGF), интерлейкина-10 (IL-10), стромального клеточного фактора-1 (SDF-1), фактора роста гепатоцитов (HGF), инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1) и тимозина- β 4 (Korf-Klingebiel M. et al., 2008; Kubal C. et al., 2006; Pawitan J. et al., 2014; Uemura R. et al., 2006). Было продемонстрировано *in vitro* и *in vivo*, что МСК костного мозга человека могут регулировать иммунный ответ, воздействуя на Т-клетки, В-лимфоциты, дендритные клетки, макрофаги и нейтрофилы. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что секреция МСК трансформирующего ростового фактора бета 1 (TGF- β 1), фактора роста гепатоцитов (HGF), индоламин 2,3-диоксигеназы (IDO) и простагландина E2 (PGE2) ингибирует пролиферацию Т-клеток и их цитокиновую активность (Laing A. et al., 2019; Yang S. et al., 2009).

Секреция интерлейкинов 6 и 10 (IL-6, IL-10) МСК костного мозга может опосредовать ингибирующее воздействие на В-лимфоциты и дендритные клетки (Djouad F. et al., 2007; Laing A. et al., 2019; Yang S. et al., 2009). Совсем недавно появились данные, свидетельствующие о том, что МСК костного мозга играют определенную роль в функционировании нейтрофилов за счет продукции цитокинов интерлейкина-1 и -6 (IL-1 и IL-6) (Joel M. et al., 2019).

Все эти данные демонстрируют, что факторы, секретируемые различными типами клеток, могут оказывать терапевтическое воздействие на многие заболевания, обеспечивая цитопротекцию, регенерацию и модулируя иммунный ответ.

1.2. Дифференцировка ИПСК в нейрональном и глиальном направлениях

Формирование нейральных клеток имеет решающее значение во время развития эмбриона, а также после рождения и на протяжении всей нашей жизни (Ming G., Song H., 2005). Невероятное разнообразие нейронов в мозге обусловлено регулируемым нейрогенезом во время эмбрионального развития. Во время этого процесса клетки нейроэпителлия дифференцируются, т. е. становятся одним из нескольких специализированных типов клеток, причем этот процесс происходит в определенное время и в определенной области мозга. Дифференцировка ЭСК/ИПСК в нейральном направлении связана с запуском механизмов и сигнальных путей, аналогичных процессам нейрогенеза в период эмбрионального развития. Нервная ткань, как известно, образована двумя основными типами клеток: нейронами и нейроглией. И те, и другие клетки образуются из общей популяции клеток-предшественников (нейроэпителлия). Поэтому дифференцировку ИПСК в различные типы нейронов и макроглии можно разделить на несколько стадий: формирование общих предшественников (НСК) и дальнейшая их специализация в нейрональные и глиальные клетки-предшественники, а затем в зрелые нейроны и глию (Салихова Д.И. и др., 2018).

1.2.1. Нейральная индукция

Нейральная индукция в эмбрионах позвоночных была впервые описана Г. Мангольдтом и Г. Шпеманом в 1924 году. Они показали, что нервная система позвоночных может быть индуцирована сигналами, исходящими из области эмбриона, известной как "организатор" (Robertis De et al., 2006). Хотя было показано, что "организатор" присутствует у различных видов, природа его сигналов оставалась неясной до тех пор, пока эксперименты на шпорцевой лягушке не выявили молекулярные события, которые могли бы лежать в основе феномена нейральной индукции у позвоночных. Тогда американский исследователь Д. Мелтон обнаружил, что подавление в клетках эктодермы зародыша шпорцевой лягушки сигнального пути трансформирующего фактора роста- β (TGF- β), одного из членов семейства костного морфогенетического белка (BMP), способно вызывать нейральную дифференцировку (Henry G. et al., 1996). В то же время учеными Р. Харландом и Э. Де Робертисом были идентифицированы белки ноггин и хордин, ингибирующие сигнальный путь BMP (Sasai Y. et al., 1996). Их секрецию осуществляли клетки шпемановского "организатора" во время образования зачатков нервной системы. Это исследование вместе с открытием Д. Мелтона привело к ныне принятой модели нейральной индукции, которая предполагает, что дифференцировка в нейральном направлении возникает в результате ингибирования BMP и TGF- β сигнальных путей в эмбриональной эктодерме (Stern C. et al., 2006). Экспериментальные данные были получены на одной модели - эмбрионах шпорцевой лягушки, что в дальнейшем побудило к проверке универсальности этого механизма на других объектах. Так, у млекопитающих, как и у амфибий, были найдены антагонисты BMP - ноггин и хордин, секретируемые клетками осевой мезодермы, выстилающими будущую нервную пластинку (Bachiller C. et al., 2000; Levine A. et al., 2007; Sasai Y. et al., 1996). Эксперименты на ЭСК млекопитающих также подтвердили роль ингибирования BMP и TGF- β сигнальных путей в запуске нейральной индукции (Baharvand H. et al., 2007; Dottori M. et al., 2008). Позже это было показано и для ИПСК (Chambers S. et al., 2009; Dottori M. et al., 2008). Так, для направленной

дифференцировки *in vitro* используют низкомолекулярное соединение SB431542, которое ингибирует сигнальный путь Lefty/Activin/TGF- β , и пептид Noggin, ингибирующий BMP сигнальный путь (Chambers S.M. et al., 2009; Denham M. et al., 2011; Yoshimatsu S. et al., 2019). Вместо дорогостоящего рекомбинантного белка Noggin можно использовать низкомолекулярное вещество дорсоморфин или LDN193189, не снижая при этом эффективности дифференцировки (Yu P.B. et al., 2008; Yan Y. et al., 2017). По некоторым данным, применение только одного дорсоморфина способствует получению до 88 % НСК, что говорит об высокой эффективности этого компонента (Zhou J. et al., 2010). На сегодняшний день применение малых молекул является перспективным подходом для получения гомогенной популяции НСК.

1.2.2. Специализация нейральных стволовых клеток в нейрональные и глиальные клетки

Клетки нейроэпителлия являются общей популяцией клеток-предшественников и способны давать начало всем типам нейронов и макроглии. Такое разнообразие инициируется морфогенами и факторами роста, вызывающими концентрационно-зависимый ответ в клетках-мишенях. Рostroкаудальное и дорсовентральное положение предшественника в развивающейся нервной трубке определяется воздействием градиента морфогенов, которое будет ограничивать его потенциал развития и определять судьбу (Ernst A. et al., 2019). Градиенты морфогенов факторов роста фибробластов (FGFs), белков семейства WNT (WNTs) и ретиноевой кислоты (PK) отвечают за rostroкаудальное положение; а морфогенов WNTs, BMPs и SHH (Sonic Hedgehog) - за дорсовентральное положение. Поэтому последующие этапы дифференцировки включают культивирование НСК с морфогенами и факторами роста для развития нейрональных и глиальных клеток-предшественников, которые в дальнейшем формируют зрелые нейроны и глию в определенных отделах мозга (Panchision D.M., McKay R.D.G., 2002).

У млекопитающих, особенно у приматов, передний мозг - самая большая часть центральной нервной системы (ЦНС). Во время развития нейроэктодермы сначала формируется данный отдел. Было показано, что на стадии дифференцировки ЭСК человека в примитивный нейроэпителий клетки экспрессируют гены *Otx2* и *Bf-1*, характерные для переднего мозга (Irioka T. et al., 2005). Н. Таката и его коллеги недавно показали, что ингибирование Wnt сигнального пути в мышинных ЭСК способствует увеличению количества предшественников переднего мозга до 30% (Takata N. et al., 2016). Добавление ретиноевой кислоты (РК) в среду культивирования ЭСК человека способствует формированию нейральных предшественников, демонстрирующих фенотипы клеток спинного и заднего отделов мозга, оцениваемые по экспрессии целого ряда *hox*-генов и подавлению генов-маркеров переднего отдела мозга, таких как *Otx2* и *Bf-1* (Glover J. et al., 2006; Simon C. et al., 2018). Регулируя концентрацию РК, дифференцировку нейральных предшественников можно смещать в сторону фенотипов заднего или спинного отделов мозга. Однако добавление только РК будет недостаточно для получения предшественников во всех сегментах спинного мозга. Моторные нейроны, получаемые из ЭСК и ИПСК человека, при наличии в среде культивирования РК в основном проявляют фенотип клеток верхнего шейного отдела спинного мозга, экспрессируя ген *HoxC5* (Nizzardo M. et al., 2010). Те, что получены из ЭСК человека с добавлением в среду культивирования FGF2 и последующего внесения РК, демонстрируют фенотип моторных нейронов заднего отдела спинного мозга, экспрессируя ген *HoxC8* (Liu J. et al., 2001; Moghadasali R. et al., 2006). За спецификацию предшественников среднего мозга отвечает фактор роста фибробластов 8 (FGF8) (Harada H. et al., 2016). Дифференцировка ЭСК мыши с добавлением в среду культивирования FGF8 способствует появлению нейральных предшественников среднего мозга, экспрессирующих ген *En-1* (Lim M. et al., 2015; Mason I. et al., 2000).

Приобретение нейронального фенотипа является следствием взаимодействия между внутренней программой клеток-предшественников и внеклеточными сигналами в определенное время и в определенном месте (Kratsios P. et al., 2018;

Thor S. et al., 2017; Franze K., 2013). Проекционные нейроны часто являются мишенями нейродегенеративных заболеваний. Так, стриарные ГАМК-нейроны повреждаются при болезни Хантингтона, дофаминергические нейроны среднего мозга дегенерируют у пациентов с болезнью Паркинсона и моторные нейроны погибают у пациентов с боковым амиотрофическим склерозом (Hardiman O. et al., 2017; Ignacio Z. et al., 2018; Zhai S. et al., 2019). Поэтому на сегодняшний день многими научными коллективами ведутся разработки протоколов дифференцировок нейральных предшественников именно в данные типы нейронов. Так, было установлено, что спецификация предшественников двигательных нейронов требует активации факторов транскрипции гомеодоменов класса II (индуцированных SHH, например, Nkx6.1 и Nkx2.2) и подавления класса I (инактивированных SHH, например, Pax6 и Irx3). Примечательно, что такая сложная транскрипционная сеть может быть организована фактором SHH в определенной концентрации. При добавлении РК предшественники становятся постмитотическими моторными нейронами, экспрессирующими факторы транскрипции Lim, такие как Lim3, Isl1/2 и HB9 (Yang C. et al., 2019). Этот молекулярный механизм был выявлен в исследованиях на куриных эмбрионах и в настоящее время в значительной степени подтверждается при дифференцировке ЭСК мыши и ИПСК человека (Nizzardo M. et al., 2010; Santos D. et al., 2017; Ulrich H. et al., 2016).

Недавние исследования показали роль факторов FGF8 и SHH в спецификации дофаминергических нейронов среднего мозга. Было показано, что культивирование эксплантов, взятых из области передней нервной пластинки, в присутствии FGF8 и SHH способствует наибольшему выходу предшественников дофаминергических нейронов (Andersson E. et al., 2006; Baizabal J. et al., 2009; Roussa E. et al., 2004). Так, в экспериментах с нейроэпителиальными клетками, полученными из ЭСК мыши и ИПСК человека, с помощью факторов FGF8 и SHH можно получить обогащённую культуру дофаминергических нейронов (Kim J. et al., 2002; Niclis J. et al., 2017; Song B. et al., 2020).

Во время эмбрионального развития глиальные клетки, включая астроциты и олигодендроциты, образуются после формирования основных типов нейронов (Jessen K. et al., 2005; Price J., 1994). Та же последовательность нейрогенеза и глиогенеза сохраняется при культивировании ранней нейроэктодермы или дифференцировке ЭСК/ИПСК в нейральном направлении. Так, например, ЭСК человека формируют нейроэпителиальные клетки в течение 2 недель. Затем клетки нейроэпителия дифференцируются преимущественно в β III-тубулин⁺-нейроны в течение следующих 2-3 недель. Астроциты, синтезирующие глиальный фибриллярный кислый белок, появляются через 6-9 недель. Олигодендроциты возникают в более позднем периоде дифференцировки (Liu H. et al., 2011; Zhang S. et al., 2001). Эта последовательность нейрональной и глиальной дифференцировки примерно соответствует временной шкале, наблюдаемой *in vivo*. Таким образом, внутренняя программа, управляющая развитием нейрональных и глиальных линий, сохраняется *in vitro*.

На сегодняшний день известно много протоколов получения олигодендроцитов из ЭСК и ИПСК (Billon N. et al., 2002; Chanoumidou K. et al., 2020; Czepiel M. et al., 2011; Hermanto Y. et al., 2019; Li S. et al., 2019; Manley M. et al., 2017; Stacpoole S. et al., 2013). Инициация дифференцировки заключается в культивировании нейроэпителиальных клеток с факторами роста FGF2 и EGF до формирования глиальных производных. Затем предшественники инкубируют в присутствии факторов FGF2 и PDGF (Frost E. et al., 2003; Murtie J. et al., 2005). Олигодендроциты, полученные таким образом, являются истинными миелинизирующими клетками, поскольку они образуют миелиновые оболочки после трансплантации в поврежденный спинной мозг крысы (Keirstead H. et al., 2005). Тем не менее доля олигодендроцитов при такой дифференцировке, как правило, невысокая. В последующих исследованиях было показано, что трансдукция трех транскрипционных факторов SOX10, OLIG2 и NKX6.2 позволяет получать более гомогенную популяцию олигодендроцитов (Stacpoole S.R.L. et al., 2013; Li P. et al., 2016; Matjusaitis M. et al., 2016).

Астроциты являются клетками нейроглии и выполняют опорную и трофическую функции для нейронов, а также создают гематоэнцефалический барьер в головном мозге. Несмотря на такие важные функции данных клеток, в настоящее время разработано несколько протоколов получения астроцитов из ЭСК и ИПСК (Emdad L. et al., 2012; Krencik R., Zhang S., 2011; Shaltouki A. et al., 2013; Julia T.C. et al., 2017). Дифференцировка НСК в глиальном направлении происходила в результате взаимодействия факторов роста FGF2 и EGF с трансмембранным рецептором Notch и запуска определенных генов, участвующих в глиогенезе. Дальнейшая дифференцировка с BMP2/4 и CNTF способствовала появлению GFAP⁺ - клеток. (Bonaguidi M.A. et al., 2005; Byun J. et al., 2020; Fukuda S. et al., 2007). Были опубликованы работы, в которых производилось культивирование НСК в среде, содержащей факторы: цАМФ, трийодтиронин, IGF-1 и NT-3 с целью увеличения образования Olig2-позитивных астроглиальных клеток (Hu et al., 2010; Das M. et al., 2018). Была достигнута эффективная генерация астроцитов путем добавления популяции НСК лейкемия-ингибирующего фактора роста (LIF), белков BMP2 и FGF2, что приводило к значительному увеличению GFAP⁺-клеток (Shaltouki et al., 2013). При этом полученные астроциты *in vitro* демонстрировали сходные функциональные характеристики и морфологические паттерны с первичной культурой астроцитов.

1.3. Патогенез ишемического инсульта

1.3.1. Ишемический каскад

Уменьшение или потеря кровообращения в области мозга приводит к быстро развивающемуся ишемическому каскаду, который включает серию биохимических событий, приводящих к распаду клеточных мембран и гибели нейронов в зоне инфаркта (Bandera E. et al., 2006). Ишемический инсульт (ИИ) начинается с тяжелой очаговой гипоперфузии, которая приводит к эксайтотоксичности и окислительному стрессу, которые в свою очередь вызывают повреждение микрососудов, нарушение целостности гематоэнцефалического барьера и инициируют постишемическое воспаление. Все

эти события усугубляют начальную травму и могут привести к необратимому повреждению головного мозга (Рисунок 2) (Xing C. et al., 2012).

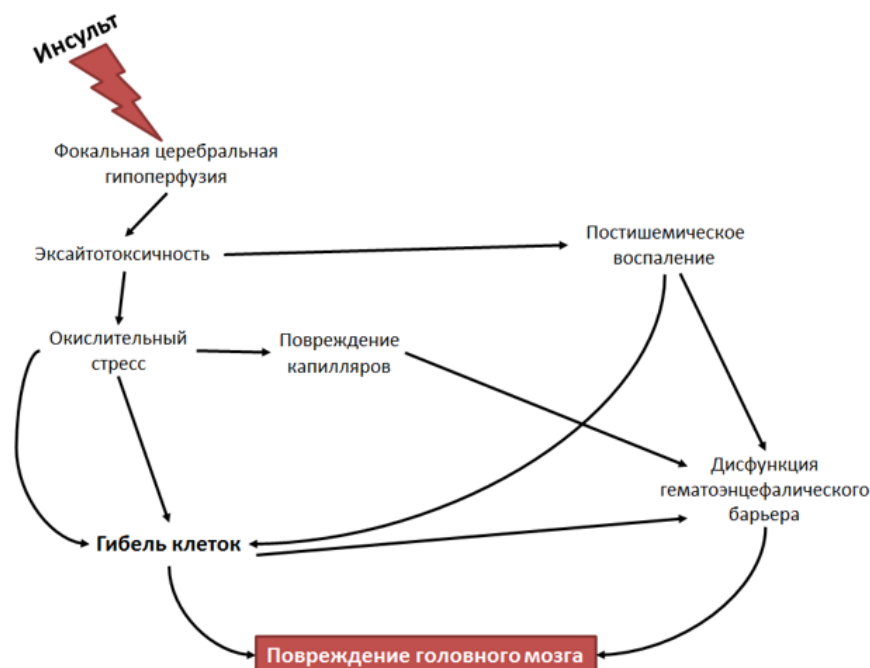


Рисунок 2. Ишемический каскад, приводящий к повреждению головного мозга (Xing C. et al., 2012).

В результате остаточной перфузии из коллатеральных кровеносных сосудов в регионах, где кровоток падает приблизительно до 30 мл/мин, ишемический каскад прогрессирует медленнее. (Khoshnam S. et al., 2017). В конечном счете степень функциональных и структурных изменений в мозге, вызванных ишемией, будет зависеть от ее степени и продолжительности.

1.3.2. Основные механизмы клеточной гибели при ишемическом инсульте

Нарушения мозгового кровообращения приводят к ограничению потребления кислорода и метаболитических субстратов нейронами. Дефицит глюкозы и кислорода, возникающий после тяжелой гипоксии, обуславливает уменьшение синтеза АТФ и истощение энергетических ресурсов клеток. (Pike L.S. et al., 2011). Если уровень АТФ низкий, то функциональная активность Na^+/K^+ - АТФазы снижается, вызывая потерю ионных градиентов и деполяризацию нейронов и астроцитов (Radak D. et al., 2017). Мембранная деполяризация и изменения

градиентов концентрации Na^+ и K^+ приводят к активации потенциал-управляемых кальциевых каналов. Это ведет к чрезмерному выделению возбуждающих медиаторов ЦНС, особенно глутамата, во внеклеточное пространство (Рисунок 2).

Неконтролируемая мембранная деполяризация путем массивных изменений градиентов концентрации Na^+ и K^+ через плазматическую мембрану влечет за собой более длительное выделение глутамата. Избыточный глутамат взаимодействует с ионотропными глутаматными рецепторами, чрезмерная активация которых способствует повышению внутриклеточного кальция, генерации свободных радикалов, изменению проницаемости митохондрий и эксайтотоксичности (Cheng Y.D. et al., 2004). Глутаматная эксайтотоксичность может приводить к апоптотической или некротической гибели клеток (Liu Y. et al., 2007; Martel M.A. et al., 2009). Выбор пути гибели зависит от времени и интенсивности стимула. В то время как некроз возникает в основном в самые ранние моменты после начала ишемии, запрограммированная гибель клеток начинается через несколько часов и длится в течение нескольких дней (Unal-Cevik I. et al., 2004; Wei L. et al., 2004; Broughton B.R.S. et al., 2009). Эта отсроченная гибель клеток происходит главным образом в зоне пенумбры и отличается от быстрой смерти некротических нейронов в ядре ишемии (Datta A. et al., 2020).

Чрезмерно повышенные уровни кальция могут вызывать многие изменения метаболизма нейронов, включая сверхэкспрессию протеаз, липаз, фосфатаз и эндонуклеаз (Orrenius S. et al., 2003; Sattler and R., Tymianski M., 2000), в результате чего происходит активация нескольких сигнальных путей, в основном вызывающих генерацию свободных радикалов, дисфункцию митохондрий, разрушение клеточной мембраны и фрагментацию ДНК (Lo E.H. et al., 2003; Nicholls D.G., 2009).

Митохондриальное нарушение является следствием как окислительно-нитрозивного стресса, так и прямого воздействия повышенного уровня внутриклеточного Ca^{2+} . Митохондрии способны к накоплению кальция в условиях его избытка в цитоплазме. Чрезмерное и длительное поглощение Ca^{2+} митохондриями вызывает их дисфункцию, которая является первичным событием

гибели нейронов при эксайтотоксичности (Duchen M.R., 2000; Broughton B.R.S. et al., 2009; Chan P.H. et al., 2009; Niizuma K. et al., 2010). Повышенные уровни внутриклеточного свободного Ca^{2+} обеспечивают индукцию/активацию проапоптотических белков, таких как Par4, Bax, Bad и Bcl-Xs (Culmsee C. et al., 2007). Антиапоптотические белки Bcl2, Bcl-XL, Bcl-w и Mcl-1, а также антиапоптотические киназы Akt и ERK защищают целостность митохондрий, ингибируя проапоптотические члены семейства BCL2. После церебральной ишемии несколько проапоптотических белков tBid, Dp-5, p53, Bim, Bax, Bak и Bad могут противодействовать антиапоптотическим белкам, вызывая повреждения митохондрий. Изменения в экспрессии членов семейства BCL2, включая повышенную экспрессию генов *Bax* и *Bad* и сниженную экспрессию генов *Bcl2* и *Bcl-w*, обнаруживаются в ишемическом ядре и зоне пенумбры (Zhao H. et al., 2003). Как только баланс смещается в сторону апоптоза, митохондрии высвобождают белки, такие как цитохром c (cyt-c) и фактор инициации апоптоза (AIF) (Culmsee C., Krieglstein J., 2007). Белок cyt-c после высвобождения в цитозоль из межмембранного пространства митохондрий связывается с фактором активации апоптотической протеазы 1 (Araf-1) с образованием апоптосомы, которая активирует каспазу-9 и впоследствии каспазу-3. Активированная каспаза-3 разрушает множество гомеостатических, репаративных и цитоскелетных белков, включая ферменты репарации ДНК, такие как поли (АДФ-рибоза)-полимераза (PARP), и активирует ДНКазу (CAD), которая расщепляет ядерную ДНК и приводит к гибели нейронов (Goto S. et al., 2002). Поврежденные митохондрии высвобождают и другие факторы, такие как эндонуклеаза G (EndoG) для облегчения фрагментации ДНК и Smac/DIABLO для активации каспаз (Hu X.L. et al., 2004).

В *in vivo* исследованиях было показано, что сверхэкспрессия гена *Bcl2* уменьшает объем очага инфаркта в мозге грызунов после ишемического инсульта (Kitagawa K. et al., 1998). Кроме того, трансгенные мыши, нокаутированные по p53, также проявляют пониженную уязвимость мозга к очаговым ишемическим повреждениям (Culmsee C. et al., 2005).

1.3.3. Роль окислительного стресса при ишемическом инсульте

Окислительный стресс является одним из наиболее значимых факторов патогенеза ряда неврологических заболеваний, в том числе и инсульта. Окислительный стресс определяется как состояние, возникающее при смещении физиологического баланса между окислителями и антиоксидантами в пользу первых, что может нанести вред организму. Окислительный стресс, вызванный эксайтотоксичностью, считается основным событием, приводящим к повреждению мозга после церебральной ишемии (Chan P.H. et al., 2009; Lin M.T. et al., 2006; Yang Q. et al., 2019). Свободные радикалы представляют собой молекулярные производные кислорода и оксида азота. Вследствие их высокой окислительной способности промежуточные состояния восстановления кислорода называются активными формами кислорода (АФК), а азотсодержащие окислители называются активными формами азота (АФА). АФК — это небольшие молекулы, содержащие супероксидный анионный радикал (O_2^-), гидроксильный радикал (ОН) и некоторые нерадикалы, которые являются либо окислителями, либо легко превращаются в радикалы, такие как перекись водорода (H_2O_2). АФА представляют собой молекулы азота, такие как оксид азота (NO), который имеет относительно длительный период полураспада (около 1 с) и чьи реакции с биологическими молекулами протекают медленно из-за его очень быстрой диффузии в кровь и последующей инактивацией гемоглобином. NO, соединяясь с H_2O_2 и O_2 , образует ОН и мало реакционноспособный пероксинитрит ($ONOO^-$), который стабилен при щелочном pH, но в клетках легко восстанавливается до пероксинитровой кислоты ($ONOOH$), которая очень цитотоксична (Simion A. et al, 2019).

После церебральной ишемии и особенно реперфузии генерируются устойчивые окислители, включая супероксидные и гидроксильные радикалы, которые непосредственно участвуют в повреждении клеточных макромолекул, таких как липиды, белки и нуклеиновые кислоты, что в конечном итоге приводит к гибели клеток (Liu S. et al., 2003; Moskowitz M.A. et al., 2010; Singhal A.B. et al., 2006). Реоксигенация во время реперфузии снабжает клетки кислородом, который

поддерживает жизнеспособность нейронов, а также служит субстратом многочисленных реакций ферментативного окисления, которые образуют реактивные окислители. Кроме того, реперфузия после окклюзии часто вызывает увеличение кислорода до уровней, которые не могут быть использованы митохондриями при нормальных физиологических условиях. Во время реперфузии нарушение механизмов антиоксидантной защиты является результатом перепроизводства кислородных радикалов, инаktivации систем детоксикации и потребления антиоксидантов (Pan J. et al., 2007; Schaller B., Graf R., 2004). Отсроченное лечение с использованием антиоксидантов и ингибиторов ферментов, продуцирующих свободные радикалы, может быть эффективным при экспериментальной фокальной ишемии головного мозга (Imai H. et al., 2003; Simion A. et al., 2019). Кроме того, животные, испытывающие дефицит ферментов, поглощающих радикалы, более восприимчивы к церебральным ишемическим повреждениям (Kim G.W. et al., 2002). Таким образом, свободные радикалы считаются важной терапевтической мишенью для улучшения исхода ИИ.

1.3.4. Постишемическое воспаление

При ИИ происходит вторичное, отсроченное поражение мозга за счет воспаления, которое связано с активацией клеток микроглии, а также инфильтрацией мозга периферическими иммунными клетками (Кулеш и др., 2016; Chernykh E.R. et al., 2018). Данная активация приводит к выработке повреждающих медиаторов воспаления, включая интерлейкин-1 β и -6 (IL-1 β , IL-6) и фактор некроза опухоли (TNF α) (Iadecola C. et al., 2011). При этом существуют данные, свидетельствующие о том, что клетки иммунной системы могут участвовать в ремоделировании тканей мозга после повреждения.

Причиной нейровоспалительной реакции в ишемизированном мозге является иммунный ответ на повреждения мозговой ткани. Активность иммунной системы обусловлена не только патогенными стимулами, но и эндогенными медиаторами, которые могут образовываться при гибели клеток и разрушении внеклеточного

матрикса. В условиях церебральной ишемии некротизированные нейроны и другие клетки высвобождают различные белки (амфотерин (HMGB1) и S100B), аденозинтрифосфат (АТФ), ДНК, РНК, окисленные липопротеиды низкой плотности, β -амилоид и другие молекулы. Эти молекулы, взаимодействуя с рецепторами, активируют высвобождение иммунными клетками провоспалительных медиаторов (цитокинов, хемокинов, нитрооксида, свободных радикалов кислорода), тем самым запуская воспалительный каскад (Malone K. et al., 2019). При этом действие медиаторов воспаления, нарушающих целостность гематоэнцефалического барьера, способствует рекрутированию циркулирующих в крови иммунных клеток в мозговую ткань (Jia J., Cheng J., 2017).

В паренхиме мозга при физиологических условиях клетки микроглии находятся в покое за счет взаимодействия CD200 рецептора с его лигандом, находящимся на цитоплазматической мембране нейронов (Meuth S.G. et al., 2008). Нарушение такого взаимодействия вследствие гибели нейронов приводит к активации микроглиальных клеток, которые могут приобретать либо M1 провоспалительный фенотип и участвовать в воспалительном каскаде, либо M2 противовоспалительный/репаративный фенотип и ремоделировать поврежденные ткани путем подавления воспаления (Ma Y. et al., 2017). Участие активированной микроглии, поляризованной по M2 фенотипу в репарации повреждений мозговой ткани опосредуется синтезом противовоспалительных медиаторов – TGF- β , IL-10, IL-4, IL-13, IGF-1 и различных нейротрофических факторов (Zhu W. et al., 2014). В раннем периоде при очаговой церебральной ишемии микроглия активируется по M2-фенотипу, однако впоследствии ишемизированные нейроны градиентно иницируют поляризацию микроглии в M1-клетки, что усиливает гибель нейронов (Yao A. et al., 2014).

Существуют убедительные доказательства того, что активированные клетки микроглии в ответ на поражение мозга могут высвобождать некоторые провоспалительные цитокины, такие как TNF α , IL-1 β и IL-6, а также другие цитотоксические молекулы, включая оксиды азота, АФК и простагландины (Lucas S.M. et al., 2006). В остром периоде инсульта признаки системного воспаления в

виде возрастания в сыворотке крови провоспалительных цитокинов и хемокинов выявлены и у человека. При этом концентрация IL-6 и TNF α коррелирует с размерами очага инфаркта, тяжестью инсульта и его исходами (Emsley H.C.A. et al., 2005; Waje-Andreassen U. et al., 2005).

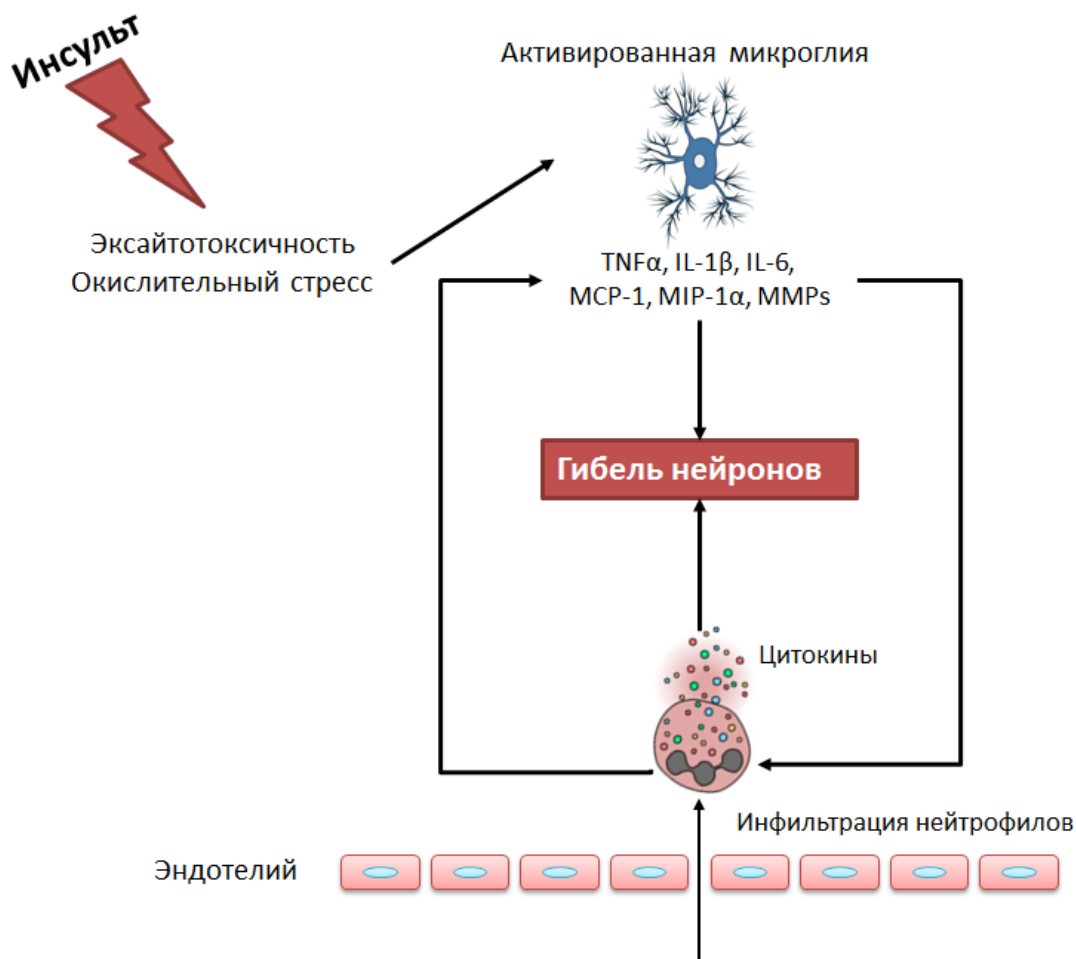


Рисунок 3. Воспалительная реакция в ишемизированном мозге (London A. et al., 2013).

Высвобождение провоспалительных цитокинов способствует усилению экспрессии лейкоцитарных молекул адгезии на эндотелиальных клетках и повышению проницаемости гематоэнцефалического барьера, что приводит к миграции лейкоцитов (нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов) в зону повреждения (Pinheiro M.A. et al., 2016). Первыми в зону ишемии проникают нейтрофилы, однако их роль в патогенезе ишемии неоднозначна, так как они представляют гетерогенную популяцию, в которой различают нейтрофилы 1-го типа, обладающие повреждающим действием, и нейтрофилы 2-го типа,

оказывающие нейропротективное действие (Brooks S.D. et al. 2014; Perez-de-Puig I. et al., 2015). Через 24 часа после окклюзии артерии в зоне инфаркта и пенумбры выявляются моноциты (Deng H. et al., 2003). Считается, что моноциты могут не только усиливать ишемическое повреждение тканей и способствовать прогрессии вторичных повреждений, но и активировать процессы регенерации (Chernykh E.R. et al., 2018; Hu X. et al., 2015; Xiong X.Y. et al., 2016) (Рисунок 3).

1.3.5. Повышенная экспрессия матричных металлопротеиназ

Матричные металлопротеиназы (ММП) представляют собой семейство протеолитических ферментов, которые отвечают за ремоделирование внеклеточного матрикса и могут разрушать все его компоненты. Экспрессия ММП в мозге взрослого человека очень низкая или не обнаруживается, но в ответ на повреждения их экспрессия может повышаться (Montaner J. et al., 2001). ИИ связан с нарушением целостности гематоэнцефалического барьера, приводящей к вазогенному отеку и кровоизлиянию. Экспериментальные исследования показали, что данные процессы возникают в результате экспрессии и активации ММП (Asahi M. et al., 2001; Montaner J. et al., 2019).

Повышенная экспрессия ММП-9 была показана в тканях головного мозга и в сыворотке пациентов с острым ИИ, а также на животных моделях инсульта через 12 ч после перманентной окклюзии средней мозговой артерии (Park K.P. et al., 2009). Заблаговременное ингибирование ММП может оказывать положительное влияние на течение инсульта (Asahi M. et al., 2001).

1.3.6. Современные подходы к терапии ишемического инсульта

На сегодняшний день единственным эффективным методом лечения ИИ является ранняя реперфузия зоны ишемии, которая ограничена узким «терапевтическим окном», составляющим 4,5 ч для внутривенного тромболиза и 6 ч для эндоваскулярных методик (Kim J.T. et al., 2017). Однако даже при своевременном применении данных технологий, последующем использовании новых антиагрегантов и антикоагулянтов и ранней нейрореабилитации у

большинства пациентов, перенесших ИИ, остается стойкий неврологический дефицит в результате гибели нервной ткани в зоне инфаркта мозга. Однако на сегодняшний день не существует ни одного препарата, нейропротективная активность и эффективность которого была бы подтверждена в многоцентровых рандомизированных клинических исследованиях (Powers W.J et al., 2019). К перспективным направлениям лечения ИИ относят клеточные технологии нейротрансплантации с целью замены утраченной нервной ткани донорскими клетками (Bliss T. et al., 2007; Savitz S.I. et al., 2004). На заместительный эффект клеток возлагают большие надежды, однако в настоящее время исследователи все больше склоняются к мнению, что клетки оказывают преимущественно паракринное влияние на регенеративные процессы (Locatelli F. et al., 2009; Хубутия М.Ш. и др., 2012; Baraniak P.R., McDevitt T.C, 2010; Shimada S., Spees J.L., 2011). Паракринные эффекты при трансплантации клеток связывают с продукцией широкого набора сигнальных молекул, обладающих одновременным воздействием на несколько звеньев патогенеза и направленных на снижение гибели и поддержание функций нейронов и глиальных клеток (Bhasin A. et al., 2016; Gneschi M. et al., 2016; Lee I.H. et al., 2017). Секретируемые факторы способны стимулировать пролиферацию, цитопротекцию и миграцию клеток нервной ткани. Они могут также защищать клетки от повреждения свободными радикалами кислорода, продуцируя антиоксиданты и антиапоптотические молекулы. Кроме того, стволовые клетки секретируют ангиогенные, антифибротические, а также противовоспалительные или иммуносупрессивные факторы (Martino G. et al., 2006). Следовательно, новые направления исследований должны быть основаны на использовании стволовых/прогениторных клеток в качестве источника биологически активных веществ для обеспечения регенерации тканей.

На сегодняшний день наиболее изученным клеточным материалом для трансплантации в случае патологии головного мозга считаются МСК. Они обладают способностью мигрировать в зоны повреждения после трансплантации и оказывать трофическую поддержку тканей, а также ингибировать апоптоз

нейронов и активировать ангиогенез. Трансплантация МСК в эксперименте приводит к уменьшению объема зоны инфаркта и снижению плотности рубцовой ткани. По предварительным данным, трансплантированные МСК мигрируют в нейрогенные зоны мозга и активируют собственные регенеративные механизмы реципиента. Кроме того, МСК секретируют трофические факторы NGF и VEGF, которые способствуют росту нейритов и аксонов *in vitro* и *in vivo* (Chen J. et al., 2003; Martins L.F. et al., 2017; Pires A.O. et al., 2014). Также было показано положительное влияние секретируемых веществ МСК при терапии ИИ. Так, введение секрета МСК жировой ткани в область желудочков головного мозга за 1 ч до окклюзии средней мозговой артерии мышей приводило к уменьшению объема очага повреждения и неврологического дефицита через 24 часа после инсульта (Egashira Y. et al., 2012). Кроме того, терапия секретом МСК увеличивала пролиферацию эндотелиальных клеток на 15-й день эксперимента (Cho Y. et al., 2012). Сообщалось также, что внутривенное введение секрета МСК костного мозга и интраназальное введение секрета МСК пупочного канатика животным с экспериментальным инсультом улучшало их функциональное восстановление (Tsai M. et al., 2014a; Zhao Q. et al., 2015).

1.4. Модели оценки нейротрофического и нейропротективного действия биологически активных веществ *in vitro*

Одной из самых популярных моделей *in vitro* для тестирования нейропротективного действия биологически активных веществ является модель глутаматной эксайтоксичности. Глутамат - один из основных возбуждающих нейромедиаторов ЦНС, который играет важную роль в развитии головного мозга, дифференцировке нейронов, и благодаря влиянию на синаптическую пластичность вовлечён в такие когнитивные функции, как обучение и память. Однако чрезмерно высокая концентрация внеклеточного глутамата может приводить к неконтролируемой непрерывной деполяризации нейронов и как следствие к гибели клеток. Этот процесс происходит при ИИ и называется эксайтотоксичностью (Wang Y., Qin Z., 2010). Глутамат концентрируется в

синаптических пузырьках в пресинаптическом терминале под действием везикулярных переносчиков глутамата. Кроме того, некоторые молекулы глутамата в везикулах могут синтезироваться аспартат-амино-трансферазой из 2-оксоглутарата с использованием L-аспартата в качестве донора аминокислотной группы, а также в цикле трикарбоновых кислот. После деполяризации пресинаптической мембраны глутамат высвобождается в синаптическую щель и связывается на постсинаптической мембране с ионотропными рецепторами глутамата, которые представляют собой лиганд-управляемые ионные каналы и включают рецепторы типа α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPA), каината и N-метил-D-аспарагиновой кислоты (NMDA). В то время как AMPA и каинатные рецепторы в основном опосредуют приток натрия, NMDA-рецепторы обладают высокой кальциевой проводимостью. Повышенная внутриклеточная концентрация Ca^{2+} нарушает гомеостаз и инициирует каскад сигнальных путей, что приводит к усиленной выработке оксида азота, дисфункции митохондрий, нарушению регуляции окислительного фосфорилирования, стрессу эндоплазматического ретикулума и высвобождению лизосомальных ферментов (Prentice H. et al., 2015). Кроме того, накопление глутамата также может ингибировать поглощение цистина путем изменения действия системы антипортера цистина/глутамата, повышение активности которого усиливает вышеупомянутые события, истощая цистин в нейронах и в конечном итоге снижая концентрацию глутатиона, что приводит к накоплению свободных радикалов. В отсутствие AMPA и NMDA - рецепторов глутаматная токсичность может реализовываться через этот антипортер, стимулирующий независимый от Ca^{2+} окислительный стресс (Albrecht P. et al., 2012).

Гипоксия, как известно, является типичным процессом, сопровождающим развитие ИИ. Она приводит к функциональным, а затем и структурным изменениям в органах и тканях в результате снижения внутриклеточного кислорода. При гипоксии снижение экспрессии астроцитарных глутаматных транспортеров EAAT1 и EAAT2 способствует повышению концентрации внеклеточного глутамата, что приводит к перевозбуждению нейронов. В

настоящее время большое внимание уделяют специфическому регуляторному белку - гипоксией индуцированному фактору-1 α (HIF-1 α). Показано, что этот фактор играет главную роль в системном ответе организма на гипоксию, синтезируется во многих тканях, в том числе и в нервной. HIF-1 α является субъединицей гетеродимерного белка HIF-1, бета субъединица которого экспрессируется постоянно, в то время как экспрессия альфа субъединицы регулируется содержанием кислорода. При нормальной концентрации кислорода происходит гидроксилирование аминокислотных остатков пролина молекулы HIF-1 α в результате активности фермента пролилгидроксилазы, которая является молекулярным сенсором кислорода (Смирнова Н.А. и др., 2012; Новиков В.Е., Левченкова О.С., 2013). Измененная таким образом субъединица подвергается протеасомной деградации. В состоянии гипоксии белковая молекула HIF-1 α не гидроксилируется, остается стабильной и накапливается. Субъединицы HIF-1 альфа и бета объединяясь, образуют транскрипционный фактор HIF-1, который связывается в ядре клетки с особыми последовательностями ДНК, активируя гены, участвующие в развитии гипоксии (Новиков В.Е. и др., 2014).

Существует несколько способов моделирования гипоксии *in vitro*. Многие из них основаны на замене нормоксической культуральной среды на среду с низким содержанием кислорода либо культивированием в термостате с низким содержанием кислорода. Преимущественно *in vitro* для индукции гипоксии в культурах клеточных линий используется дихлорид кобальта (CoCl₂). Он оказывает аналогичное гипоксии действие на экспрессию мРНК HIF-1 α , что указывает на зависимость процесса не только от уровня кислорода. Было показано, что CoCl₂ активирует HIF-1 за счет истощения внутриклеточного содержания аскорбиновой кислоты, кофактора для пролилгидроксилазы, который дестабилизирует и инактивирует HIF-1 α (Tanaka T. et al., 2005).

Клеточная модель для проведения экспериментальных исследований *in vitro* по оценке нейротрофического и нейропротективного действия биологически активных веществ должна обладать следующими характеристиками: клетки

должны иметь фенотип нейронов и воспроизводить их поведение *in vivo*; являться гомогенной клеточной популяцией, позволяющей проводить биохимические и молекулярные исследования и отличаться простотой манипуляции (Woodruff T. et al., 2011). Многие из доступных в настоящее время нейрональных клеточных линий не подходят для этих задач из-за фенотипических отличий от своих клеток-предшественников. Адекватной альтернативной моделью могут являться первичные культуры высокодифференцированных нейронов. Однако недостатком использования первичных культур является то, что большинство из них состоят из смешанных нейрональных популяций. Присутствие клеток нейроглии (в основном астроцитов) может искажать результаты эксперимента из-за различий в функциональных и метаболических характеристиках по сравнению с нейронами. В качестве оптимального варианта часто используются гранулярные клетки (клетки-зерна) мозжечка. Первичные культуры мозжечка представлены преимущественно зрелыми нейронами поздних (послеродовых) стадий развития ЦНС, имеют высокую гомогенность - более 95% клеток являются глутаматэргическими нейронами, могут быть легко выделены из новорожденных животных и культивированы *in vitro* (Kramer D., Minichiello L., 2010).

В качестве клеточных моделей для изучения нейротрофического и нейропротективного действия биологически активных веществ наряду с первичными культурами нейронов мозжечка рассматриваются культуры кортикальных нейронов и клеточные линии, такие как PC12 -феохромоцитома крысы, линии нейробластомы человека NG108-15 и SH-SY5Y (Chaurasiya N.D. et al., 2017; Kritis A.A. et al., 2015).

Таким образом, модели глутаматной эксайтотоксичности и гипоксии позволяют воспроизводить процессы, происходящие при ишемии головного мозга и исследовать паракринные механизмы действия НКП и ГКП *in vitro*.

1.5. Экспериментальные животные модели ишемического инсульта

В основе патогенеза ИИ лежит временное или постоянное прекращение кровотока в сосудах головного мозга, обусловленное их спазмом или

атерогенным сужением просвета сосудов бляшкой, тромбом или эмболом. В 70% случаев инфаркт головного мозга развивается в бассейне средней мозговой артерии (СМА), что обусловлено особенностями кровоснабжения головного мозга. При таком поражении в клинической картине преобладают двигательные и чувствительные нарушения в конечностях, а также изменения функций высшей нервной деятельности, проявляющиеся в виде депрессии и других аффективных расстройств (Khoshnam S. et al., 2017).

Экспериментальные животные модели ИИ играют важную роль в изучении патогенеза церебральной ишемии и поиске новых терапевтических методов. На сегодняшний день разработано множество моделей, использующих разные виды лабораторных животных и различных по принципу индуцирования острой церебральной ишемии (Fluri M. et al., 2015; Kaur H. et al., 2019). В частности, разработаны несколько общепринятых в мировой научной практике моделей инсульта. В настоящее время общепризнанной моделью, как на мелких, так и на крупных лабораторных животных является окклюзия средней мозговой артерии (ОСМА) (Stroke T.S., 1999). ОСМА приводит к снижению кровотока в областях неокортекса и дорсолатерального стриатума, кровоснабжаемых средней мозговой артерией (СМА). Степень снижения кровотока зависит от длительности окклюзии, а также области окклюзии на территории самой артерии. Существует несколько разновидностей данной модели, и все они основаны на перманентной или транзиторной (с реперфузией) окклюзии СМА в проксимальном или дистальном отделах сосуда. Эти модели широко используются как наиболее сходные с тромбоэмболическим инсультом у человека (Ginsberg M. et al., 1989; Zhang R.L. et al., 1997). Распространено применение модели ОСМА для изучения фармакологической нейропротекции и механизмов развития повреждения при ишемии, а также для характеристики генов и белков, вовлеченных в патогенез инсульта. А. Тамура разработал модель перманентной ОСМА в проксимальной части с использованием подвисочной краниотомии, которая воспроизводит инфаркт соответствующих областей коры и подкорковых структур (Tamura A. et al., 1981). СМА подвергают электрокоагуляции либо перманентной перевязке, но

эта методика сопряжена с высоким травматизмом хирургических процедур и даже травматическим поражением головного мозга (Roof R.L. et al., 2001; Wada K. et al., 2003). Кроме того, удаление твердой мозговой оболочки при краниотомии влияет на внутричерепное давление. Другая разновидность модели ОСМА основана на введении гомологичных аутотромбов в русло внутренней мозговой артерии. И хотя размер тромбов унифицирован, данная модификация дает непостоянный объем инфаркта. Ценность данной модели заключается в возможности применения для изучения влияния факторов свертывания на восстановление после инсульта (Atochin D.N. et al., 2004). Коизуми с соавт. разработал простой, относительно неинвазивный способ достичь перманентной или транзиторной ОСМА - использование внутрисосудистого филамента (Koizumi J., 1986). Метод заключается в операционном внедрении нейлонового или полипропиленового монофиламента (стержня) с силиконовым наконечником во внутреннюю сонную артерию с дальнейшим введением его интракраниально до момента перекрывания СМА (Culver J.P. et al., 2003; Shimazu T. et al., 2005; Williams A.J. et al., 2004). После ОСМА внутрисосудистым филаментом животные могут жить в течение дней, недель и месяцев, которые необходимы для регистрации функциональных повреждений головного мозга (DeVries A.C. et al., 2001). Таким образом, для изучения нейропротективных и нейротропных свойств нейрональных и глиальных клеток, а также их секретомов, наиболее подходящей представляется модель фокального инсульта у крыс с использованием внутрисосудистого филамента. Данная модель является общепринятой и широко распространена для исследования эффективности различных КС, что делает результаты, которые будут получены с применением данной модели, сопоставимыми для сравнения с результатами исследований, проведенных ранее и проводимых в настоящее время в мире.

По данным литературы, для изучения эффективности введения КС при терапии ишемии головного мозга у животных применяются два основных варианта введения: внутривенный и внутриартериальный пути (Hayashi Y. et al., 2006; Yang H.N. et al., 2018). Так, по данным некоторых работ,

внутриартериальное введение секрета мезенхимальных стволовых клеток крысам, подвергавшимся ишемии мозга в эксперименте, является более эффективным по сравнению с внутривенным введением (Cho Y.J. et al., 2012; Cunningham C.J. et al. 2018). Для терапии острого ИИ внутриартериальное введение биологически активных веществ также продемонстрировало более высокую эффективность по сравнению с внутривенным (Berkhemer O.A. et al., 2015). Исследование, проведенное в рамках данной работы, показало, что внутриартериальный способ введения НКП, полученных из ИПСК, крысам с ИИ эффективнее снижает смертность животных, способствует восстановлению их неврологического статуса и уменьшает объем очага инфаркта по сравнению с внутривенной трансплантацией (Наместникова Д.Д. и др. 2019; Черкашева Э.А. и др., 2018). Введение биомолекул в магистральные артерии шеи или головы обеспечивает «адресную доставку» веществ и является технически более трудным способом, нежели внутривенное введение, а также опасным в связи с возможностью развития церебральной эмболии. Внутривенный путь введения является сравнительно безопасным, удобным и легким в применении. К главным его недостаткам можно отнести возможность того, что биологически активные вещества не проникнут в очаг ишемии головного мозга.

1.5.1. Методы оценки степени тяжести ишемического инсульта

Несмотря на значительное количество исследований, посвященных терапии экспериментального инсульта, анализ их результатов осложнен в связи с отсутствием единого протокола проведения манипуляции по введению стволовых клеток и их секретов, а также единых сроков и количества вводимого препарата.

Оценку эффективности терапии наиболее часто проводят на основе анализа очага инфаркта мозга и оценки степени неврологического дефицита. Для оценки зоны инфаркта мозга можно использовать тетразолиевый метод с применением 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида. 2,3,5-ТТХ присоединяет водород, который, проходя через всю систему переносчиков, соединяется с молекулярным

кислородом. Ферментативное окисление субстрата сопровождается образованием НАДН или НАДФН. На втором этапе реакции 2,3,5-ТТХ в сопряженной «индикаторной реакции» восстанавливается при участии НАДФН-дегидрогеназы до водонерастворимого формазана, который имеет красную окраску. Таким образом, образование формазана происходит в месте локализации НАДФН-дегидрогеназы, как правило, в митохондриях. Интенсивность окраски ткани зависит от количества образующегося формазана и свидетельствует об активности фермента. Очаг ишемии остаётся неокрашенным (Li L. et al., 2018).

Более современно и точно оценить развитие острой ишемии уже с первых минут, определить объем инфаркта мозга, а также визуализировать вещество головного мозга и интракраниальные сосуды возможно методом магнитно-резонансной томографии, используя специальные томографы для лабораторных животных (Ding G. et al., 2014). Для оценки эффективности и безопасности вводимых веществ целесообразно использовать следующие режимы:

- T2 - взвешенные изображения (T2-ВИ) в двух ортогональных проекциях для оценки объёма очага ИИ начиная со 2-ых суток;
- диффузионно взвешенные изображения (ДВИ) с построением карт измеряемого коэффициента диффузии (ИКД) для оценки объёма очага в первый день и количественного нахождения ИКД в последующем;
- 3D время пролётная ангиография (3D-TOF) для контроля реперфузии по СМА;
- изображения, взвешенные по магнитной восприимчивости (SWI) для оценки геморрагической трансформации в зоне инсульта и возможных геморрагических осложнений при окклюзии СМА.

Для оценки неврологического статуса у грызунов разработано множество шкал и тест-систем (Canazza A. et al., 2014). Однако наиболее удобной в использовании и стандартизированной является шкала mNSS (modified Neurological Severity Scores) (Si D. et al., 2014). Данная шкала включает оценку моторных нарушений (степень пареза, мышечный тонус и экстрапирамидные расстройства), чувствительности (поверхностную и глубокую), рефлексов и координации движений. Каждый балл по этой шкале даётся за невозможность

выполнить тот или иной тест, а также при отсутствии того или иного рефлекса. В итоге оценивается сумма баллов. Максимальное количество баллов по шкале mNSS - 18. При сумме баллов от 1 до 7 инсульт считается легким, от 8 до 12 - умеренным, выше 12-тяжелым. Шкала mNSS позволяет оценить степень неврологического дефицита и хорошо подходит для тестирования животных в течение 60 дней после повреждения мозга.

1.6. Заключение к обзору литературы

Актуальность поиска лекарственных препаратов, обладающих нейропротективными действиями для лечения последствий ИИ, не вызывает сомнения. Особую медицинскую и социальную значимость имеет разработка новых терапевтических подходов в реабилитации больных после острых нарушений мозгового кровообращения. В настоящее время ИПСК рассматриваются как самый перспективный источник клеток для регенеративной медицины. Возможность эффективной экспансии ИПСК и их дифференцировки в разных направлениях, в том числе нейрональном и глиальном, решают проблему дефицита донорского материала и снимают ряд этических вопросов. Одним из перспективных направлений регенеративной медицины является выделение из дифференцированных культур или стволовых клеток биологически активных веществ, прежде всего сигнальных молекул, и использование их для стимуляции регенерации. В настоящее время гипотеза паракринной индукции репаративных процессов при различных вариантах клеточной терапии представляется наиболее обоснованной, поэтому применение биологически активных веществ, выделенных из клеточных культур, является перспективным методом терапии нейродегенеративных заболеваний, сосудистых деменций и может обладать по сравнению с живыми клеточными культурами такой же высокой эффективностью и гораздо большей безопасностью. Кроме того, установление роли факторов, секретируемых глиальными клетками, в поддержании структурной и функциональной организации нейронов позволит исследовать механизм нейронально-глиального взаимодействия, которое детально можно изучать только на моделях *in vitro*.

Был выполнен патентный поиск в соответствии с ГОСТ Р15.011-96, который показал высокий интерес к теме, исследуемой в работе. При проведении поиска в базах данных было найдено несколько патентных документов, описывающих различные способы терапии ИИ и нейродегенеративных заболеваний с использованием секретомов стволовых и прогениторных клеток. Результаты исследований по изучению и сравнению протективных и прорегенеративных свойств секретомов НКП и ГКП, полученных из ИПСК, до настоящего времени опубликованы не были.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Составы сред для культивирования клеток

Среда для культивирования биоптата кожи: DMEM/F12, 10% фетальная бычья сыворотка (FBS), 2 mM L-глутамин, 50 ед./мл пенициллин-стрептомицин

Среда для культивирования фибробластов: DMEM, 10% FBS, 2 mM глутамин, 50 ед./мл пенициллин-стрептомицин.

Среда для культивирования эмбрионидных телец: DMEM/F12, 20% FBS, 2 mM глутамин, 1% смесь незаменимых аминокислот, 50 ед./мл пенициллин-стрептомицин.

Среда для нейральной дифференцировки ИПСК: DMEM/F12, 2% заменителя сыворотки, 1% N2 добавка, 1 mM глутамин, 1% смесь незаменимых аминокислот, 50 ед./мл пенициллин-стрептомицин, 200 нМ LDN193189, 10 мкМ SB431542, 2 мкМ дорсоморфин.

Среда для дифференцировки НСК в нейрональные клетки-предшественники: DMEM/F12, 2% B27 добавка, 1 mM глутамин, 1% смесь незаменимых аминокислот, 50 ед./мл пенициллин-стрептомицин, 20 нг/мл FGF2, 1 мкМ пурморфамин.

Среда для созревания нейронов: DMEM/F12, 2% B27 добавка, 1 mM глутамин, 1% смесь незаменимых аминокислот, 50 ед./мл пенициллин-стрептомицин, 20 нг/мл BDNF, 200 мкМ аскорбиновая кислота.

Среда для дифференцировки НСК в глиальные клетки-предшественники:

I этап - DMEM/F12, 1% N2 добавка, 1 mM глутамин, 50 ед./мл пенициллин-стрептомицин, 1% FBS, 10 нг/мл FGF2, 20 нг/мл EGF.

II этап - DMEM/F12, 1% FBS, 1% N2 добавка, 1 mM глутамин, 50 ед./мл пенициллин-стрептомицин, 10 нг/мл FGF2, 20 нг/мл EGF, 20 нг/мл CNTF.

III этап - DMEM/F12, 1% FBS, 1% N2 добавка, 1 mM глутамин, 50 ед/мл пенициллин-стрептомицин, 20 нг/мл EGF, 20 нг/мл CNTF.

Среда для созревания астроглии: DMEM/F12, 1% FBS, 1% N2 добавка, 1 mM глутамин, 50 ед/мл пенициллин-стрептомицин, 20 нг/мл CNTF.

Среда для культивирования линии SH-SY5Y: DMEM/F12, 10% FBS, 2 mM L-глутамин, 50 ед./мл пенициллин-стрептомицин

Среда для дифференцировки SH-SY5Y:

I этап - Opti-MEM, 10 mM ретиноевая кислота, 0,5% FBS, 2 mM L-глутамин, 50 ед./мл пенициллин-стрептомицин

II этап - DMEM/F12, 2% B27 добавка, 50 нг/мл BDNF, 2 mM L-глутамин, 50 ед./мл пенициллин-стрептомицин.

Среда для культивирования мозжечковых нейронов: Neurobasal Medium, 2 % B27 добавка, 20 mM KCl, 2 mM L-глутамин, 50 ед./мл пенициллин-стрептомицин.

Компоненты и реактивы для приготовления сред и проведения экспериментов представлены в приложении.

2.2. Протоколы экспериментов

2.2.1. Информация о донорах биологического материала

Взятие биопсии кожи у доноров проводили в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова» после подписания пациентами информированного согласия. Исследования были одобрены локальным этическим комитетом. Были взяты образцы от трех здоровых доноров мужского пола в возрасте 35-40 лет.

2.2.2. Получение первичных культур фибробластов кожи человека

Полученный биоптат (0,5-1 см²) переносили в чашку Петри, промывали раствором Хэнкса с цефазолином, затем добавляли раствор 0,25% трипсина и Версена в соотношении 1:1 и инкубировали 1,5 часа при 37°C. Затем суспензию

пипетировали и проводили центрифугирование при 1100 об/мин 10 минут. Супернатант удаляли, а осадок ресуспедировали в среде для культивирования фибробластов и рассевали на чашки Петри диаметром 35 мм в плотности 1500-2000 клеток/см². Смена культуральной среды происходила раз в три дня.

2.2.3. Получение ИПСК с помощью генетических конструкций

Для репрограммирования неинтеграционным методом использовали коммерческий набор «CTS CytoTune-iPS 2.1 Sendai Reprogramming Kit» на основе вируса Сендай. Для исследования были взяты две культуры фибробластов от разных доноров на 3-м пассаже. За день до репрограммирования фибробласты высевали в количестве 200 тысяч на лунку 6-луночного планшета. На следующий день добавляли векторы, несущие гены Oct4 и Sox2 (KOS), L-Myc (hL-Myc), Klf-4 (hKlf4) в количестве вирусных частиц на клетку (MOI) - 5, 5 и 3, соответственно. Через сутки производили замену среды для фибробластов и далее меняли ежедневно в течение 6 дней. На 7-ой день после репрограммирования клетки промывали дважды фосфатно-солевым буфером, открепляли их реагентом TrypLE Select и центрифугировали при 1100 об/мин в течение 5 минут. Полученный супернатант отбирали, а клеточный осадок пересаживали в количестве 100 тысяч на чашку Петри диаметром 60 мм, предварительно обработав раствором витронектина в концентрации 10 мкг/мл. Через 24 часа после посева производили замену среды на Essential 8 Medium для культивирования плюрипотентных клеток человека. Смену среды осуществляли каждый день. На 15 сутки после инфекции начинали отбор клонов, основываясь на морфологическом критерии схожести колоний с ЭСК человека.

Линия ИПСК, полученная методом интеграционной доставки векторов репрограммирования (лентивирусная инфекция), была предоставлена Федеральным научно-клиническим центром физико-химической медицины ФМБА (Лебедева О.С., 2016). Согласно протоколу, трансдукция фибробластов кожи производилась с помощью лентивирусных векторов (LeGO-hOCT4, LeGO-hSOX2-IRES-GFP, LeGO-hC-Myc, LeGO-hKLF4) в количестве вирусных частиц на

клетку (MOI) - 10, 10, 2,5 и 5, соответственно. На 10-12 сутки эксперимента на чашках Петри образовались колонии клеток, которые отбирали на основе морфологических критериев схожести с ЭСК человека.

2.2.4. Культивирование ИПСК человека

Отобранные клоны культивировали как самостоятельные линии в среде Essential E8 Medium. В качестве подложки для культивирования использовали рекомбинантный витронектин в концентрации 10 мкг/мл. Каждый клон культивировали до достижения 80% конфлюентности и затем рассеивали на новые чашки в соотношении 1:3. Пассирование ИПСК осуществляли с помощью раствора Версена.

2.2.5. Приготовление препаратов метафазных хромосом ИПСК человека

Для приготовления препаратов метафазных хромосом в культуральную среду к ИПСК добавляли колцемид (синтетический аналог колхицина) в концентрации 0,2 мкг/мл и инкубировали 1 час. Далее среду отбирали и промывали дважды фосфатно-солевым буфером. После чего клетки снимали раствором трипсина и переносили в 15 мл пробирку для центрифугирования, смешивали со средой DMEM с 10% эмбриональной телячьей сывороткой, добавляли 5 объемов 75 мМ KCl и инкубировали 20 минут при 42°C. Далее клетки фиксировали раствором метанола и ледяной уксусной кислоты (6:1) в соотношении с объемом клеточной суспензии 1:40. Затем проводили центрифугирование на 300g при 4°C 5 минут, супернатант отбирали и добавляли холодный раствор фиксатора (метанол с ледяной уксусной кислотой в соотношении 6:1). Клетки ресуспендировали и центрифугировали при +4°C на 600g 5 минут. Супернатант отбирали и добавляли холодный раствор фиксатора (метанол с ледяной уксусной кислотой в соотношении 3:1). Затем проводили центрифугирование при +4°C на 600g 5 минут. Супернатант отбирали, оставляя 200-500 мкл жидкости. На холодные предметные стекла наносили 10-20 мкл осадка, и затем препараты высушивали при 50-60°C.

Высушенные препараты метафазных хромосом обрабатывали 0,05% раствором трипсина и затем промывали раствором фосфатно-солевого буфера. После этого инкубировали препараты в 5% растворе Гимза 5 минут, промывали водой и высушивали. Анализ окрашенных метафазных пластинок проводили под микроскопом при увеличении $\times 630$.

2.2.6. Формирование и спонтанная дифференцировка эмбрионных тел

Культуры ИПСК снимали с чашек Петри раствором Версена и переносили в виде фрагментов колоний на 24-луночные планшеты с низкой адгезией. Смену среды для культивирования эмбрионных тел проводили через день. Через 2-3 недели тела переносили на чашки Петри, покрытые 0,1% желатином, и наблюдали миграцию клеток. На 14-21 сутки образованные обширные области дифференцированных клеток окрашивали антителами на маркеры трех зародышевых листков - панцитокератина и β III-тубулина (маркер эктодермы), десмина и виментина (маркер мезодермы), α -фетопротейна (маркер энтодермы) (Hackett C. et al., 2011; Itskovitz-Eldor J. et al., 2000).

2.2.7. Дифференцировка ИПСК в нейрональном и глиальном направлениях

Для дифференцировки в нейральном направлении ИПСК обрабатывали раствором Версена, центрифугировали при 800 об/мин в течение 5 минут. Супернатант удаляли, а клеточный осадок переносили в новые чашки Петри диаметром 60 мм, покрытые матригелем. По достижении культурой 80% конфлюэнтности Essential 8 Medium меняли на среду для нейральной дифференцировки. Замена среды происходила через день. Через 10–14 дней в культуре наблюдали появление НСК или «нейральных розеток». Культуру НСК пересекали на чашки Петри в плотности 250 - 400 тысяч клеток/см² и культивировали 14 суток в среде для дифференцировки в НКП, производя замену каждые 2 суток. Для формирования глиального фенотипа НСК поэтапно культивировали в среде для дифференцировки в ГКП. Каждый этап проводили в течение трех дней, после чего по мере необходимости клетки пересекали.

Дальнейшие этапы дифференцировки производили в средах для созревания нейронов и астроглии.

2.2.8. Иммуноцитохимический анализ

Клетки фиксировали 4% раствором параформальдегида 10 минут при комнатной температуре, затем промывали и инкубировали в фосфатно-солевом буфере с 0,25% Triton X-100 и 1% бычьим сывороточным альбумином 30 минут. После чего обрабатывали первичными антителами к β III-тубулину (1:500, Abcam), GFAP (1:600, Abcam), MAP2 (1:400, Abcam), S100b (1:300, Abcam), NANOG (1:500, Cell Signaling Technology), SSEA4 (1:500, Cell Signaling Technology), OCT4 (1:500, Cell Signaling Technology), TRA-1-81 (1:500, Cell Signaling Technology), панцитокератину (1:250, Abcam), десмину (1:500, Abcam), α -фетопротейну (1:1000, Abcam), виментину (1:900, Abcam), SOX2 (1:1000, Cell Signaling Technology), Nestin (1:750, Abcam), PAX6 (1:100, Abcam), вирусу Сендай (1:750, MBL) 12 часов при +4°C. После клетки промывали фосфатно-солевым буфером и инкубировали с вторичными антителами, мечеными флуорохромами Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 555 (1:600, Invitrogen) в темноте 60 минут. Ядра окрашивали раствором DAPI 1 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере. Для анализа использовали люминесцентный инвертированный микроскоп Axio Observer.D1 с камерой AxioCam HRc (Carl Zeiss, Германия).

2.2.9. Проточная цитометрия

Клетки снимали с помощью раствора Версена в случае культур НСК и НКП и раствором 0,25% трипсина и Версена в соотношении 1:1 в случае культуры ГКП, центрифугировали 1800 об/мин в течение 5 минут, супернатант отбирали, а осадок промывали раствором Хенкса. После осаждения клетки 10 минут фиксировали 4% раствором параформальдегида, затем промывали фосфатно-солевым раствором. Пермеабелизацию проводили 70% метанолом на льду в течение 10 минут, после чего клетки промывали дважды в фосфатно-солевом растворе и осаждали центрифугированием 1800 об/мин в течение 5 минут. Далее

клетки окрашивали первичными антителами к транскрипционному фактору PAX6 (1:300, Abcam), глиальному маркеру S100b (1:400, Abcam) и нейрональному маркеру β III-тубулин (1:500, Abcam). Инкубация проходила при +4°C в течение 12 часов. Затем промывали фосфатно-солевым буфером, центрифугировали 1800 об/мин 5 минут и инкубировали с вторичными антителами, меченными флюорохромом Alexa Fluor 488, в темноте в течение 60 минут. Полученную суспензию анализировали, используя проточный цитофлюориметр CyFlow ML (Partec, Германия), а количество иммунопозитивных клеток считали с помощью программы FloMax.

2.2.10. ПЦР в режиме реального времени

Для изучения экспрессии исследуемых генов проводили ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). При исследовании экспрессии генов в тканях головного мозга крыс производили фронтальные срезы области повреждения и интактной области контрлатерального полушария и помещали в реагент «RNAlater» для стабилизации РНК в тканях. Выделение тотальной мРНК из клеточных культур или ткани головного мозга проводили с помощью коммерческого набора «RNeasy Mini Kit» согласно прилагаемой инструкции. Далее по стандартному протоколу набора RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit проводили синтез кДНК. Для проведения ПЦР в режиме реального времени использовали готовую реакционную смесь qPCRmix-HS SYBR, амплификацию ставили в термоциклере BioRad iQ cycler (BioRad, США). Схема реакции: первичная денатурация 95°C, 5 мин.; денатурация 95°C, 20 сек.; отжиг праймеров 55-63 °C, 20 сек.; элонгация 72°C, 20 секунд (40 циклов). Уровень мРНК анализируемых генов выравнивали по отношению к усредненным данным амплификации двух генов домашнего хозяйства *GAPDH* (глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа) и *ActB* (β -актин). Относительное количество мРНК рассчитывали с помощью $\Delta C(T)$ метода. Праймеры, используемые в качестве затравок были подобраны с использованием программы NCBI Primer-Blast. Праймеры к исследуемым генам приведены в Таблицах 1, 2 и 3.

Праймеры к генам человека

Название гена	Последовательность	Температура отжига, °C
<i>OCT4</i>	for CGACCATCTGCCGCTTTGAG rev CCCCCTGTCCCCCATTCCTA	61,5
<i>SOX2</i>	for TCCTGATTCCAGTTTGCCTC rev GCTTAGCCTCGTCGATGAAC	63
<i>NANOG</i>	for CAGCCCTGATTCTTCCACCAGTCCC rev TGGAAGGTTCCCAGTCGGGTTACAC	62,5
<i>PAX6</i>	for TGGGCAGGTATTACGAGACTG rev ACTCCCGCTTATACTGGGCTA	62
<i>NESTIN</i>	for GCAGCTGGCGCACCTCAAGATGTC rev GGCAAGGGTGAGGGGAGGGAAGTT	65,5
<i>GDNF</i>	for GAAAAGGTTCGGAGAGGCCAG rev AGCCGCTGCAGTACCTAAAA	63
<i>BDNF</i>	for CCAGGTGAGAAGAGTGATGACC rev CCTTGTCCTCGGATGTTTGC	62,6
<i>S100B</i>	for AGCTTTCCAGCCGTGTTGTA rev ACGGTGCACGCTTTATCACT	60,1
<i>TUBB3</i>	for GCCAGACGCGCCCAAGTATGAGG rev GGTTCGGGTTCCAGGTCCAC	62
<i>CNTF</i>	for GTAAACCCAGCTGACTTGTTCCTC rev CAGCGGTGAATGCTCTGTGA	55,5
<i>NGF</i>	for ACCCGCAACATTACTGTGGACC rev GACCTCGAAGTCCAGATCCTGA	55
<i>BAX</i>	for CCCGAGAGGTCTTTTTCCGAG rev GCAAAGTAGAAAAGGGCGACA	59
<i>BCL2</i>	for CGTCCAAGAATGCAAAGCACA rev CCCGGTTATCGTACCCTGTT	60,5
<i>GAP-43</i>	for CTCATAAGGCCGCAACCAAA rev AGTGGTGCCTTCTCCCTTCT	62,5
<i>MAP2</i>	for CTCAGCACCGCTAACAGAGG rev CATTGGCGCTTCGGACAAG	62
<i>YWHAB</i>	for TGAAGGCAGTCACAGAACAGG rev CACGGTACTCTTTGCCCATCT	57,9
<i>HSP90AA1</i>	for ACCCAGACCCAAGACCAACC rev TCAACTGGGCAATTTCTGCCTG	59,0
<i>HSPB1</i>	for TGTGGACCCCAACCAAGTTT rev ACTCGAAGGTGACTGGGATG	58,8
<i>HSPA8</i>	for CTCAGCGTCAGGCTACCAA rev TAAGCCGTAAGCAATAGCAGCA	57,2
<i>APOE</i>	for AACTGGAGGAACAACCTGACCC rev CACACGTCCTCCATGTCCG	58,5
<i>CLU</i>	for TTCTGACTCGGACGTTCTTTC rev TCCGCCACGGTCTCCATAA	57,2

<i>SERPINF1</i>	for GAGAGCCTCACCTCCGAGT rev GACTTGGTGACTTCGCCTTC	56,6
<i>HDGF</i>	for AAACGTCCCAAGGAGGCAGA rev AGGGGGTGCTATTCTTTTCCAC	58,8
<i>PTN</i>	for CTGGGGAGAATGTGACCTGAA rev TTGGGCTTGGTCAGTTTGCC	56,2
<i>MDK</i>	for ACAAGTTTGAGAACTGGGGTG rev CATTGTAGCGCGCCTTCTT	56,0
<i>MIF</i>	for CCACCTTCGCCTAAGAGCC rev ACCGTTTATTTCTCCCCACCAG	57,9
<i>GREM1</i>	for GTGACGGAGCGCAAATACCT rev GGTGATGATGGTGCGACTG	56,7
<i>GAS6</i>	for ATCCTCCTCTTTGCCGGAGG rev CGACACCGTTGTAGCGCAG	59,1
<i>GDF15</i>	for CACCTGCGTATCTCTCGGGC rev TCACGTCCCACGACCTTGAC	59,7
<i>LIF</i>	for GAGCTGTACCGCATAGTCGT rev CACAGCACGTTGCTAAGGAG	56,7
<i>MYDGF</i>	for CCACGACGGTGGCGTTTG rev CCCGGGCCCACGTTATGG	60
<i>TGFB2</i>	for ACATTGGCAAACACCCAAGA rev GTGTCTGAACTAGTACCGCCTTT	55,6
<i>TWF2</i>	for TAGAGCGGGAAACCATTGAG rev TCATGGGTGTGCTTGTAGAG	54,5
<i>SNX3</i>	for GGCAGCAGCTACAGCGAAATG rev GTCATTCAGGTCTGCGGCTT	58,0
<i>NPTX2</i>	for TTGGACAAGAGCAGGACACC rev GAGCAGTTGGCGATGTTGAC	57,0
<i>FGF8</i>	for GCTGCAGAATGCCAAGTACGA rev TCATGAAGTGGACCTCACGCT	58,1
<i>EFNB1</i>	for GTTGGGCAAGATCCCAATGC rev GGCCACTCTTCTCTTCCTGG	57,0
<i>NTN1</i>	for CTTCTCACCGACCTCAACAA rev CGAACTTCTTGCCGAGGGAC	57,6
<i>SERPINI1</i>	for TGGTAACTGCTAAAGAGAGCCA rev TGGCCACGGCTACATTTTGA	56,5
<i>VGF</i>	for TGAGCATAAAGAGCCGGTAGC rev GGAAAAGCTCTCCCTCGTCCT	58,1
<i>GAPDH</i>	for GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA rev TTCACACCCATGACGAACAT	56,6
<i>ACTB</i>	for CCTGGCACCCAGCACAAAT rev GGGCCGGACTCGTCATAC	58,2

Продолжение Таблицы 1

Праймеры для проверки элиминации вируса Сендай и трансгенов

Название гена	Последовательность	Температура отжига, °C
<i>SeV</i>	for GGATCACTAGGTGATATCGAGC rev ACCAGACAAGAGTTTAAGAGATATGTATC	55
<i>exoKOS</i>	for ATGCACCGCTACGACGTGAGCGC rev ACCTTGACAATCCTGATGTGG	55
<i>exoKlf4</i>	for TTCCTGCATGCCAGAGGAGCCC rev AATGTATCGAAGGTGCTCAA	55
<i>exoL-Мус</i>	for GAGAAGAGGATGGCTACAGAGA rev GACGTGCAACTGTGCTATCT	55

Таблица 3

Праймеры к генам крысы

Название гена	Последовательность	Температура отжига, °C
<i>Bax</i>	for TTGTGGCTGGAGTCCTCACT rev TTTCCCCGTTCCCCATTCATC	63
<i>Bcl2</i>	for GGGGCTACGAGTGGGATACT rev GACGGTAGCGACGAGAGAAG	62,5
<i>Tnfa</i>	for CCACCACGCTCTTCTGTCTA rev GCTACGGGCTTGTCACTCG	60,1
<i>Gap43</i>	for AAGGATGATGCTCCCGTTGC rev CGGCCTTTTCTCTGAAGGG	58,2
<i>Gapdh</i>	for GAGATTACTGCCCTGGCTCC rev GCTCAGTAACAGTCCGCCTA	56,6
<i>Actb</i>	for GCGAGATCCCGCTAACATCA rev CCCTTCCACGATGCCAAAGT	55
<i>Vegfa</i>	for GGCCTCTGAAACCATGAACT rev TGCTCCCCTTCTGTCTGTG	55,2
<i>Mmp9</i>	for ATGGTTTCTGCCCCAGTGAG rev CACCAGCGATAACCATCCGA	61,2
<i>Il1b</i>	for CTGTCTGACCCATGTGAGCT rev ACTCCACTTTGGTCTTGACTT	57,5
<i>Il4</i>	for ATGTAACGACAGCCCTCTGA rev AGCACGGAGGTACATCACG	56,6
<i>Il6</i>	for TACATATGTTCTCAGGGAGAT rev GGTAAGAACGGAAGTCCAG	54,5
<i>Il10</i>	for GCCCAGAAATCAAGGAGCAT rev TGAGTGTCACGTAGGCTTCTA	58,5
<i>Il13</i>	for CCAGAAGACTTCCCTGTGCA rev CCCTCAGTGGCCATAGCG	62,3

<i>Erk1</i>	forCTACACGCAGCTGCAGTACATC rev GTGCGCTGACAGTAGGTTTGA	55,2
<i>Erk2</i>	forGCGTTGGTACAGAGCTCCAGAA rev TGCAGCCCACAGACCAAATATC	54,2

Продолжение Таблицы 3

2.2.11. Получение кондиционированных сред на основе нейрональных и глиальных клеток-предшественников

Для получения КС культуры НКП и ГКП дважды промывали фосфатно-солевым буфером и культивировали в среде DMEM/F12 (1:1) 12 часов, которую затем центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 минут. Супернатант отбирали и стерилизовали, пропуская через фильтр 0,22 мкм.

2.2.12. Иммуноферментный анализ

Для исследования секреции нейротрофинов GDNF, BDNF, NGF и CNTF в КС-НКП и КС-ГКП был проведен иммуноферментный анализ в соответствии с инструкцией производителя (RnD systems, США). Перед анализом КС концентрировали в 24 раза с помощью 3 кДа мембран Amicon Ultra до конечной концентрации по общему белку 0,5 мг/мл. Оптическую плотность измеряли, используя планшетный ридер (PerkinElmer, США) при длине поглощения 450 нм.

2.2.13. Выделение мозжечковых нейронов

У 6-8 дневных крысят аутбредного стока Вистар производили декапитацию в соответствии с этическими требованиями по работе с животными (протокол № 20). Извлеченный мозжечок 2-3 раза промывали в растворе Хенкса с 10% добавлением раствора HEPES, измельчали и переносили в предварительно нагретый до 37°C 0,05% раствор трипсина с 0,02% этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА). После 15 минутной инкубации клеточную суспензию дважды промывали раствором Хенкса. Клетки диспергировали до получения однородной суспензии, которую центрифугировали 2,5 мин при 3000 об/мин. Клеточный осадок ресуспендировали в среде для культивирования мозжечковых нейронов, затем переносили в 12-луночные планшеты, предварительно покрытые поли-DL-

лизином в концентрации 10 мкг/мл. Культуру мозжечковых нейронов инкубировали в течение 6-7 дней (37°C и 5% CO₂, при относительной влажности 98%) для достаточной экспрессии глутаматных рецепторов. На 2 сутки культивирования в среду добавляли 10 мкМ арабинозинмоноцитозид для предупреждения пролиферации митотически активных клеток (Bilimoria P.M., Bonni A., 2008; Krämer D., Minichiello L., 2010).

2.2.14. Культивирование и дифференцировка линии SH-SY5Y

Клетки нейробластомы SH-SY5Y культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% сыворотки. За неделю до эксперимента клетки пересевали в 12-луночные планшеты, покрытые раствором коллагена I типа в количестве 90 тысяч клеток на лунку. Дифференцировка происходила в два этапа в течение недели. Первый этап проходил несколько дней в среде с пониженным содержанием сыворотки с добавлением 10 мМ ретиноевой кислоты для замедления пролиферативных процессов. Остальные 4 дня клетки инкубировали в среде с добавлением 50 нг/мл нейротрофического фактора BDNF для активного роста нейритов. За 72 часа до моделирования гипоксии из среды убрали BDNF (Constantinescu R. et al., 2007; Presgraves S.P. et al., 2003; Shipley M.M. et al., 2016).

2.2.15. Моделирование глутаматной эксайтотоксичности

Для моделирования глутаматной эксайтотоксичности культуру мозжечковых нейронов промывали раствором DPBS без Ca²⁺ и Mg²⁺. Далее клетки инкубировали 1 час в присутствии глутамата (200 мкМ) в буферном растворе следующего состава (мМ): NaCl – 140, KCl – 5, CaCl₂ – 2, глицин – 10, HEPES – 20, глюкоза – 5 (pH 7.4). После чего дважды промывали в буфере, содержащем (мМ): NaCl – 140, KCl – 5, MgCl₂ – 2, HEPES – 20, глюкоза – 5 (pH 7.4) и возвращали исходную культуральную среду. Для исследования паракринного действия НКП и ГКП за сутки до последующего моделирования глутаматной эксайтотоксичности (Glu) проводили сокультивирование в системе Transwell с мозжечковыми нейронами. Количество клеток в одной вставки Transwell

составляло 200 тысяч. Исследуемые КС вносили за сутки до последующего добавления глутамата в конечной концентрации общего белка 5 мкг/мл. При длительном культивировании (7 суток) добавку КС осуществляли через сутки (Savinkova I.G. et al., 2013).

2.2.16. Моделирование гипоксии

В работе использовалась модель химической гипоксии, которая является адекватной и взаимозаменяемой с моделью на основе применения газовой инкубационной камеры с пониженным содержанием кислорода (Calvo-Anguiano G. et al., 2018). Для моделирования гипоксии был проведен дозозависимый эксперимент с подбором концентрации дихлорида кобальта (CoCl_2) в ранге от 150 до 300 мкМ. Клетки нейробластомы SH-SY5Y инкубировали с CoCl_2 в течение 4 часов, после чего промывали раствором Хенкса и добавляли среду для культивирования. Для изучения паракринного механизма действия после моделирования гипоксии производили сокультивирование с НКП или ГКП в количестве 200 тысяч клеток на одну вставку Transwell, а также инкубацию с их КС в конечной концентрации общего белка 5 мкг/мл. При длительном культивировании (7 суток) добавку КС осуществляли через сутки.

2.2.17. Оценка гибели клеток

Гибель мозжечковых нейронов/клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y в культуре определяли через сутки после действия глутамата/дихлорида кобальта. Жизнеспособность оценивали с помощью морфометрического анализа и двух колориметрических методов: МТТ- и ЛДГ (лактатдегидрогеназа) - тестов. МТТ (3-[4,5диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенил-тетразолийбромид) добавляли в культуральную среду до конечной концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали при 37°C в течение 2 часов с последующим растворением кристаллов формазана диметилсульфоксидом. Оптическую плотность измеряли спектрофотометрически при 570/620 нм на планшетном ридере (PerkinElmer, США). Оценивали результаты по отношению к контролю, который принимали за 100%. Активность

фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ) определяли с помощью коммерческого набора «Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit» согласно прилагаемой инструкции. Анализ основан на превращении лактата в пируват в присутствии ЛДГ с параллельным восстановлением НАД. Образование НАДН из выше указанной реакции приводит к изменению оптической плотности при 450 нм. Процент высвобождения ЛДГ из клеток определяли по формуле: активность ЛДГ в супернатанте/(активность ЛДГ в супернатанте + активность ЛДГ в клеточном лизате) (Nishihara T. et al., 1993).

Морфометрическая оценка гибели нейронов включала исследование ядерной фрагментации (апоптоза) с помощью прижизненного окрашивания в течение 30 минут флуоресцентным красителем Hoechst 33342 в концентрации 5 мкг/мл и витальным красителем 0,5 мкМ Calcein-AM (процент живых клеток). Количество некротических нейронов оценивали с использованием 1 мкг/мл йодида пропидия (IP) при 10 минутной инкубации, который окрашивает клетки с нарушенной плазматической мембраной. Для анализа использовали люминесцентный инвертированный микроскоп Axio Observer.D1 с камерой AxioCam HRc (Carl Zeiss, Германия). Для каждого образца снимали по 8-10 случайным образом выбранных полей, которые в дальнейшем подвергали морфометрическому анализу. Процент апоптотических и некротических клеток рассчитывали исходя из общего числа клеток в соответствующей лунке (образце). Средние значения получали из данных анализа трех-четырех образцов.

2.2.18. Оценка роста нейритов

Активность процесса образования нейритов оценивали по морфологии клеток с применением иммуноцитохимического окрашивания антителами к β III-тубулину/MAP2 или рассчитывали среднее значение площади клетки – для этого определяли общую площадь клеток, окрашенных антителами к β III-тубулину, и делили на общее количество ядер, меченных красителем DAPI. Измерения проводили с использованием программы ImageJ (Национальный институт психического здоровья, США), используя параметры цветового диапазона (Tsai

М.Ж. et al., 2014). Оценку роста аксонов и дендритов также проводили по показателям экспрессии генов-маркеров нейритогенеза MAP2 и GAP43, выявляемые методом ПЦР в режиме реального времени.

2.2.19. Процедура протеомного анализа

2.2.19.1. Измерение концентрации белка

Для измерения концентрации общего белка в качестве стандарта использовали водный раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) в концентрации 0.5, 1, 2, 5, 10, 25, 50 мкг/мкл. К 30 мкл стандартных растворов БСА и экспериментальных образцов добавляли 1 мл реагента, содержащего 1% водный раствор натриевой соли бицинхониновой кислоты, 2 % Na_2CO_3 , 0,16% тартрата натрия, 0,4% NaOH и 0,95% NaHCO_3 , 20 мкл 4% водного раствора CuSO_4 . Далее растворы перемешивали и инкубировали при 56°C в течение 20 мин на термощейкере Termomixer comfort (Eppendorf, Germany). Построение калибровочной кривой по стандартным растворам альбумина и измерение концентрации общего белка в экспериментальных образцах проводили при помощи бескуветного спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) при длине волны 562 нм в 3-кратной повторности.

2.2.19.2. Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Денатурирующий одномерный электрофорез проводили в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) с концентрацией полиакриламида 12% в разделяющем геле и 5% в концентрирующем геле (Laemmli 1970; Naryzhny, Desouza et al. 2006). Для формирования карманов для образцов использовали гребенки с шириной зубцов 5 мм. Анализируемые образцы помещали в буфер (2% додецилсульфат лития, 0.065М Трис, 1% дитиотреитола, 10% глицерин, 0.01% бромфенол голубой) и прогревали на кипящей водяной бане 2 минуты. В качестве маркера использовали Precision Plus Protein Standards (BioRad) - 1 мкл. На дорожку наносился максимальный объем – 40 мкл (32 мкл образца и 8 мкл буфера). Электрофоретическое разделение (SDS-PAGE) белков образца

проводили с использованием системы Hoefer miniVE (размер геля 80×90×1 мм). Гели окрашивали с помощью Кумасси R350 в течение 2 часов.

2.2.19.3. Гидролиз трипсином в геле

Проведение гидролиза белка в геле проводили по следующему протоколу. Отмывку проводили, используя буфер (50 мМ NH_4HCO_3 в 50 % ацетонитриле) 3 раза по 15 мин на термостате-шейкере при 37°C. После удаляли остатки отмывочного буфера. Затем осуществляли дегидратацию, добавляя в пробирку 150 мкл ацетонитрила (100%). Отбирали ацетонитрил из пробирки через 15 мин. Для проведения гидролиза к высушенному кусочку геля добавляли 15 мкл трипсина при соотношении трипсина к белку 1:50, так чтобы раствор трипсина полностью покрывал кусок геля. Реакцию проводили в течение ночи в термостате при 37°C. Реакцию останавливали, добавляя 0,5% муравьиную кислоту с последующей экстракцией в 70% ацетонитриле и 0,1% муравьиной кислотой. Отбор супернатанта проводили в стеклянную вials с последующей сушкой в роторном испарителе (SpeedVac) при 45°C в течение 1 часа. Перед масс-спектрометрическим анализом образцы перерастворяли в 20 мкл 0,1% муравьиной кислоты.

2.2.19.4 Масс-спектрометрический анализ

Протеомный анализ пептидов осуществляли с использованием хроматографической ВЭЖХ системы Ultimate 3000 RSLCnano (Thermo Scientific, США) соединенной с масс-спектрометром Q-exactive HF (Thermo Scientific, США). Один микрограмм пептидной смеси загружали на обогащающую колонку Acclaim μ -Precolumn (0,5 мм х 3 мм, размер частиц 5 мкм, Thermo Scientific) при потоке 10 мкл/мин в течение 4 мин в изографическом режиме с использованием буферного раствора (2% ацетонитрил, 0,1% муравьиной кислоты в деионизованной воде) в качестве подвижной фазы. Далее пептиды разделяли на ВЭЖХ колонке Acclaim Permap® C18 (75 мкм х 150 мм, 2 мкм размер частиц) (Thermo Scientific, США) в градиентном режиме элюирования. Градиент

формировали подвижной фазой А (0,1% муравьиной кислоты) и подвижной фазой Б: (80% ацетонитрил, 0,1% водный раствор муравьиной кислоты) при скорости потока 0,3 мкл/мин. Колонку промывали 2% подвижной фазой Б в течение 4 мин, после чего линейно увеличивали концентрацию подвижной фазы Б до 35% за 45 мин, затем линейно увеличивали концентрацию фазы Б до 99% за 5 мин. После 10 минутной промывки 99% буфером Б, концентрацию линейно снижали до исходных 2% за 6 мин.

Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре Q-exactive HF в режиме положительной ионизации с использованием источника NESI (Thermo Scientific, США). Для масс-спектрометрического анализа были установлены следующие параметры настроек: напряжение на эмиттере 2.1 кВ, температура капилляра 240°C. Панорамное сканирование проводили в диапазоне масс от 300 m/z до 1500 m/z , при разрешении 120,000. При тандемном сканировании разрешение устанавливали 15000 в диапазоне масс от 100 m/z до верхней границы, которая определяется автоматически исходя из массы прекурсора, но не более 2000 m/z . Изоляцию прекурсорных ионов проводили в окне ± 1 Да. Максимальное число разрешённых для изоляции ионов в режиме MS2 было установлено не более 40, при этом граница отсечения для выбора прекурсора для тандемного анализа была установлена 50000 единиц, а нормализованная энергия соударения (NCE) равнялась 29. Для тандемного сканирования учитывали только ионы от $z = 2+$ до $z = 6+$ по зарядному состоянию. Максимальное время накопления для прекурсорных ионов составило 50 мс, для фрагментных ионов 110 мс. Величину AGC для прекурсоров и фрагментных ионов устанавливали $1 \cdot 10^6$ и $2 \cdot 10^5$, соответственно. Все измеренные прекурсоры динамически исключались из тандемного MS/MS анализа на 90 с.

Идентификацию белков по полученным масс-спектрам проводили при помощи программы SearchGUI v.3.3.16 с использованием трех поисковых алгоритмов X!Tandem, OMSSA и MS-GF+ (Vaudel M. et al., 2011). Для идентификации белков использовали базу данных Uniprot с ограничением по

видовой принадлежности организма исследуемых образцов - Human. Были заданы следующие поисковые параметры: расщепляющий фермент - трипсин, точность определения масс моноизотопных пептидов ± 5 ppm, точность определения масс в спектрах MS/MS $\pm 0,01$ Да и возможность пропуска одного сайта расщепления трипсином. Окисление метионинов и модификация цистеина пропионамидом были учтены как возможные модификации пептидов. Для валидации сопоставлений (образования пар) спектров и пептидов PSM (Peptide-Spectrum Matches), идентификации пептидов и белков использовали величину FDR (False Discovery Rate) не более 1,0%. Белки рассматривались в качестве достоверно идентифицированных, если для них было обнаружено, по крайней мере, два пептида, прошедших валидацию. Безметковая количественная оценка содержания белков в вырезанных полосках происходила на основе эмпирического показателя NSAF⁺, рассчитываемого в PeptideShaker с учетом относительной нормализации.

2.2.20. Лабораторные животные

Эксперимент проводился на взрослых самцах крыс аутбредного стока Вистар весом 250-300г. Источник получения крыс – ООО «АльКонди», Москва, Российская Федерация. Все манипуляции с животными были одобрены этическим комитетом Научно-исследовательского института морфологии человека (протокол № 20) и проведены в соответствии с директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза. Всем животным (n=36) производилось моделирование экспериментального инфаркта мозга, после чего крысы были рандомизированы на 3 экспериментальные группы: группу контроля (животные с внутриартериальным введением DMEM/F12), (n=12); группы с внутриартериальным введением КС-ГКП (n=12) и КС-НКП (n=12). Терапевтические эффекты оценивали по следующим параметрам: выживаемость, неврологический дефицит и объем очага инфаркта непосредственно перед инъекцией и на 7-й, 14-й и 30-й день после введения. В конце эксперимента животных выводили из эксперимента путем внутрибрюшинного введения смертельной дозы хлоралгидрата (1 г/кг).

2.2.21. Моделирование экспериментального инфаркта мозга

Для воспроизведения экспериментального инфаркта головного мозга у крыс использовали модель эндоваскулярной окклюзии средней мозговой артерии монофиламентом по методу Коидзуми (Koizumi J., 1986) в модификации Лонга (Longa E.Z., 1989). Все оперативные вмешательства проводили под ингаляционной анестезией изофлюраном на воздушной смеси в концентрации 3% при введении и 1,5-2,5% при поддержании наркоза. Местно в области операционной раны производили обкалывание 1-2% раствором ропивакаина. Непосредственно перед операцией проводили премедикацию 0,01 мл атропина сульфатом внутривенно, чтобы нивелировать вагальные рефлексы.

После сбривания шерсти и дезинфекции кожных покровов раствором 70% этанола производили разрез кожи длиной 10-12 мм в области передней поверхности шеи по срединной линии. Тупым способом раздвигали мышцы шеи и другие мягкие ткани до выделения бифуркации правой общей сонной артерии (ОСА). В операционную рану устанавливали ретрактор. Ствол ОСА, область бифуркации, начальные отделы внутренней (ВСА) и наружной сонных артерий (НСА) отделяли тупым способом от подлежащих тканей и блуждающего нерва. Ствол блуждающего нерва обрабатывали 0.1-0.2 мл 0.5% раствором бупивакаина для дополнительного обезболивания и предотвращения острого респираторного дистресс синдрома. Затем накладывали сосудистые клипсы на ОСА проксимальнее бифуркации на 5-7 мм, на ВСА непосредственно у бифуркации. Также накладывали две шелковые лигатуры на НСА дистальнее бифуркации на расстоянии 4-5 мм. Затем перевязывали крылонебную артерию для предотвращения ошибочной установки филамента. Коагулировали мелкие ветви НСА (верхняя щитовидная артерия и затылочная артерия), затем между двумя лигатурами ствол НСА рассекали. Дистальный отрезок НСА коагулировали для избежания кровотечения. Через проксимальный отрезок в просвет ВСА вводили нейлоновый монофиламент с силиконовым наконечником (Doccol corporation, диаметр 0.19 мм, длина 30 мм; диаметр с покрытием 0.37 $\pm$ 0.02 мм; длина покрытия 3-4 мм). По ходу продвижения монофиламента снимали клипсу с ВСА.

При ощущении сопротивления (место отхождения средней мозговой артерии от ВСА) продвижение монофиломанта прекращали, производили замер свободного конца филамента (10-12 мм) и затягивали лигатуру на проксимальном отрезке НСА. С этого момента производили отсчет длительности ишемии, которая ограничивалась 90 минутами. Затем снимали клипсу с ОСА, производили контроль гемостаза, операционную рану ушивали прерывистым узловым швом. Затем животных помещали в МРТ томограф для контроля положения филамента и выявления осложнений операции. При обнаружении неполной окклюзии места отхождения средней мозговой артерии, операционное поле вновь открывали и производили коррекцию положения филамента с последующим повторным контролем МРТ. При выявлении геморрагических осложнений животных исключали из эксперимента. Далее животных помещали в клетку с подогреваемым дном для восстановления после наркоза до момента окончания периода окклюзии, где животное выходило из-под действия анестезии. За 5 минут до окончания срока окклюзии животных вновь вводили в наркоз. Операционное поле обрабатывали антисептиком, снимали швы. Вышеописанным способом снова обнажали бифуркацию ОСА. После наложения клипсы на ОСА извлекали филамент. Лигатуру на проксимальном конце НСА снова затягивали и коагулировали. После удаления клипсы производили контроль гемостаза, и рану ушивали прерывистым узловым швом. Кожные покровы обрабатывали антибактериальными средствами. Внутривентриально вводили 2 мл физиологического раствора во избежание гиповолемии в первые часы после операции, когда подвижность животного будет ограничена ввиду тяжести состояния. Внутримышечно вводили 0.2 мл гентамицина с целью профилактики инфицирования места хирургического вмешательства. Животных помещали в подогретую клетку для выхода из наркозного состояния.

2.2.22. Внутриаартериальное введение кондиционированных сред

Внутриаартериальное введение КС выполняли через 24 часа после ОСМА. Операцию проводили под ингаляционной анестезией изофлураном.

Операционную рану вновь вскрывали. Правую (одноименная зоне инфаркта мозга) ОСА, НСА и ВСА отделяли от окружающей фиброзной ткани и мышц. Через культю НСА вводили полиуретановый микрокатетер (Docol corporation, наружный диаметр 0,635 мм, внутренний диаметр 0,305 мм) во ВСА с поддержанием кровотока. Катетер заводили до места вхождения ВСА в полость черепа, после чего клипсу с ОСА снимали для обеспечения поддержания кровотока по ВСА во время введения. Затем катетер подсоединяли к шприцу объемом 1 мл, помещенному в микроинжектор, и вводили 1 мл КС-ГКП/КС-НКП или DMEM/F12. Шприц помещали в микроинжектор для обеспечения плавного введения суспензии со скоростью 100 мкл/мин. После окончания введения на ОСА вновь накладывали клипсу, катетер извлекали, лигатуру вокруг «пенька» НСА туго затягивали. Рану вновь ушивали прерывистым узловым швом.

2.2.23. Магнитно-резонансная томография

Исследование проводилось с использованием магнитно-резонансного томографа для мелких животных 7T ClinScan (Bruker BioSpin, США). Магнитно-резонансную томографию (МРТ) проводили для контроля положения монофиламента, кровотока в интракраниальных сосудах и геморрагического осложнения. Были получены изображения T2-взвешенной визуализации (T2-ВИ) в аксиальной плоскости для оценки ударного объема до инъекции и на 7-й, 14-й и 30-й день после терапии. Объем очага инфаркта мозга в динамике измеряли с использованием программного пакета ImageJ (Национальный институт психического здоровья, США). Объем зоны инфаркта (по T2-взвешенным изображениям) рассчитывали по формуле $V = (S_1 + \dots + S_n) \cdot (h + d)$, где S_1 — площадь первого среза, S_n — площадь среза n , (мм^2), h — толщина среза (мм); d — межсрезовой промежуток (мм).

2.2.24. Оценка терапевтической эффективности

Терапевтические эффекты оценивали с использованием результатов по выживаемости животных, изменению объема очага инфаркта и неврологического

дефицита с применением стандартной шкалы для оценки тяжести инсульта mNSS для грызунов (Si D. et al., 2014). Данная шкала включает оценку моторных нарушений (степень пареза, мышечный тонус и экстрапирамидные расстройства), чувствительности (поверхностную и глубокую), рефлексов и координации движений.

Таблица 4

Начисление баллов по шкале mNSS для крыс.

Подвешивание крысы за хвост (норма = 0, максимум = 3)	(3)
Сгибание передней лапы	1
Сгибание задней лапы	1
Сгибание головы более чем на 10° в течение 30 сек. (по вертикальной оси)	1
Размещение крысы на полу (норма = 0, максимум = 3)	(3)
Нормальное передвижение	0
Не может идти прямо	1
Крутится в сторону парализованной стороны тела	2
Падает на бок в сторону парализованной половины тела	3
Сенсорный тест (норма = 0, максимум = 2)	(2)
Тест «размещение» под зрительным и тактильным контролем	1
Проприоцептивный тест	1
Баланс на перекладине (норма = 0, максимум = 6)	(6)
Устойчиво балансирует	0

Хватает стороны перекладины	1
Хватает перекладину и падает 1 лапа	2
Хватает перекладину и падает 2 лапы или крутится >60 сек.	3
Пытается балансировать, но падает через >40 сек.	4
Пытается балансировать, но падает через >20 сек.	5
Сразу падает без попытки балансирования <20 сек.	6
Отсутствие рефлексов или аномальная двигательная активность (норма = 0, максимум = 4)	(4)
Ушной рефлекс	1
Корнеальный рефлекс	1
Стартл-рефлекс	1
Судороги, дистония, миоклонус	1
Максимальный балл	18

Продолжение Таблицы 4

2.2.25. Гистологическое исследование

Животных выводили из эксперимента с помощью летальной дозы хлоралгидрата (1 г/кг) через 4 недели после начала эксперимента. Мозг извлекали, оба полушария разделяли на 3 части путем разреза во фронтальной плоскости таким образом, чтобы в каждой части оказывался участок с повреждением. Одну часть помещали в 10% формалин для изготовления парафиновых срезов, вторую - в жидкий азот для изготовления криосрезов, третью – в пробирку с «RNAlater» для ПЦР-РВ. Ткани заключали в парафин по стандартной методике, далее изготавливали срезы толщиной 5-7 мкм, переносили на предметные стекла, обработанные желатином, и высушивали в термостате при 37°C в течение суток.

После проводили депарафинизацию в растворе ксилола и градиенте спиртов (100°-70°). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Патогистологическое исследование полученных срезов проводили на световом микроскопе Axio Observer.D1 с камерой AxioCam HRc (Carl Zeiss, Германия).

2.2.26. Иммуногистохимическое исследование

После криофиксации тканей в жидком азоте готовили криостатные срезы толщиной 4-5 мкм. Подготовленные образцы инкубировали в фосфатно-солевом буфере с 0,3% Тритоном X-100 и 2% бычьим сывороточным альбумином в течение часа, а затем обрабатывали первичными антителами к CD68 (1:100, Abcam) и CD206 (1:100, Abcam) ночь при +4°C. После криосрезы отмывали от первых антител и добавляли вторичные антитела, меченные флуорохромами Alexa Fluor 488 (1:600), Alexa Fluor 555 (1:600) и инкубировали в темноте 60 минут. Ядра окрашивали раствором DAPI 1 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере. Для анализа использовали люминесцентный инвертированный микроскоп Axio Observer.D1 с камерой AxioCam HRc (Carl Zeiss, Германия). Общее количество CD68⁺ и CD206⁺ - клеток оценивали на площади 1 мм² среза ишемизированной зоны головного мозга с помощью программы ImageJ (Национальный институт психического здоровья, США) путем подсчета количества положительно окрашенных клеток в поле зрения при увеличении x200.

2.2.27. Оценка ангиогенеза

Образование новых кровеносных сосудов в области повреждения мозга анализировали на гистологических срезах, окрашенных гематоксилином и эозином при увеличении x400 в программе ImageJ (Национальный институт психического здоровья, США). Кровеносные сосуды идентифицировали как полые структуры, частично или полностью заполненные эритроцитами. Оценивали общее количество и объемную плотность сосудов на площади 1 мм² среза (доля общей площади сосудов к 1 мм² среза).

2.2.28. Статистический анализ

Статистическую обработку данных выполняли в программе SigmaPlot 12.5. Для анализа использовали данные 3-5 независимых экспериментов. Данные представлены в виде средних значений и стандартных отклонений (стандартных ошибок среднего) или медиан и перцентилей. Статистический анализ данных при нормальном распределении проводили с помощью t-теста для парных сравнений и теста Хольма-Сидака для множественных сравнений и при распределении, отличного от нормального - с помощью теста Манна-Уитни для парных сравнений и теста Данна для множественных сравнений. Для множественных сравнений в случае нормального распределения данных использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA), при отличном от нормального распределения данных использовали ранговый дисперсионный анализ (ANOVA on ranks). Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Получение и характеристика нейрональных и глиальных клеток-предшественников путем направленной дифференцировки ИПСК

3.1.1. Отбор и характеристика полученных линий ИПСК

На протяжении двух недель после репрограммирования морфология фибробластов изменялась, что свидетельствовало об инфицировании клеток вирусом Сендай и начале трансформации. Через три недели после инфекции начали образовываться колонии клеток, схожие по морфологии с колониями ЭСК человека (Hoffman L.M., Carpenter M.K., 2005). Визуально клетки имели большое соотношение размеров ядро-цитоплазма. В основном колонии имели ровные края и плотные контакты между клетками (Рисунок 4), однако наблюдали присутствие колоний неправильной формы (угловатые или звездчатые), в которых отсутствовали плотные контакты. В результате морфологического отбора колоний было выбрано 6 клонов, которые культивировали как самостоятельные линии, однако некоторые из них имели способность при пассировании спонтанно дифференцироваться. Морфологические особенности линий IPS1.1S, IPS1.2S, IPS1.3S не изменялись во время культивирования. После 8-12 пассажей происходила элиминация вируса Сендай и трансгенных векторов репрограммирования, наблюдаемая иммуноцитохимическим методом и с помощью ПЦР-анализа с использованием трансген - специфических праймеров согласно инструкции CTS™ CytoTune™ 2.1 Sendai (Рисунок 5).

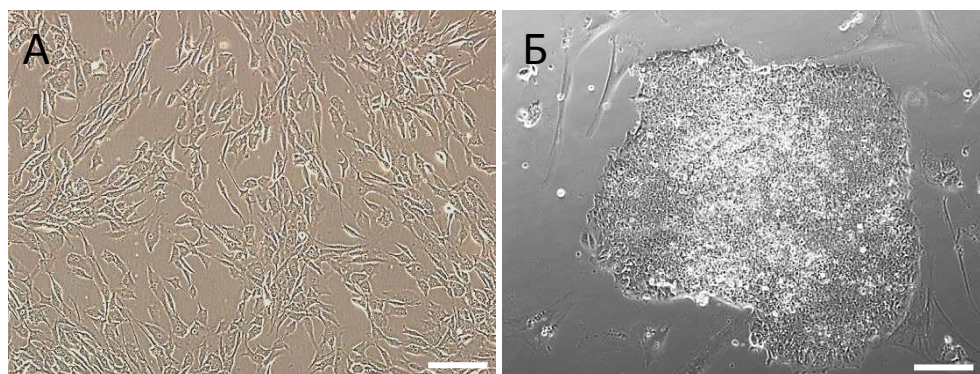


Рисунок 4. Морфология клеток в период репрограммирования. А-морфология фибробластов через 24 часа после трансдукции. Б-морфология клеток на 15 сутки репрограммирования. Фазово-контрастная микроскопия. Масштабный отрезок 100 мкм.

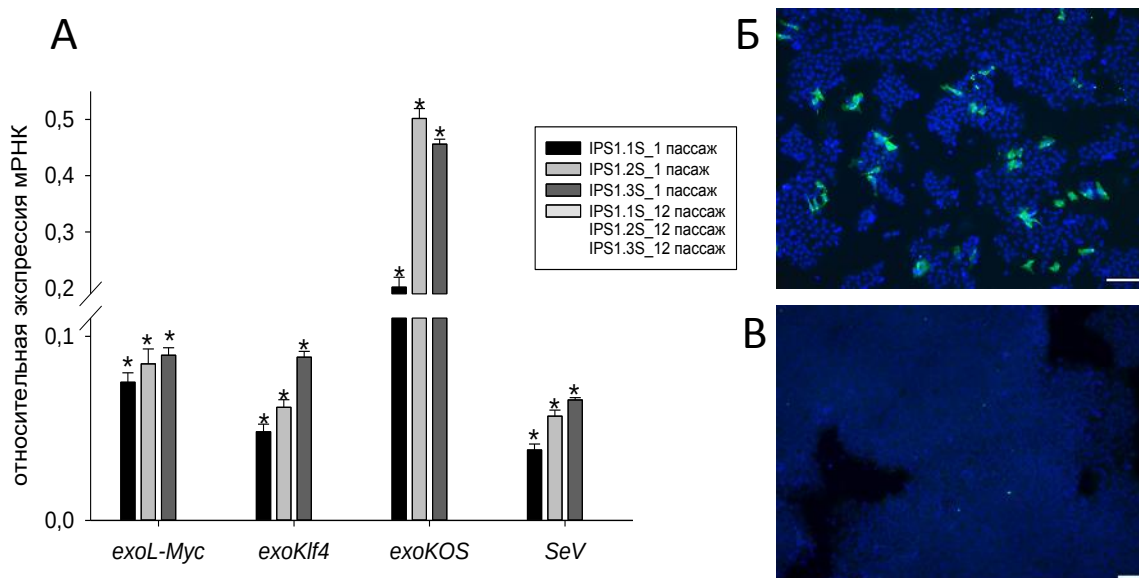


Рисунок 5. Оценка замолкания трангенов и элиминации вируса Сендай. А – экспрессия трангенов *exoL-Myc*, *exoKlf4*, *exoKOS* и гена *SeV* линий IPS1.1S, IPS1.2S, IPS1.3S на 1 и 12 пассажах, оцененное методом ПЦР-РВ. * $p \leq 0,05$ достоверность различий при сравнении с линиями ИПСК на 12 пассаже. Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение. Б, В – элиминация вируса Сендай, выявленное методом иммуноцитохимического окрашивания ИПСК (приведено для IPS1.1S) антителами к вирусу Сендай (зеленый) на 1 (Б) и 12 (В) пассажах. Ядра окрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок 100 мкм.

Помимо линий IPS1.1S, IPS1.2S, IPS1.3S, в работе была использована линия IPSRG2L, полученная методом лентивирусной трансдукции. Линия IPSRG2L была любезно предоставлена Лагарьковой М.А. и получена в лаборатории клеточной биологии Федерального научно-клинического центра физико-

химической медицины ФМБА. В данной культуре ИПСК также не наблюдали экспрессию трансгенов *C-Мус*, *Klf4*, *Oct4*, *Sox2*, при этом экспрессия данных транскрипционных факторов происходила с генома линии IPSRG2L (Лебедева О.С., 2016). Все линии ИПСК морфологически были сходны с ЭСК человека, и полученные кариогаммы демонстрировали нормальный диплоидный набор хромосом 46 XY (Рисунок 6)

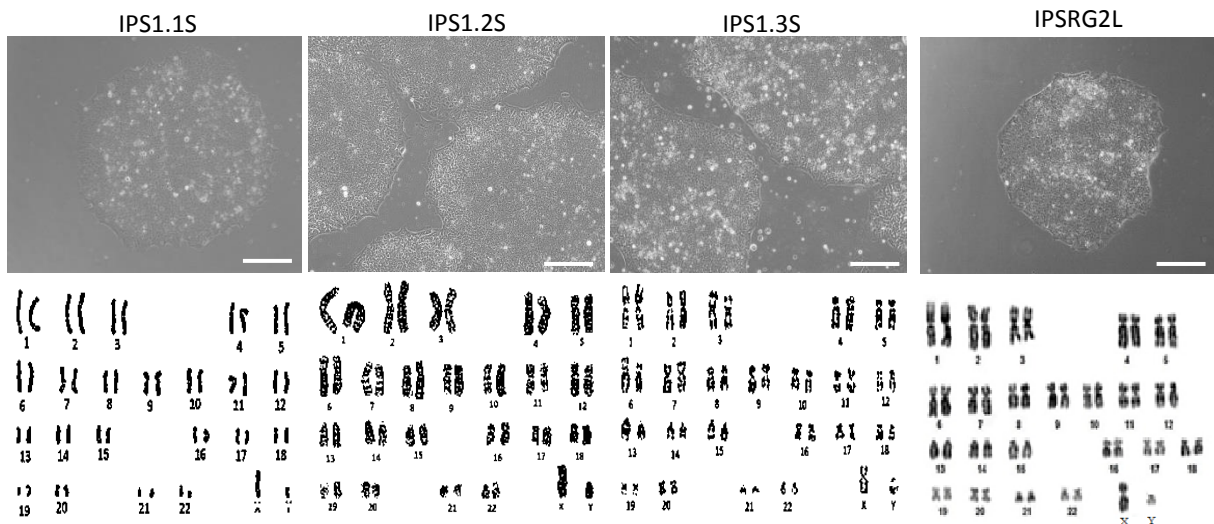


Рисунок 6. Морфология линий ИПСК человека, полученных разными методами, и их кариогаммы. Сверху представлены микрофотографии линий ИПСК. Фазово-контрастная микроскопия. Масштабный отрезок 200 мкм. Снизу - кариогаммы линий ИПСК. IPSRG2L – линия ИПСК, полученная из материала здорового доноров с помощью лентивирусной инфекции; IPS1.1S, IPS1.2S и IPS1.3S - линии ИПСК, полученные из материала здорового донора с помощью трансдукции вирусом Сендай.

Все линии IPS1.1S, IPS1.2S, IPS1.3S и IPSRG2L подтвердили свой плюрипотентный статус посредством экспрессии генов *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* и по наличию поверхностных маркеров SSEA4, TRA-1-81 и транскрипционных факторов OCT4, NANOG (Рисунки 7, 8).

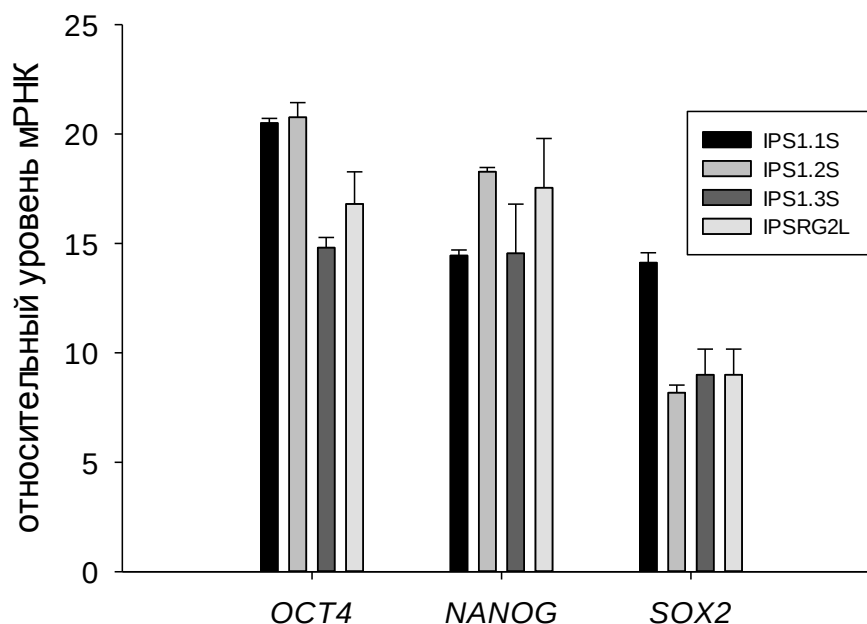


Рисунок 7. Экспрессия генов *OCT4*, *NANOG*, *SOX2*, характерных для плюрипотентного состояния, в линиях ИПСК (относительно группы контроля – культуры фибробластов). ПЦР-РВ. Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

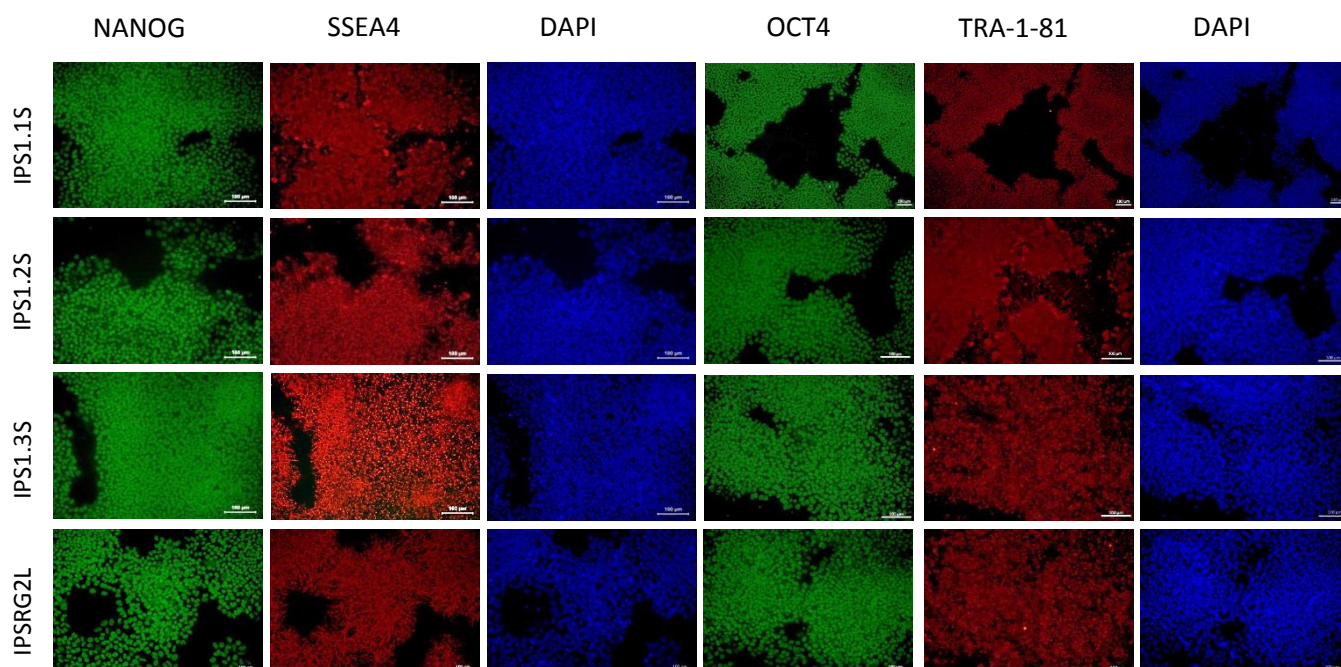


Рисунок 8. Иммуноцитохимический анализ маркеров плюрипотентности *NANOG*, *OCT4*, *TRA-1-81* и *SSEA4* в линиях ИПСК, полученных интеграционным и неинтеграционным методами. Ядра окрашены DAPI. Масштабный отрезок 100 мкм.

Для подтверждения плюрипотентного статуса линий ИПСК на функциональном уровне был проведен тест на формирование культурами эмбрионидных телец и дальнейшей их дифференцировки в производные трех зародышевых листков. Через 24 часа после пересева ИПСК на пластик с низкой адгезией наблюдали образовавшиеся эмбрионидные тельца разного размера (Рисунок 9А). После двух недель культивирования в среде, содержащей 20% сыворотки, суспензионная культура была переведена в адгезионную форму. Через 10-14 дней адгезионную культуру фиксировали и проводили иммуноцитохимический анализ с использованием антител к маркерам трех зародышевых листков (Рисунок 9Б). В результате спонтанной дифференцировки в культурах наблюдали клетки, положительно окрашенные на маркеры эктодермы (панцитокератин, β -III-тубулин), мезодермы (десмин, виментин) и энтодермы (α -фетопротеин).

Таким образом, линии ИПСК, полученные интеграционным и неинтеграционным методами, имели схожую морфологию и нормальный кариотип. Все линии подтвердили свой плюрипотентный статус посредством экспрессии генов *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* и по наличию поверхностных маркеров SSEA4, TRA-1-81 и транскрипционных факторов *OCT4*, *NANOG*; а также способности спонтанно дифференцироваться в производные трех зародышевых листков, что подтверждает их плюрипотентность на функциональном уровне.

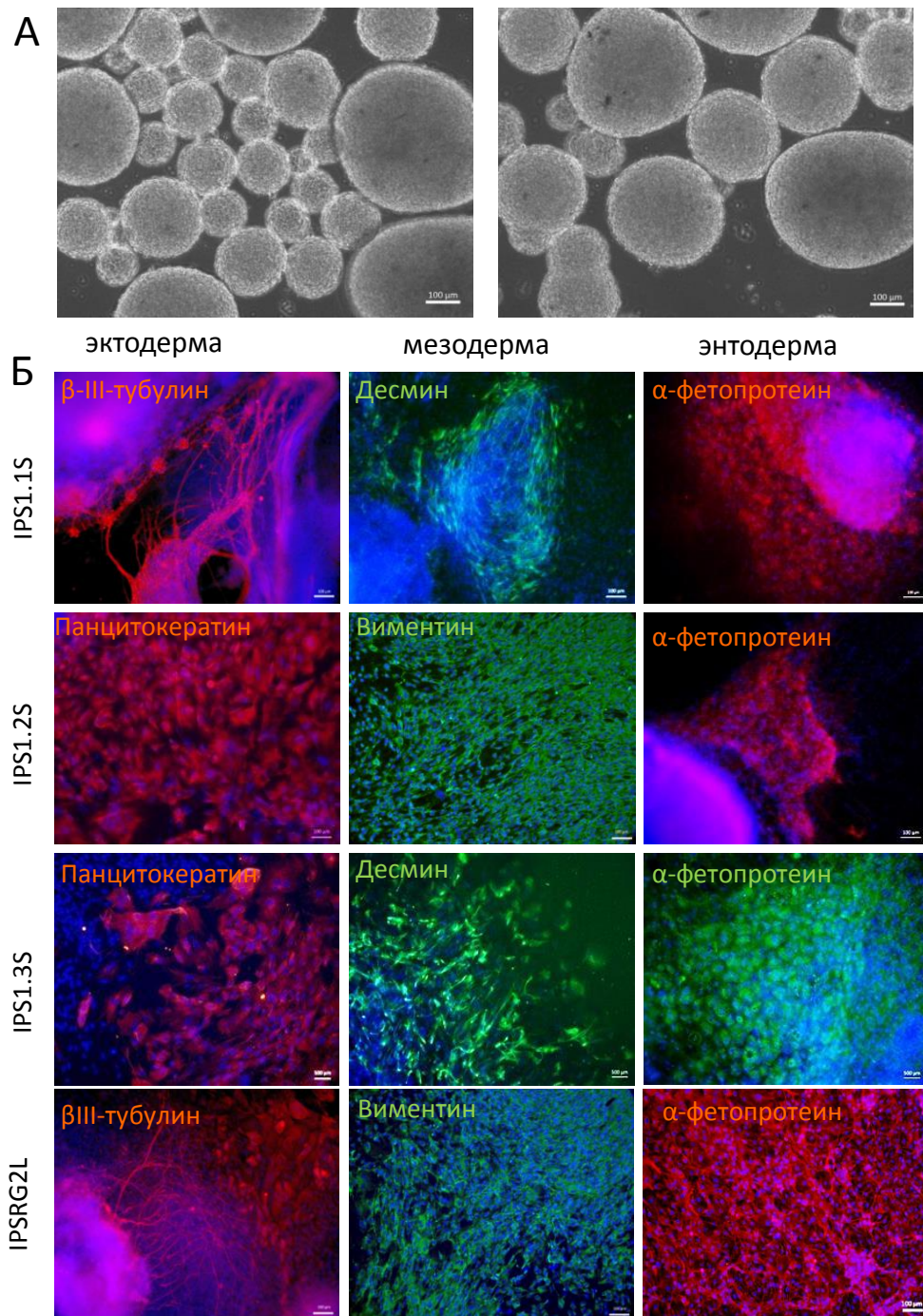


Рисунок 9. Анализ производных трех зародышевых листков (эктодермы, мезодермы и энтодермы) при спонтанной дифференцировке ИПСК в эмбрионидных тельцах. А - морфология эмбрионидных телец, сформированных из ИПСК человека. Слева представлена микрофотография через трое суток культивирования, справа - через две недели. Фазово-контрастная микроскопия. Б - микрофотографии иммуноцитохимического окрашивания дифференцированных производных ИПСК антителами к маркерам эктодермы (панцитокератин, β III-тубулин), мезодермы (десмин, виментин), энтодермы (α -фетопротеин). Ядра окрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок 100 мкм.

3.1.2. Количественный анализ нейральных стволовых клеток в культуре и их характеристика

По окончании нейральной дифференцировки в культуре должны сформироваться общие нейральные предшественники, которые способны давать все типы нейрональных/глиальных клеток. При этом эффективность дифференцировки определяется высокой степенью чистоты популяции нейральных предшественников. Отбор дифференцированных линий ИПСК в нейральном направлении по максимальному количеству PAX6⁺-клеток (маркер НСК) позволит избежать этапа механического пересева розеткоподобных структур. Поэтому полученные культуры НСК из линий IPS1.1S, IPS1.2S, IPS1.3S и IPSGR2L подвергались количественному анализу с помощью проточной цитометрии.

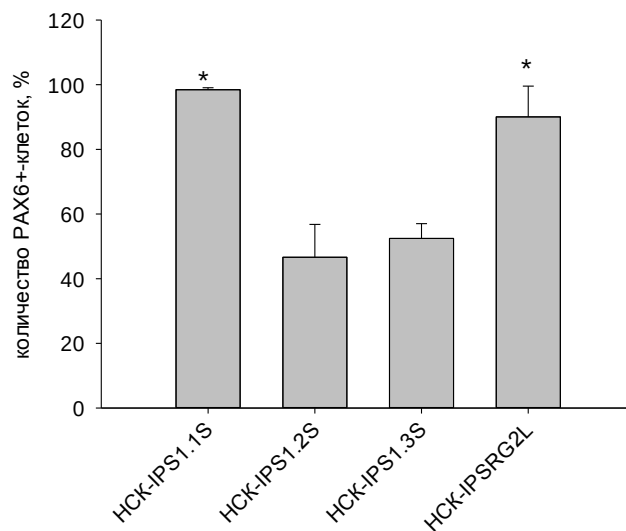


Рисунок 10. Количественный анализ клеток, положительно окрашенных антителами к общенейральному маркеру PAX6. Проточная цитофлуориметрия. * $p \leq 0,05$ достоверность различий при сравнении с культурами НСК-IPS1.2S и НСК-IPS1.3S. Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

Линии IPS1.1S и IPSGR2L, полученные интеграционным и неинтеграционным методами, дифференцируются в нейральном направлении эффективнее, чем линии IPS1.2S и IPS1.3S. Эффективность нейральной

дифференцировки линий IPS1.1S и IPSGR2L составила порядка 90%, в то время как, линий IPS1.2S и IPS1.3S порядка 50% (Рисунок 10).

НСК, полученные из культур IPS1.1S и IPSGR2L, представляли собой мелкие клетки, растущие плотно и образующие трехмерные структуры в виде замкнутых валиков с углублением в середине (Рисунок 11А). Также для подтверждения фенотипа были произведены иммуноцитохимический анализ и ПЦР-РВ. НСК были иммунопозитивны к транскрипционным факторам PAX6 и SOX2, а также к белку промежуточных филаментов Nestin. В культурах также была обнаружена экспрессия данных маркеров (Рисунки 11Б, 12).

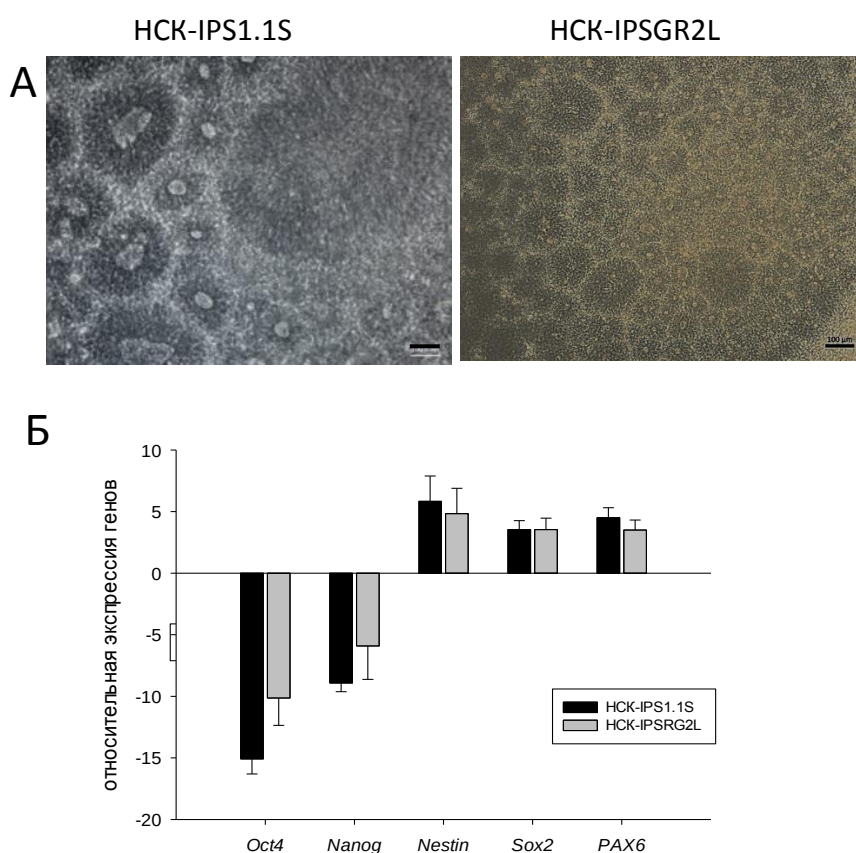


Рисунок 11. Характеристика культур НСК, полученных из линий IPS1.1S и IPSRG2L. А – морфология культур НСК. Фазово-контрастная микроскопия. Масштабный отрезок 100 мкм. Б – транскрипционный профиль ряда генов НСК (относительно группы контроля – линий IPS1.1S и IPSRG2L). Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

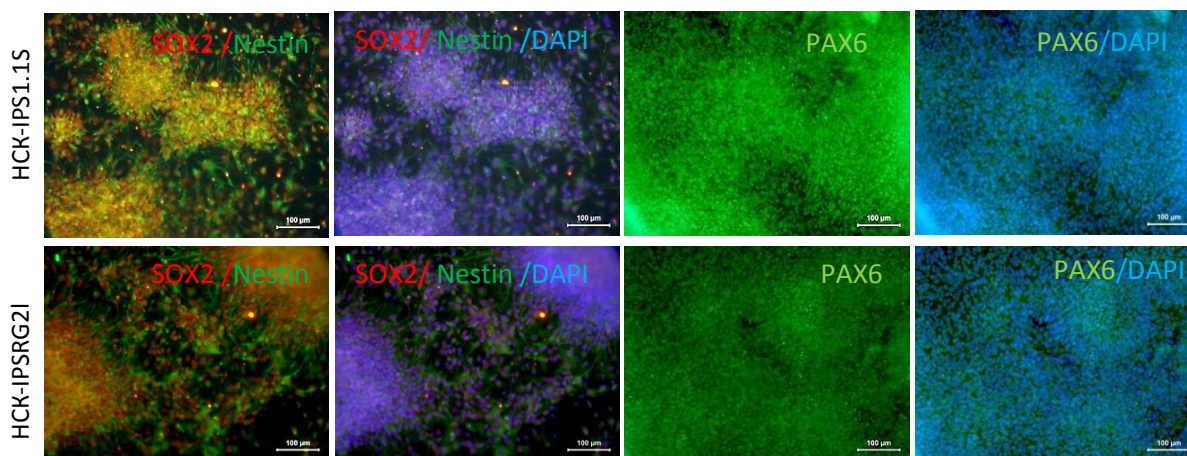


Рисунок 12. Иммуноцитохимический анализ культур НСК, полученных их линий IPS1.1S и IPSRG2L, на маркеры нейральной дифференцировки PAX6, Nestin и SOX2. Ядра окрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок 100 мкм.

3.1.3. Анализ морфологии нейрональных и глиальных клеток-предшественников

Для обеспечения дифференцировки в глиальном направлении НСК культивировали с факторами EGF, FGF и CNTF. Через 9 дней наблюдали изменения в морфологии клеток. ГКП преимущественно представляли собой клетки веретенообразной формы, тела которых имели неровный контур. Ядра клеток крупные, овальной формы (Рисунок 13). На данном этапе предшественники экспрессировали глиальный маркер S100b, выявляемый методом ПЦР-РВ и были иммунопозитивны к данному маркеру (Рисунки 13А, 15А). Эффективность дифференцировки в глиальном направлении, определяемая методом проточной цитофлуориметрии по количеству S100b⁺-клеток, составила $98 \pm 1,85\%$ для линии IPS1.1S и $87 \pm 6,57\%$ для линии IPSRG2L (Рисунок 13Б).

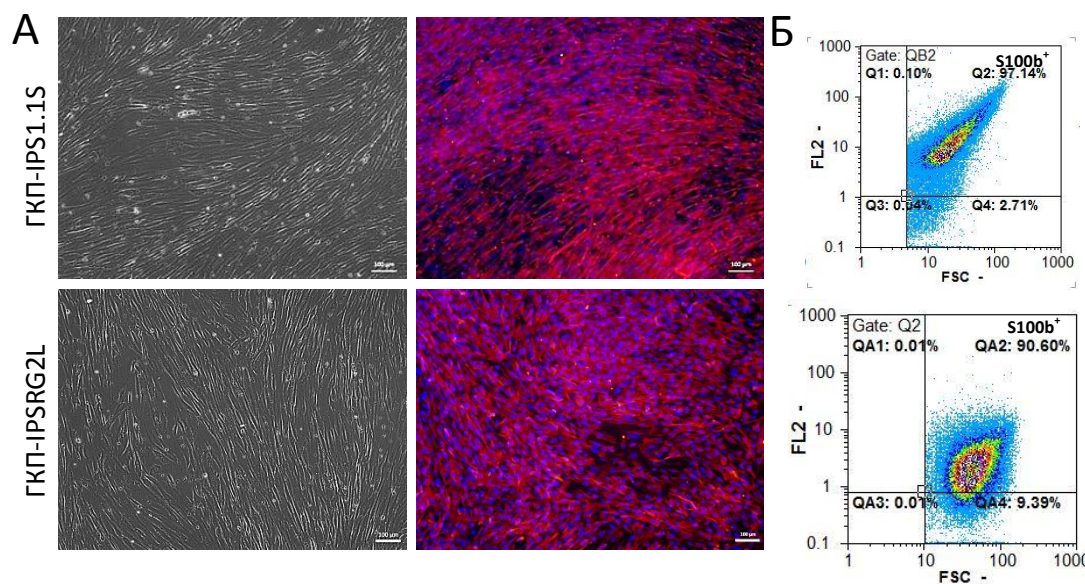


Рисунок 13. Характеристика глиальных клеток-предшественников, полученных из линий IPS1.1S и IPSRG2L, и результаты анализа проточной цитофлуориметрии. А – морфология глиальных клеток-предшественников, полученных из линий IPS1.1S и IPSRG2L. Фазово-контрастная микроскопия и иммуноцитохимический анализ на наличие глиального маркера S100b. Ядра окрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок 100 мкм. Б – результаты количественного анализа S100b⁺-клеток в полученных культурах глиальных клеток-предшественников. Проточная цитофлуориметрия.

После двухнедельного культивирования НСК с FGF2 и пурморфамином в культуре наблюдали морфологические изменения. Преимущественно у НКП выявляли небольшое тело и отросток (отростки), не превышающий по длине трех диаметров тела. Как правило, ядра таких клеток мелкие (Рисунок 14). Клетки на данном этапе экспрессировали нейрональный маркер β III-тубулин (TUBB3) и были к нему иммунопозитивны (Рисунки 14А, 15). Эффективность дифференцировки в нейрональном направлении, установленная методом проточной цитофлуориметрии по количеству β III-тубулин⁺-клеток, составила $98,4 \pm 1,54\%$ для линии IPS1.1S и $88 \pm 6,78\%$ для линии IPSRG2L (Рисунок 15Б).

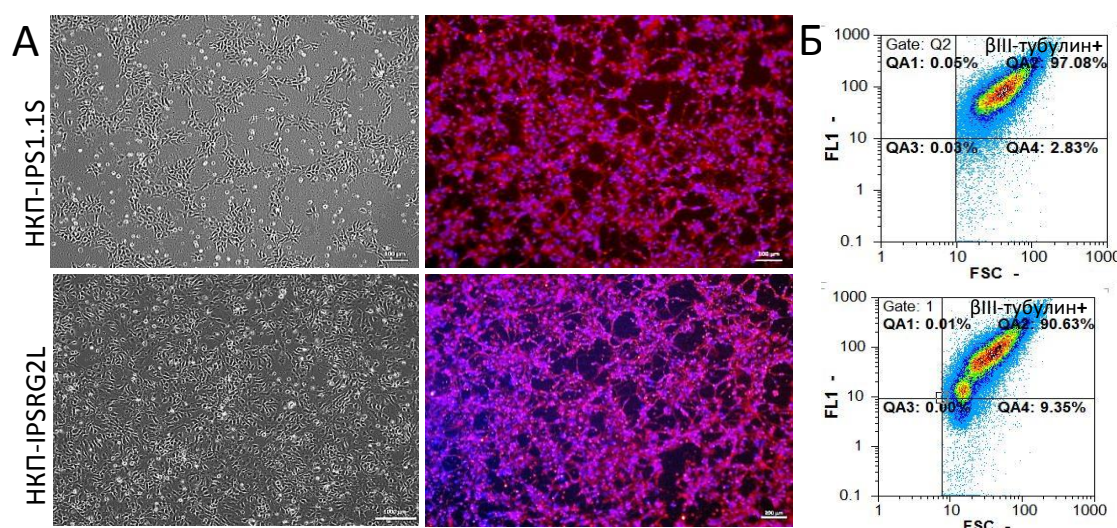


Рисунок 14. Характеристика нейрональных клеток-предшественников, полученных из линий IPS1.1S и IPSRG2L, и результаты анализа проточной цитофлуориметрии. А – морфология нейрональных клеток-предшественников, полученных из линий IPS1.1S и IPSRG2L. Фазово-контрастная микроскопия и иммуноцитохимический анализ на наличие нейронального маркера βIII-тубулина. Масштабный отрезок 100 мкм. Б – результаты количественного анализа βIII-тубулин⁺-клеток в полученных культурах нейрональных клеток-предшественников. Проточная цитофлуориметрия.

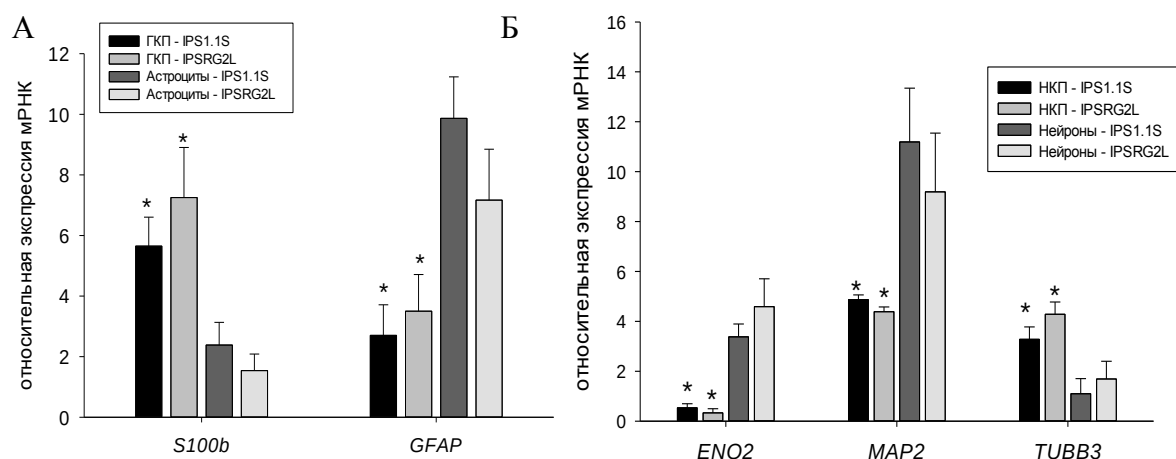


Рисунок 15. Сравнительный анализ экспрессии генов, характерных для нейронального и глиального фенотипа, на разных стадиях дифференцировки. А - экспрессия генов *S100b* и *GFAP* в культурах глиальных клеток-предшественников и зрелых астроцитов, полученных из линий IPS1.1S и IPSRG2L. Б - экспрессия генов *TUBB3*, *MAP2* и *ENO2* в культурах нейрональных клеток-предшественников и зрелых нейронов, полученных из линий IPS1.1S и IPSRG2L. ПЦР-РВ. * $p \leq 0,05$ достоверность различий при сравнении с культурами зрелых нейронов и астроцитов. Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

На этапе созревания в культурах астроцитарной глии наблюдали клетки с ветвящимися отростками, которые на достаточно высоком уровне экспрессировали ген *GFAP* и в меньшей степени ген *S100b* по сравнению с культурой ГКП (Рисунок 15А). Иммуноцитохимический анализ показал, что клетки в культуре преимущественно синтезируют маркер астроцитарной глии *GFAP* (Рисунок 16А). Морфологически большинство нейронов представляли собой клетки с маленькой сомой и длинными отростками и в отличие от НКП на достаточно высоком уровне экспрессировали гены *MAP2* и *ENO2* (Рисунок 15Б). Иммуноцитохимический анализ выявил наличие маркера зрелых нейронов *MAP2* в полученных культурах (Рисунок 16Б).

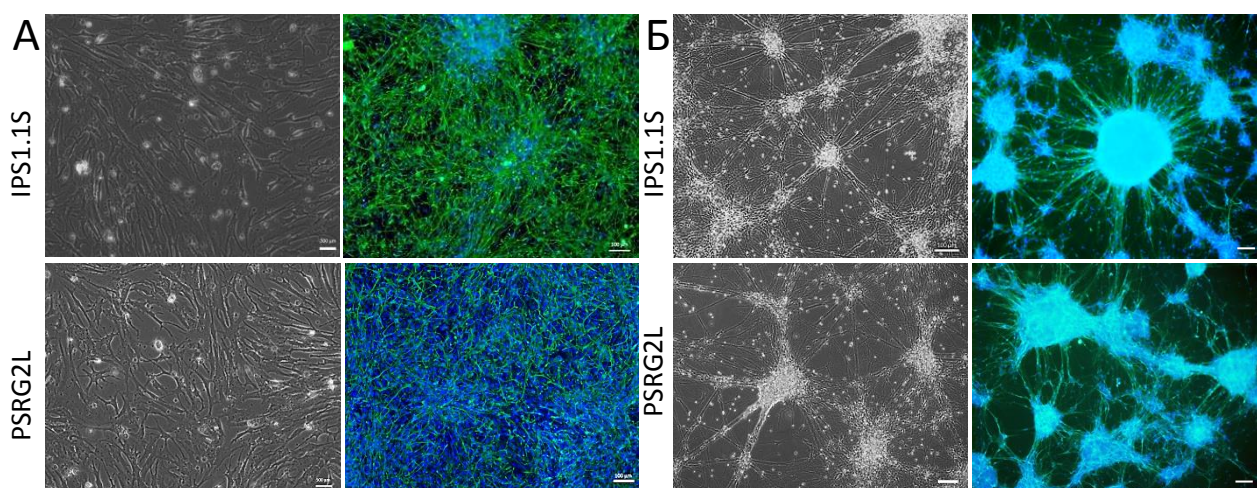


Рисунок 16. Характеристика культур зрелых нейронов и астроцитарной глии, полученных из линий IPS1.1S и IPSRG2L. А – морфология зрелых астроцитов. Фазово-контрастная микроскопия и иммуноцитохимический анализ на наличие маркера астроцитарной глии *GFAP*. Масштабный отрезок 200 мкм. Б – морфология зрелых нейронов. Фазово-контрастная микроскопия и иммуноцитохимический анализ на наличие маркера зрелых нейронов *MAP2*. Ядра окрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок 100 мкм.

Таким образом, было показано, что способность к нейральной дифференцировке является индивидуальной особенностью линии, может варьироваться по количеству $PAX6^{+}$ -клеток и не зависит от метода получения ИПСК. Культуры НСК, полученные из линий IPS1.1S и IPSRG2L, экспрессируют основные маркеры, применяемые для оценки нейральной дифференцировки

стволовых клеток. Дальнейшая дифференцировка позволила получить из НСК нейрональные и глиальные клетки-предшественники, морфологически отличимые друг от друга и экспрессирующие маркеры, соответствующие их клеточным фенотипам.

3.2. Сравнительный анализ секретомов нейрональных и глиальных клеток-предшественников

Было изучено распределение белков по молекулярной массе в полученных секретоматх НКП и ГКП. Для этого было проведено фракционирование белков при помощи электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. Анализ электрофореграмм (Рисунок 17) показывает, что секретомы имеют сложный многокомпонентный состав. При этом очевидно, что соотношение интенсивностей полос, соответствующих белкам, остается неизменным в биологически повторяемых образцах. Качественный анализ распределения белков по молекулярным массам указывает, что биологические повторы образцов КС-НКП и КС-ГКП, близки и сходны по белковому составу.

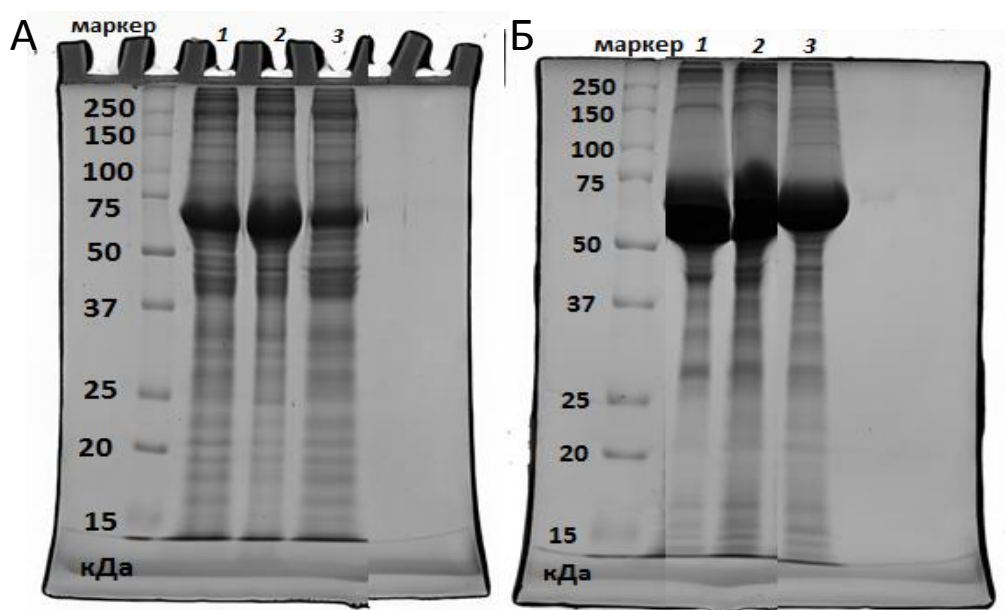


Рисунок 17. Разделение белков, содержащихся в секретоматх, методом электрофореза. Электрофореграмма. А - кондиционированная среда ГКП. Б - кондиционированная среда НКП. 1, 2, 3- биологические повторы образцов.

Для проведения характеристики состава секретомов были проведены протеомный и иммуноферментный анализы (ИФА) КС-НКП и КС-ГКП. Протеомный анализ позволяет анализировать белки с некоторыми ограничениями. Одно из них - диапазон концентраций. Измерение очень низко представленных белков (или минорных) на фоне высоко представленных белков

(или мажорных) невозможно. Вследствие этого минорные белки, не выявленные протеомным анализом и представленные в секретах в очень низких концентрациях, были оценены с помощью ИФА.

3.2.1. Сравнительный протеомный анализ состава секретомов нейрональных и глиальных клеток-предшественников

По результатам протеомного анализа было обнаружено 243 белка в КС-ГКП и 304 белка - в КС-НКП. Среди них 168 белков являются общими и продуцируются двумя культурами. Следует отметить, что выявленные белки секретируются, в том числе, и в составе экзосом.

Обобщая результаты множества исследований, можно условно выделить три основных эффекта, наблюдаемых при использовании КС (секретомов) различных стволовых клеток:

- 1) прорегенеративный эффект, который связывают со способностью стволовых клеток/предшественников в большом количестве продуцировать различные факторы, способствующие ангиогенезу, нейрогенезу и росту аксонов и дендритов;
- 2) противовоспалительный эффект, связанный со снижением концентрации провоспалительных цитокинов и повышением противовоспалительных цитокинов;
- 3) антиапоптотический эффект, в большинстве случаев обусловленный повышением активности протеинкиназы В (pAkt) и индукции антиапоптотических белков семейства BCL2.

Полагаясь на вышеперечисленные эффекты, обнаруженные белки были разделены согласно их функциональным особенностям (Таблица 5). Распределение было выполнено согласно литературным данным и базе Uniprot.

Белки, секретируемые нейрональными и глиальными клетками-предшественниками

Нейрональные клетки-предшественники	Глиальные клетки-предшественники
<i>Белки, регулирующие апоптоз и отвечающие за выживаемость клеток</i>	
Аполипопротеин Е (APOE)	
Кластерин (CLU)	
Кофилин 1 (CFL1)	
Галектин-1 (LGALS1) и галектин-3 (LGALS3)	
Мидкин (MDK)	
Белки семейства 14-3-3: β/α (YWHAB), ϵ (YWHAЕ), γ (YWHAG), η (YWHAN), Θ (YWHAQ), ζ/δ (YWHAZ)	
Белок 3, связывающий инсулиноподобный фактор роста (IGFBP3)	
Тромбоспондин-1 (THBS1)	
Белок В1 высокомолекулярной группы (амфотерин) (HMGB1)	
Белок теплового шока бета-1 (белок теплового шока 27) (HspB1)	
Белок теплового шока 70 кДа 8 (родственный белкам теплового шока 71 кДа) (HspA8)	
Фосфатидилэтаноламин-связывающий белок 1 (PEBP1)	
Катепсин D (CTSD)	
Белок CYR61 (CYR61)	
Фактор роста тромбоцитов С (PDGFC)	
Трансляционно-контролируемый опухолевый белок (TPT1)	
Тканевой ингибитор металлопротеиназ 1 (TIMP1)	
Пигментный фактор эпителиального происхождения (SERPINF1)	

Тканевой ингибитор металлопротеиназ 2 (TIMP2)	Белок теплового шока 70 кДа 4 (HspA4)
Секретогранин 2 (хромогранин C) (SCG2)	Белок теплового шока 105 кДа (HspH1)
Белок Wnt-5a (WNT5A)	Hsp70-взаимодействующий белок (ST13)
Нейропилин 1 (NRP1)	Лейкемия-ингибирующий фактор (LIF)
Трансформирующий белок RhoA (белок A из суперсемейства Ras-подобных белков) (RHOA)	Блокирующий рост специфический белок 6 (GAS6)
Фактор роста тромбоцитов D (PDGFD)	Гремлин-1 (GREM1)
	Тетранектин (TETN)
<i>Белки, регулирующие ангиогенез</i>	
Дистрогликан (DAG1)	
Нейропилин 2 (NRP2)	
Нуклеолин (NCL)	
Гепатоцеллюлярный фактор роста (HDGF)	
Белок Ig-h3, индуцированный трансформирующим фактором роста бета (TGFB1)	
Секретируемый белок 1 семейства Frizzled (SFRP1)	
Ингибитор активатора плазминогена 1 (SERPINE1)	
Лактадгерин (MFGE8)	Миелоидный фактор роста (MYDGF)
Секретогранин 3 (SCG3)	Трансформирующий фактор роста β 2 (TGFB2)
Глипикан-1 (GPC1)	
<i>Белки, регулирующие рост нейритов</i>	

Статмин (STMN1)	
Нейропилин 2 (NRP2)	
Периостин (POSTN)	
Винкулин (VCL)	
Белки теплового шока 90 α (Hsp90 α) и β (Hsp90 β)	
Агрин (AGRN)	
Фактор роста соединительной ткани (CTGF)	
Фибулин-1 (FBLN1)	
Нексин-1(SERPINE2)	
Профилин-1 (PFN1)	
Секретируемый кислый белок с высоким содержанием цистеина (SPARC)	
Белок 2, взаимодействующий с рецепторами факторов роста (GRB2)	
Атаксин-10 (ATXN10)	Динактин (DCTN)
Эфрин- В1 (EFN1B)	Тромбоспондин-2 (THBS2)
Эзрин (EZR)	Белок, содержащий домены дезинтегрина и металлопротеиназы, 19 (ADAM19)
Фактор роста фибробластов 8 (FGF8)	Альфа- (PITPNA) и бета-изоформы (PITPNB) белка-переносчика фосфатидилинозитола
Гликопиканы 2, 4, 6 (GPC2, GPC4 и GPC6)	Твинфилин-2 (TWF2)
Нетрин-1 (NTN1)	Сортирующий нексин 3 (SNX3)
Нейросерпин 1 (SERPINI1)	Просапозин (PSAP)
Семафорин 3С (SEMA3C)	
Нейрональный пентраксин-2 (NPTX2)	

Басигин (BSG)	
C1q-связанный фактор (CRF)	
<i>Белки, обладающие иммунорегулирующими свойствами</i>	
Катепсин В (CTSB)	
Макрофаг-связывающий белок (CAPG)	
Фактор ингибирования миграции макрофагов (MIF)	
Белок FAM49B (FAM49B)	
Синтенин-1 (SDCBP)	
Rab-ингибитор диссоциации GDP бета (GDI2)	
Пентраксин-подобный белок (PTX3)	
Коактозин-подобный белок (COTL1)	
Цистатин-В (CSTB) и С (CSTC)	
Серпин В6 (SERPINB6)	
Аннексин А1 (ANXA1)	Коллектин-12 (COLEC12)
Нектин-2 (NECTIN2)	Витамин-D-связывающий белок (VTDB)
Метеорин-подобный белок (METRNL)	Бета-субъединица импортина 1 (KPNB1)
Моэзин (MSN)	Toll-взаимодействующий белок (TOLLIP)
Аполипопротеин А-I (APOA1)	Белок S100-A11 (S100A11)
28 кДа тепло- и кислотоустойчивый фосфопротеин (PDAP1)	Фактор дифференциации роста 15 (GDF15)
Остеопонтин (SPP1)	SH3-домен-связывающий богатый глутаминовой кислотой белок 3 (SH3BGRL3)
Белок Rap-1b из суперсемейства Ras	

(RAP1B)	
<i>Белки, участвующие в регенерации ткани</i>	
Белок-активатор GM2-ганглиозида (GM2A)	
Гельзолин (GSN)	
Фактор созревания глии δ (GMFB)	
Плейотрофин (PTN)	
<i>Белки, участвующие в гомеостазе ионов кальция</i>	
Кальциклин-связывающий белок (CACYPB)	
Кальмодулин-1 (CALM1)	
Кальретикулин (CALR)	
Станниокальцин-1 (STC1)	
	Станниокальцин-2 (STC2)
	Нуклеобиндин-1 (NUCB1)
	Белок S100-A16 (S100A16)
<i>Белки, участвующие в окислительно-восстановительных реакциях</i>	
Тиоредоксин (TXN)	
Тиоредоксин-доменный белок 17 (TXD17)	
Сульфгидрил-оксидаза 1 (QSOX1)	
Пероксиредоксин-1 (PRDX1), пероксиредоксин-2 (PRDX2), пероксиредоксин-5 (PRDX5), пероксиредоксин-6 (PRDX6)	
Гомолог пероксидазина (PXDN)	
Пептидилглицин альфа-амидирующая монооксигеназа (PAM)	
Глиоксилат редуктаза/гидроксипируват редуктаза (GRHPR)	Гомолог лизилоксидазы 1 (LOXL1)
Каталаза (CAT)	Пероксиредоксин-4 (PRDX4)

	Супероксиддисмутаза 1 (SOD1)
	Протеин-дисульфид-изомераза (белковая дисульфид-изомераза) (P4HB)
	Тиоредоксин-доменный белок 5 (TXNDC5)
	Глутатион-S-трансфераза омега-1 (GSTO1)
<i>Белки, способствующие нейрогенезу</i>	
Септин-2 (SEPT2)	
Белок, связывающий жирные кислоты, 7 (FABP7)	
Эндофилин-A2 (SH3GL1)	Цистеин-глицин богатый белок 1 (CSRP1)
Секретируемый белок 3 семейства Frizzled (SFRP3)	Ольфактомедин-подобный белок 3 (OLFML3)
Факторы роста фибробластов 17 (FGF17) и 19 (FGF19)	Белки Rab-11A (RAB11A) и Rab-11B (RAB11B) из суперсемейства Ras
Фактор дифференциации роста 11 (GDF11)	Белок, ассоциированный с дифференциацией нейробластов AHNAK (AHNAK)
Белок, индуцируемый фактором роста нервов (VGF)	

В КС двух культур обнаружены 6 изоформ белка семейства 14-3-3 – α/β , γ , ϵ , δ/ζ , η , θ , молекулярная масса которых не превышает 30 кДа. Данные белки в большом количестве экспрессируются в мозге, а их секреция осуществляется в экзосомах. Функциональность представителей семейства 14-3-3 многогранна: они выступают в роли регуляторов апоптоза, клеточного цикла деления, ионных каналов и переносчиков, а также организации цитоскелета (Aitken A., 2006). Некоторые изоформы белков семейства 14-3-3 подвергаются

посттрансляционным модификациям, например, ацетилирование остатков лизина может существенно влиять на белок-белковые взаимодействия. (Choudhary C. et al., 2009). Белки данного семейства способны взаимодействовать с белками промежуточных филаментов, регулируя процессы сборки и разборки важных элементов цитоскелета.

Обе культуры секретируют как α , так и β изоформы белка теплового шока 90 кДа (Hsp90). Данные белки Hsp90 α и Hsp90 β способствуют нейритогенезу, и их роль заключается в удлинении аксонов (Benitez M.J. et al., 2014; Karney-Grobe S. et al., 2018). Кроме того, белки Hsp90 обладают антиапоптотическими свойствами за счет ингибирования активности каспазы-9 (Fortugno P. et al., 2003), индукции антиапоптотического белка BCL2 или стабилизации киназы выживания RIP-1 (Lewis J.A. et al., 2000) или протеинкиназы B (Akt) (Sato S. et al., 2000). Белок теплового шока бета-1 (HspB1 или известный как Hsp27) также был обнаружен в секретах двух культур. Он представляет собой небольшой белок, участвующий во многих клеточных процессах и, как известно, защищает клетки от окислительного стресса (Matsumoto T. et al., 2015). Предполагается, что данный белок активирует или стабилизирует фермент глюкозо-6-фосфат дегидрогеназу, катализирующую процесс образования молекулы НАДФН, высокая экспрессия которой увеличивает активность глутатион-редуктазы, что поддерживает нормальный уровень восстановленного глутатиона и защищает клетки от окислительного стресса (Arrigo A.P. et al., 2005). Окислительный стресс способствует повреждению клетки путем апоптоза или некроза в зависимости от уровня активных форм кислорода. Результаты многих работ свидетельствуют о том, что HspB1 препятствует некротической гибели клеток. По мнению авторов, защитный эффект связан со стабилизацией актиновых филаментов (Huot J. et al., 1997). Однако накапливается все больше данных о возможном участии белка HspB1 в регуляции апоптоза путем активации протеинкиназы B (Akt) (Rane M.J. et al., 2003).

Следующим секретируемым белком теплового шока является HspA8 (белок теплового шок 70 кДА 8), который способствует ингибированию апоптоза,

воздействуя на каспазозависимый путь. Также данный белок является антагонистом фактора некроза опухоли- α (TNF α) (Mosser D.D. et al., 1997). В клетке, под воздействием стрессорных агентов, белок HspA8 предупреждает агрегационные процессы при сборке белков (Willmund F. et al., 2013) и восстанавливает структуру цитоскелета (Lorenzo A.F. et al., 2014). Белок HspA8 является составной частью клеточной системы репарации и в постстрессорный период протектирует структурную целостность пептидов (Giffard R.G. et al., 2004).

Также были обнаружены белки, участвующие в регуляции процесса апоптоза: аполипопротеин E (APOE) (Zhou S. et al., 2013), кластерин (CLU) (Zhang H. et al., 2005), галектин-3 (LGALS3) (Matarrese P. et al., 2000), гельзолин (GSN) (Koya R.C. et al., 2000; Harms C. et al., 2004), пероксиредоксин-1, 2, 6 (PRDX1, PRDX2, PRDX 6) (Berggren M.I. et al., 2010; Hu X. et al., 2011; Tulsawani R. et al., 2010) и пигментный фактор эпителиального происхождения (PEDF) (Cao W. et al., 1999; Yabe T. et al., 2001). В КС-НКП и КС-ГКП были выявлены белки, участвующие в развитии эндотелиальных клеток и прорастании сосудов. Одним из таких белков является гепатоцеллюлярный фактор роста (HDGF), который способствует пролиферации эндотелия, являясь мощным митогеном, и регулирует миграцию эндотелиальных клеток (Enomoto H. et al., 2009; Everett A.D., 2004). Также среди молекул, участвующих в ангиогенезе были обнаружены: фактор роста соединительной ткани (CTGF) (Brigstock D.R., 2002), дистрогликан (DAG1) (Hosokawa H. et al., 2002; Wappler E.A. et al., 2011), секретируемый белок 1 семейства Frizzled (SFRP1) (Dufourcq P. et al., 2008). Обе культуры синтезируют вещества, способствующие нейритогенезу. Например, белки динактин (DCTN) и агрин (AGRN) играют важную роль в формировании и стабилизации синаптических связей между нейронами (Eaton B.A. et al., 2002; Huzé C. et al., 2009). Белки нексин-1 (SERPINE2) и статмин (STMN1) являются необходимыми факторами для роста нейритов (Chauvin S. et al., 2015; Cunningham D.D., Gurwitz D. 1989; Grenningloh G. et al., 2004; Wagner S.L. et al., 1989). Белок периостин (POSTN) участвует в процессах регенерации аксонов и дендритов (Matsunaga E. et

al., 2015; Shih C.H. et al., 2014). В КС двух культур был выявлен белок плейотрофин (PTN), отвечающий за процессы формирования памяти и обучения. Он является фактором роста, который участвует в синаптической пластичности гиппокампа и обучении (Olmo N. et al., 2009), а также эффективным ангиогенным и нейротрофическим фактором, стимулирующим рост нейритов, регенерацию и выживаемость нейронов (Herradon G., Perez-Garcia C., 2014; Hida H. et al., 2003). Еще одним общим белком, обладающим нейропротективными и нейротрофическими свойствами, является ингибитор активатора плазминогена-1 (PAI-1). Он относится к членам семейства серпина и его основная функция заключается в ингибировании плазминогена урокиназного и тканевого типа. Этот белок вырабатывается в тканях мозга и может регулировать активность нейтральной протеазы в ЦНС. Белок PAI-1 предотвращает гибель нейронов и дезинтеграцию образованных нейронных сетей, поддерживая или стимулируя нейропротективный эффект через активацию сигнального пути MAPK/ERK (Soeda S. et al., 2008). Обнаруженный в обоих секретах белок мидкин (MDK) также обладает нейротрофическими свойствами и является цитокином, отвечающим за регенерацию повреждённых тканей (Muramatsu T. et al., 2010). Он играет определенную роль в репаративных процессах ишемизированного мозга, и его биологическая активность направлена на подавление апоптоза в нейрональных клетках (Wada M. et al., 2002). Кроме того, секреты содержат вещества, участвующие в регуляции иммунного ответа - фактор ингибирования миграции макрофагов (MIF) (Mitchell R.A. et al., 2002) и пентраксин-подобный белок (PTX3), контролирующий процессы воспаления и ремоделирования тканей (Bottazzi B. et al., 2016).

Секретом ГКП содержит белки, регулирующие процессы апоптоза, участвующие в ангиогенезе, противовоспалительных и иммунных реакциях, гомеостазе ионов кальция, окислительно-восстановительных реакциях и инициирующие образование и рост нейритов. В процентном соотношении ГКП секретируют 31% уникальных белков, не встречающихся в нейрональном секрете. Среди обнаруженных белков – лактотрансферрин (LTF), белок

теплового шока 105 кДа (HspH1), тромбоспондин-2 (THBS2), витамин D-связывающий белок (VDBP) и другие. Белок греmlin (GREM1), секретируемый ГКП, является нейропротективным агентом как *in vitro*, так и *in vivo* и способен защищать нейроны от стрессорных воздействий, взаимодействуя с рецептором VEGFR2 и активируя киназы MAPK/Akt (Phani S. et al., 2013). Еще одним компонентом секрета ГКП является блокирующий рост специфический белок 6 (GAS6). Он является лигандом для рецепторов Ark (Axl) и Tyro3. Исследования показали, что активация сигнального пути Gas6/Ark (Axl) препятствует запрограммированной гибели нейронов (Allen M.P. et al., 1999; Son B.K. et al., 2008). В состав КС-ГКП входит фактор дифференциации роста 15 (GDF15) – член цитокинового суперсемейства TGF- β . Данный белок выполняет разнообразные функции: регулирует позднюю фазу активации макрофагов через ингибирование TNF α ; а также, обладая сильным противовоспалительным действием, подавляет экспрессию рецептора липопротеидов низкой плотности, что тормозит перерождение макрофагов в пенистые клетки (Strelau J. et al., 2000). Кроме того, он обладает антиапоптотическими свойствами, действуя путем регулирования сигнальных путей Akt и ERK (Subramaniam S. et al., 2003). SH3-домен-связывающий богатый глутаминовой кислотой белок 3 (SH3BGRL3), являясь антагонистом TNF α , также препятствует воспалению и участвует в устойчивости клеток к апоптозу (Xu C. et al., 2005). Следующим белком, выявленным в секрете ГКП и обладающим негативной регуляцией апоптотического процесса, является лейкемия - ингибирующий фактор (LIF). Данный фактор является цитокином и способствует нейрональному выживанию путем активации PI3K сигнальных каскадов, а также индуцирует нейрогенез при травме обонятельного эпителия взрослых мышей (Bauer S. et al., 2003; Davis S.M. et al., 2017; Moon C. et al., 2009). Еще одним белком, обладающим защитной функцией и принадлежащим к семейству лектинов С-типа, является тетранектин (TETN). Данный белок может ослаблять действие токсичных молекул, снижать уровень АФК и ингибировать процессы апоптоза и аутофагии путем фосфорилирования p70S6K1 (одного из участника PI3K сигнального пути) (Chen Z. et al., 2015; Xie Q.

et al., 2019). ГКП секретируют антиоксиданты, такие как пероксиредоксин-4 (PRDX4) и тиоредоксин-доменный белок 5 (TXNDC5). Так, TXNDC5 в составе тиоредоксиновой системы участвует в обезвреживании активных форм кислорода, передавая электроны различным пероксидазам (Horna-Terrón E. et al., 2014; Lee H.W. et al., 2010). Пероксиредоксин-4 относится к семейству антиоксидантных ферментов, который контролирует уровень цитокин-индуцированных пероксидов и препятствует апоптозу путем активации PI3K/AKT сигнального пути (Rao Z. et al., 2017). Среди белков, участвующих в ангиогенезе, в глиальном секрете были выделены миелоидный фактор роста (MYDGF) и трансформирующий фактор роста $\beta 2$ (TGFB2), стимулирующие пролиферацию эндотелиальных клеток через MAPK1/3-, STAT3- и CCND1-опосредованные сигнальные пути (Ishihara A. et al., 1994). Среди белков, вовлечённых в различные процессы нейритогенеза, в секрете ГКП были обнаружены: твинфилин-2 (TWF2), просапозин (PSAP), сортирующий нексин 3 (SNX3) и тромбоспондин-2 (THBS2). Повышенная экспрессия твинфилина-2 способствует увеличению роста нейритов за счет влияния на актиновые филаменты (Yamada S. et al., 2007). Просапозин обладает способностью стимулировать нейритогенез и регенерацию нервной ткани, а также предотвращает запрограммированную гибель клеток в первичной культуре мозжечковых нейронов крыс (Kotani Y. et al., 2002; O'Brien J.S. et al., 1994; Tsuboi K. et al., 1998). Сортирующий нексин 3 регулирует рост нейритов в клетках нейробластомы мыши N1E-115 (Mizutani R. et al., 2009). Функциональная особенность белка тромбоспондина-2 заключается в способности поддерживать рост нейритов. Кроме того, его деятельность направлена на миграцию клеток в нервной системе (Hoffman J.R. et al., 1999).

В секрете НКП содержатся белки, отвечающие за выживаемость и участвующие в процессах ангиогенеза, противовоспалительных и окислительно-восстановительных реакциях и гомеостазе ионов кальция. Также были обнаружены белки, инициирующие образование и рост нейритов. Секретция уникальных белков НКП составляет 45% от всего секрета. Например, белок атаксин-10 (ATXN10) необходим для выживания мозжечковых нейронов. Кроме

того, он индуцирует нейритогенез, активируя Ras-МАР киназный путь (Marz P. et al., 2004; Waragai M. et al., 2006). Белок Wnt-5a способствует негативной регуляции апоптоза (Shi Y.N. et al., 2017) и отвечает за организацию синапсов (Salinas P.C. et al., 2013, 2012). Белок семафорин 3С (SEMA3C) способствует выживанию и вызывает нейритогенез мозжечковых нейронов в культуре (Moreno-Flores M.T. et al., 2003). КС-НКП содержит факторы роста фибробластов 8, 17 и 19 (FGF8, FGF18 и FGF19). FGF8 и FGF19 повышают жизнеспособность нейронов и увеличивают нейритогенез (Chi C.L. et al., 2003; Fantetti K.N. et al., 2012; García-Hernández S. et al., 2013). Одним из компонентов нейронального секрета является С1q-связанный фактор (CRF), участвующий в поддержании структуры синапсов, синаптической пластичности и способствующий ангиогенезу посредством активации сигнального пути ERK1/2 (Bérubé N.G. et al., 1999; Liu F. et al., 2017; Sigoillot S.M. et al., 2015). Среди белков, участвующих в образовании и росте нейритов, были обнаружены эфрин-В1 (EFBN1), нетрин-1 (NTN1) и глипиканы (GPC). Эфрин-В1 является представителем семейства белков, являющихся лигандами эфриновых рецепторов. Взаимодействие эфринов с их рецепторами играет важную роль в аксональном наведении, а также при ангиогенезе. Эфрин-В1-индуцированный нейритогенез коррелирует с повышенной экспрессией определенных нейрон-специфических белков, ассоциированных с микротрубочками (МАР) (Moreno-Flores M. et al., 2002; Tanaka M. et al., 2004). Нетрин-1 участвует в аксональном наведении. Его взаимодействие с $\alpha 3 \beta 1$ -интегрином играет важную роль в правильном позиционировании ГАМКергических нейронов в коре мозга (Colamarino S.A. et al., 1995; Serafini T. et al., 1996). Глипиканы составляют одно из двух основных семейств гепарансульфатных протеогликанов. В КС-НКП идентифицированы глипиканы GPC1, GPC2, GPC4 и GPC6. Непосредственно в нейритогенезе участвуют GPC2 (Kurosawa N. et al., 2001), GPC4 (Farhy-Tselnick I. et al., 2017), GPC6 (Su Y. et al., 2018). Функция глипикана GPC1 направлена на повышение активности роста сосудов (Monteforte A.J. et al., 2016). В нейрональном секрете были выявлены различные ингибиторы сериновых протеаз. Например,

нейросерпин 1 (SERPIN1), способствующий подавлению активности плазминогена и плазмина, защищает нейроны от их воздействия (Osterwalder T. et al., 1998; Yepes M. et al., 2000). Он также участвует в формировании, реорганизации синаптических связей и пластичности в нервной системе взрослого человека (Parmar P.K. et al., 2002). Еще одним белком, участвующим в пластичности мозга, является нейросекреторный белок, индуцируемый фактором роста нервов (VGF). Он играет важную роль в нейрогенезе и процессах, связанных с обучением и памятью (Sakamoto M. et al., 2015). В КС-НКП присутствуют белки, участвующие в ангиогенезе. Одним из таких белков является лактадгерин (MFGE8) (Silvestre J.S. et al., 2005). Он взаимодействует с интегринами $\alpha v \beta 3$ и $\alpha v \beta 5$, активируя фосфорилирование Akt в эндотелиальных клетках *in vitro*, и стимулирует постишемическую неоваскуляризацию *in vivo*. Эти результаты показывают решающую роль лактадгерина в VEGF-зависимой неоваскуляризации и определяют лактадгерин как важную мишень для модуляции ангиогенеза. В секрете НКП были обнаружены аполипопротеины, представляющие собой класс медиаторов, которые могут участвовать в регуляции активности нейтрофилов. Считается, что ApoA-I играет важную роль в ингибировании продукции активных форм кислорода, поскольку снижает дегрануляцию и продукцию супероксида активированными нейтрофилами (Blackburn W.D. et al., 1991; Furlaneto C.J. et al., 2002). Среди белков, участвующих в иммунном ответе, особый интерес представляет собой остеопонтин, так как он обладает хемотаксическими свойствами, которые способствуют привлечению клеток в места воспаления. Кроме того, он опосредует активацию клеток и выработку цитокинов (Chen W. et al., 2011; Wang K. X. et al., 2008).

3.2.2. Сравнительный иммуноферментный анализ состава секретомов нейрональных и глиальных клеток-предшественников

Как следует из литературных данных, нейротрофины являются секреторными белками, поддерживающими жизнеспособность нейронов и

стимулирующими их развитие и активность. Данные белки не были обнаружены при протеомном анализе, но их количество было оценено с помощью ИФА. Согласно полученным данным количество нейротрофинов в концентрированных КС составляет порядка пг/мл, что ниже концентраций их терапевтической активности (Рисунок 18). При этом концентрация нейротрофических факторов BDNF в 19 раз, NGF в 12 раз, CNTF в 18 раз и GDNF в 3 раза выше в КС-ГКП по сравнению с КС-НКП.

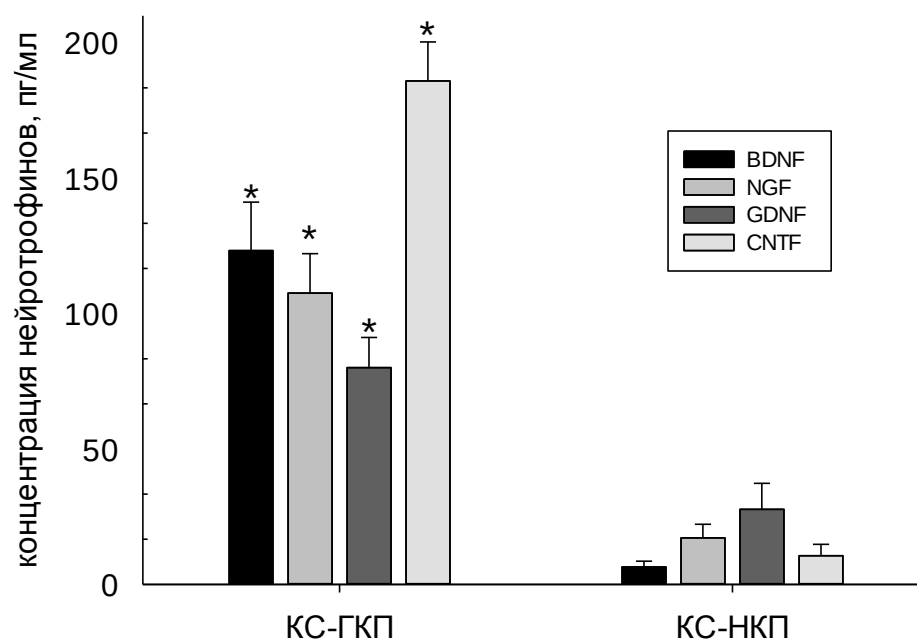


Рисунок 18. Секреция нейротрофинов нейрональными и глиальными клетками-предшественниками. ИФА. * $p \leq 0,05$ достоверность различий при сравнении двух КС. Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

3.3. Сравнительный анализ экспрессии генов регуляторных белков нейрональными и глиальными клетками-предшественниками

На основе литературных данных и проведенного протеомного анализа была исследована экспрессия генов регуляторных белков, участвующих в процессах регенерации и обладающих нейропротективными и нейротрофическими свойствами. Таким образом, в культурах НКП и ГКП была обнаружена экспрессия генов *YWHAB* (белок 14-3-3 – α/β), *CLU* (кластерин), *HSPB1* (белок теплового шока бета-1), *HSPA8* (белок теплового шока 70 кДа 8), *SEPRINF1* (пигментный фактор эпителиального происхождения), *HSP90AA1* (белок теплового шока 90 кДа α), *MIF* (фактор ингибирования миграции макрофагов), *HDGF* (гепатоцеллюлярный фактор роста) и *PTN* (плейотрофин). При этом уровень экспрессии генов *HDGF*, *HSPA8* и *PTN* выше в НКП, а генов *SEPRINF1* и *HSPB1* выше в ГКП.

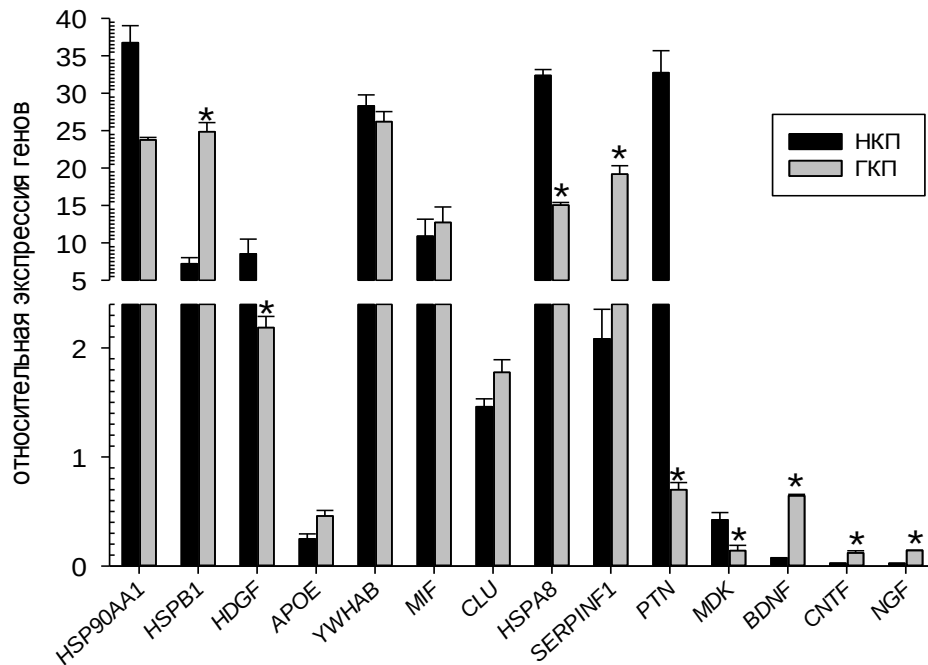


Рисунок 19. Транскрипционный профиль ряда генов, экспрессируемых нейрональными и глиальными клетками-предшественниками. ПЦР-РВ. * $p \leq 0,05$ достоверность различий при сравнении двух культур. Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

Следует отметить, что обе культуры обладают достаточно низким уровнем экспрессии генов *BDNF* (нейротрофический фактор мозга), *CNTF* (цилиарный нейротрофический фактор), *NGF* (фактор роста нервов), *GDNF* (глиальный нейротрофический фактор), *APOE* (аполипопротеин E) и *MDK* (мидкин) по сравнению с другими исследуемыми генами. При этом сравнительный анализ двух культур показал, что уровень экспрессии генов *BDNF*, *CNTF*, *NGF*, *GDNF* и *MDK* выше в ГКП (Рисунок 19).

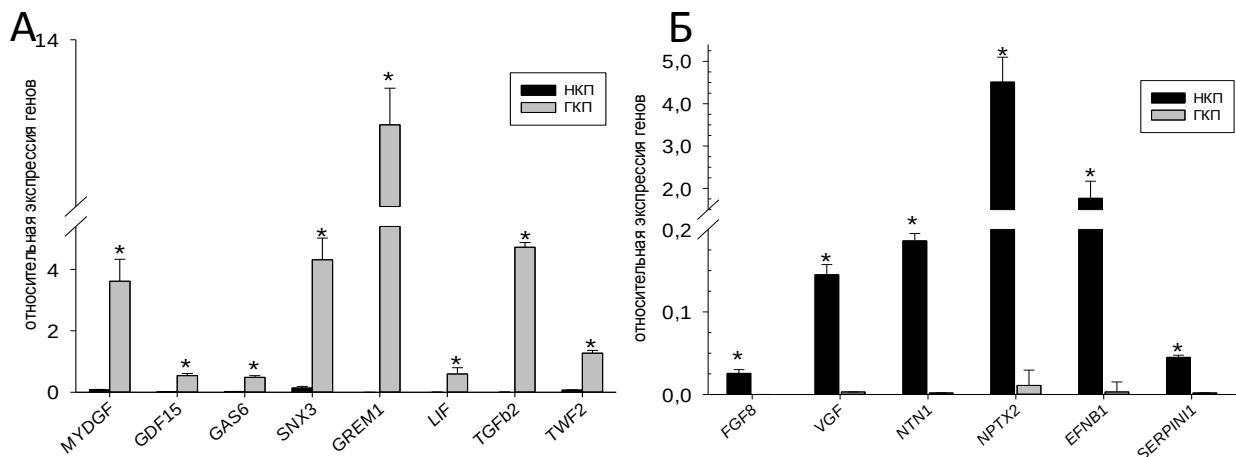


Рисунок 20. Транскрипционный профиль ряда генов, экспрессируемых нейрональными и глиальными клетками-предшественниками. ПЦР-РВ. А – гены, высоко экспрессируемые в ГКП. Б – гены, высоко экспрессируемые в НКП. * $p \leq 0,05$ достоверность различий при сравнении двух культур. Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

В ГКП была выявлена высокая экспрессия генов *GREM1* (грелин-1), *GAS6* (блокирующий рост специфический белок 6), *LIF* (лейкемия-ингибирующий фактор), *TWF2* (твинфилин 2), *SNX3* (сортирующий нексин 3); *MYDGF* (миелоидный фактор роста), *TGFβ2* (трансформирующий фактор роста β2) и *GDF15* (фактор дифференциации роста 15) (Рисунок 20А). Перечисленные выше гены в НКП не определялись, либо находились на достаточно низком уровне экспрессии.

При этом высокая экспрессия генов *FGF8* (фактор роста фибробластов 8), *NTN1* (нетрин-1), *NPTX2* (нейрональный пентраксин-2), *EFNB1* (эфрин-В1),

SERPINI1 (нейросерпин 1) и *VGF* (белок, индуцируемый фактором роста нервов) была определена только в культуре НКП (Рисунок 20Б).

Таким образом, культуры НКП и ГКП экспрессируют и секретируют широкий спектр биологически активных веществ, часть которых строго специфична для данного типа клеток. При этом обе культуры экспрессируют нейротрофины *BDNF*, *CNTF*, *NGF* на достаточно низком уровне по сравнению с другими исследуемыми генами, и их концентрация в КС была низкой, что определялась только методом ИФА. Однако стоит отметить, что при сравнительном анализе двух культур экспрессия генов *BDNF*, *CNTF*, *NGF* и секреция нейротрофических факторов была выше в культуре ГКП. Распределение белков по функциональным особенностям показало как в глиальном, так и в нейрональном секретах наличие различных регуляторных молекул, обладающих нейропротективными, нейротрофическими и прорегенеративными свойствами.

3.4. Сравнительный анализ нейропротективного и прорегенеративного действия нейрональных и глиальных клеток-предшественников в моделях *in vitro*

3.4.1. Сравнительный анализ нейропротективного и прорегенеративного действия нейрональных и глиальных клеток-предшественников на модели гипоксии

3.4.1.1. Оценка жизнеспособности клеток в культуре SH-SY5Y

Представлены результаты оценки жизнеспособности клеточной линии SH-SY5Y при моделировании гипоксии (Рисунок 21А).

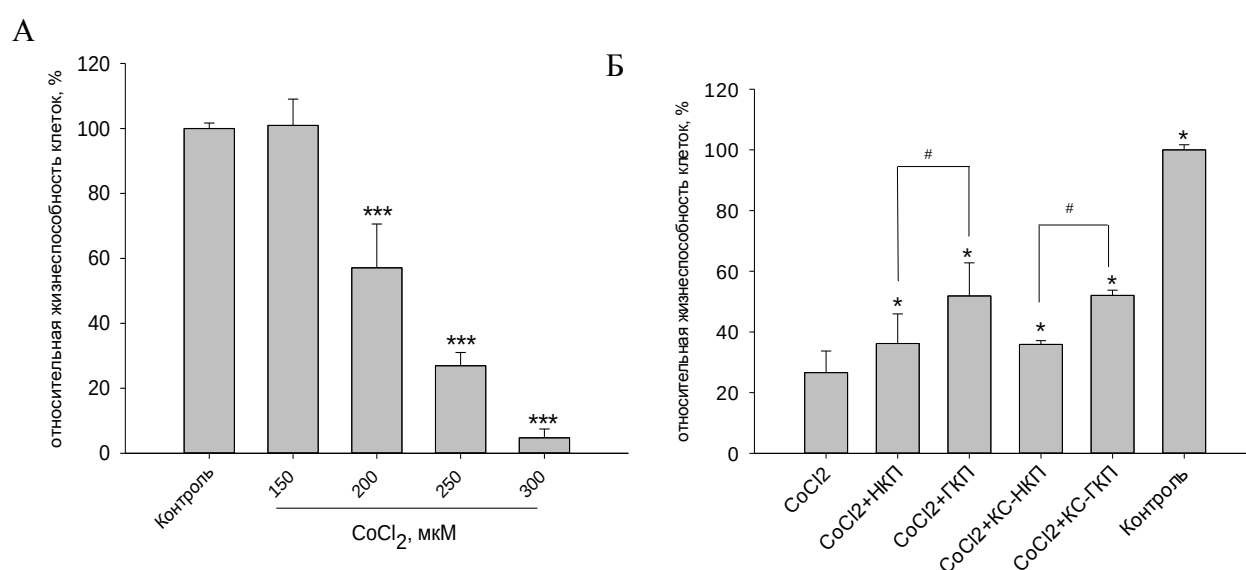


Рисунок 21. Относительная жизнеспособность клеточной линии SH-SY5Y при моделировании гипоксии. МТТ-тест. А – в зависимости от концентрации дихлорида кобальта. * $p \leq 0,05$ достоверность различий от контроля; Б – в зависимости от сокультивирования с ГКП и НКП и добавления их КС. * $p \leq 0,05$ достоверность различий при сравнении с дихлоридом кобальта (CoCl₂); # $p \leq 0,05$ при сравнении двух культур, а также их КС. Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

В ходе дозозависимого эксперимента была определена оптимальная концентрация дихлорида кобальта 250 мкМ. Клеточная гибель при такой концентрации составляет $73 \pm 4,06\%$. Жизнеспособность клеток контрольной группы, не обработанных дихлоридом кобальта, принимали за 100%.

Сокультивирование с НКП увеличивает число жизнеспособных клеток нейробластомы линии SH-SY5Y на $10 \pm 2,6\%$, а с ГКП - на $25,42 \pm 6,2\%$ в условиях

острой химической гипоксии, что сопоставимо с результатами по добавлению их КС (Рисунок 21Б). При этом ГКП обладают более выраженным протективным действием по сравнению с НКП. Такую же тенденцию наблюдали и при добавлении КС.

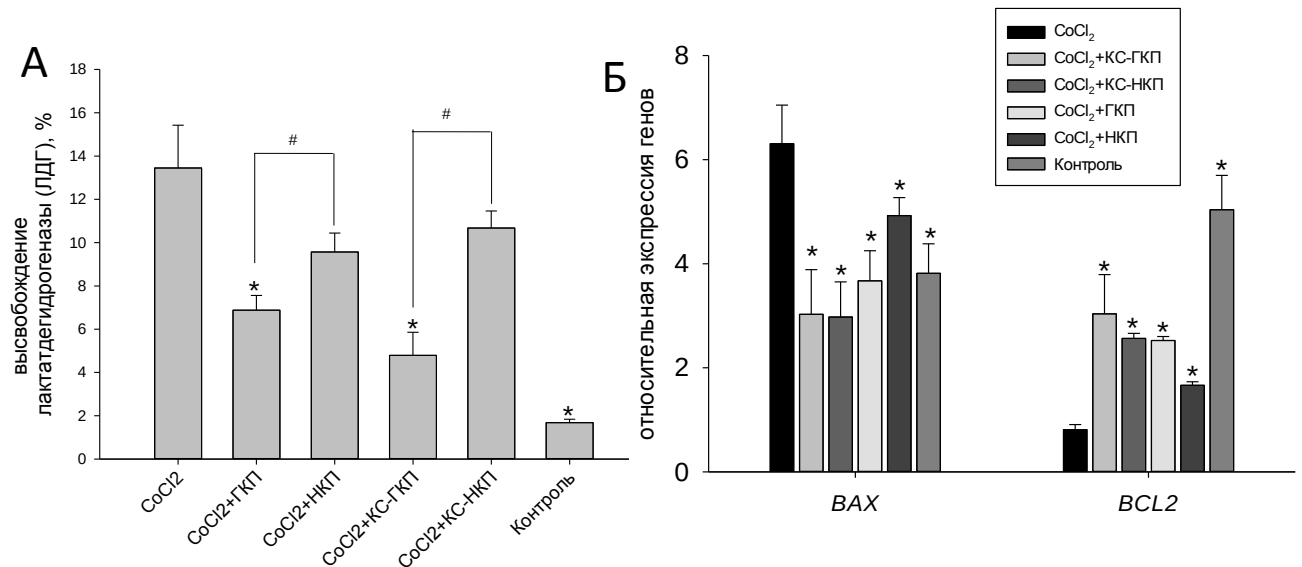


Рисунок 22. Результаты оценки нейропротективного действия культур нейрональных и глиальных клеток-предшественников и их КС в условиях острой гипоксии. А – количественная оценка высвобождения фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ) некротическими клетками. ЛДГ-тест. Б – оценка профиля экспрессии генов семейства BCL2. ПЦР-РВ. * $p \leq 0,05$ достоверность различий при сравнении с дихлоридом кобальта (CoCl₂); # $p \leq 0,05$ при сравнении двух культур, а также их КС. Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

Инкубация с ГКП приводила к снижению высвобождения фермента ЛДГ клеточной линией SH-SY5Y (оценка некроза) на $8,2 \pm 1,32\%$, в то время как НКП не оказывали такого воздействия. Подобный эффект был обнаружен и при добавлении КС-ГКП (высвобождение ЛДГ снижалось на $10,34 \pm 2,51\%$) и КС-НКП (без изменений по сравнению с группой CoCl₂) (Рисунок 22А).

Дополнительно исследовали экспрессию генов позитивного (BAX) и негативного (BCL2) регуляторов апоптоза. Спустя сутки после моделирования гипоксии уровень экспрессии гена BCL2 понижался в 6,2 раза, а гена BAX повышался в 2 раза по сравнению с контрольной группой. Добавление КС-ГКП

снижало экспрессию гена *BAX* в 2 раза, а гена *BCL2* увеличивало в 3,7 раза в клетках нейробластомы в условиях гипоксии. Аналогичную экспрессию генов *BAX* и *BCL2* наблюдали при сокультивировании с ГКП. Инкубация с КС-НКП приводила к снижению уровня экспрессии гена *BAX* в 2 раза и увеличению экспрессии гена *BCL2* в 3,15 раза в клетках нейробластомы после моделирования гипоксии. Такую же тенденцию в изменении экспрессии генов *BAX* и *BCL2* наблюдали при сокультивировании с НКП (Рисунок 22Б).

3.4.1.2. Количественная оценка некротических и апоптотических клеток

При гипоксии, вызванной дихлоридом кобальта, клетки преимущественно погибали путем апоптоза $55,4 \pm 3,9$ % и в меньшей степени путем некроза $20 \pm 2,5$ % (Рисунки 23, 24).

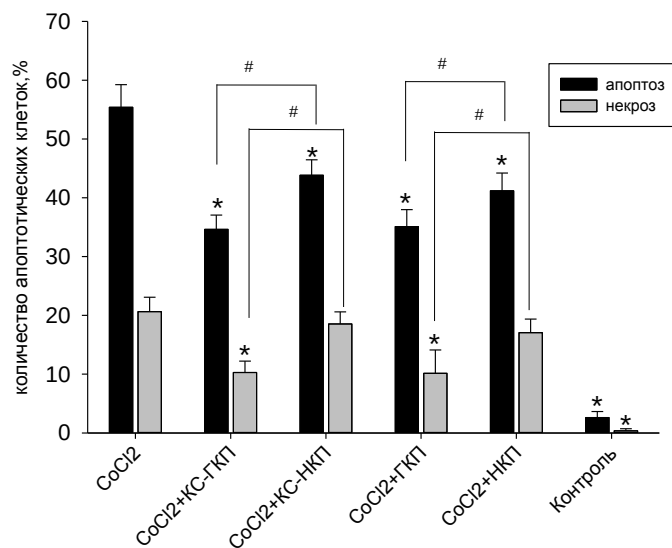


Рисунок 23. Количественная оценка апоптотических/некротических клеток в культуре нейробластомы линии SH-SY5Y. * $p \leq 0,05$ достоверность различий при сравнении с дихлоридом кобальта (CoCl₂); # $p \leq 0,05$ при сравнении НКП и ГКП, а также их КС. Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

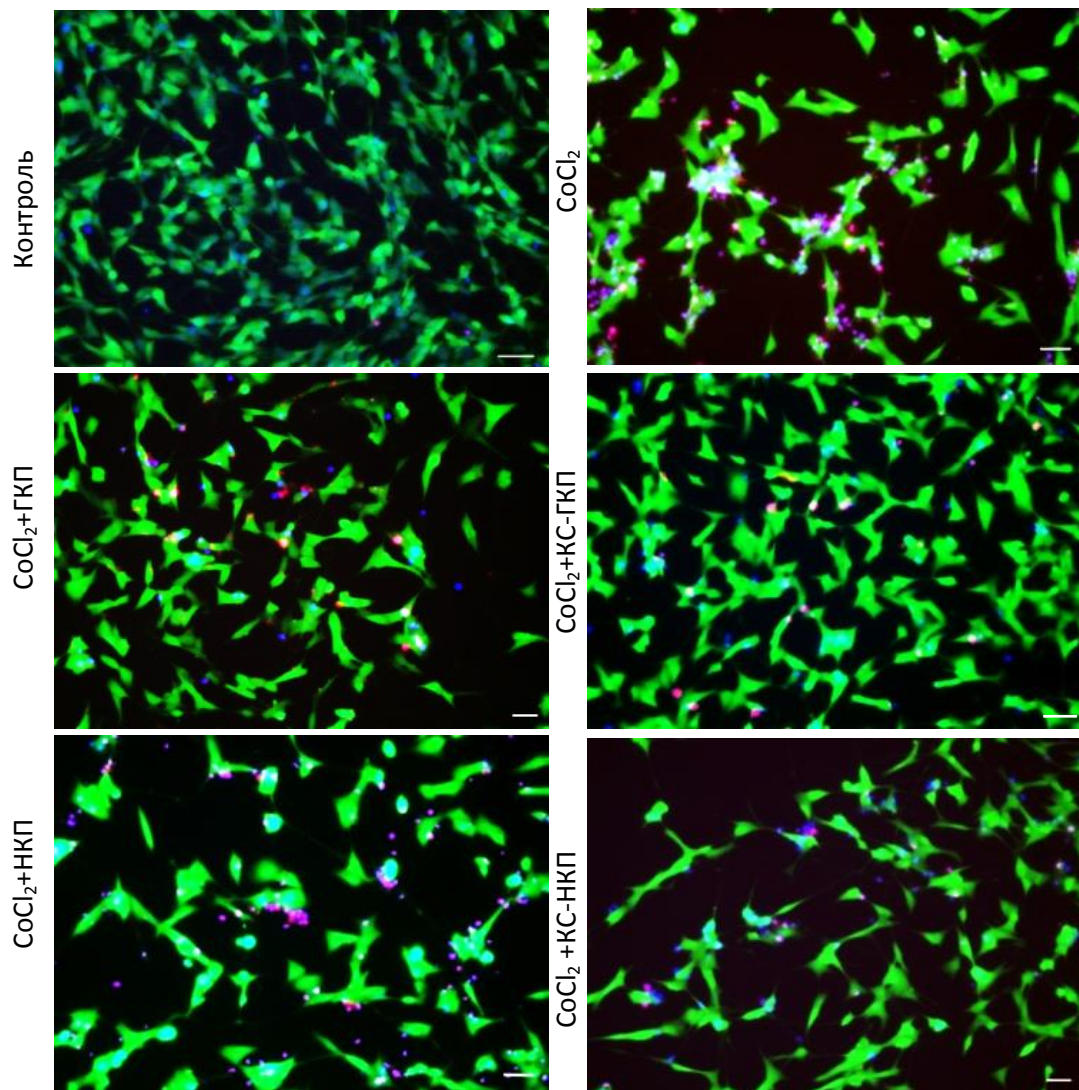


Рисунок 24. Микрофотографии дифференциального окрашивания клеточной линии SH-SY5Y. Окраска жизнеспособных клеток флуоресцентным красителем Calcein-AM (зеленый), некротических клеток йодидом пропидия (красный), апоптотических клеток (конденсация ядра) раствором Hoechst 33342 (синий). Масштабный отрезок 100 мкм.

Сокультивирование с ГКП снижало количество апоптотических клеток нейробластомы до $34,6 \pm 2,4\%$ и некротических клеток до $10,15 \pm 1,94\%$ при химической гипоксии. В случае сокультивирования с НКП происходило уменьшение только апоптотических клеток в культуре нейробластомы до $43,82 \pm 2,6\%$, а количество некротических клеток оставалось неизменным по сравнению с группой CoCl_2 . Добавление КС-ГКП и КС-НКП приводило к аналогичным результатам.

3.4.1.3. Оценка роста нейритов

После моделирования гипоксии дихлоридом кобальта у клеток нейробластомы линии SH-SY5Y наблюдали дегенерацию нейритов: аксоны и дендриты отсутствовали или были короткими. В группе контроля в отсутствие воздействия дихлорида кобальта выявляли клетки с продолжительными нейритами. Сокультивирование с ГКП приводило к более быстрому росту нейритов после повреждения (Рисунки 25, 26). Оценку роста нейритов осуществляли по подсчету средней площади клеток, которая при инкубации с ГКП увеличивалась за счет нейритогенеза: на первые сутки в 1,7 раза, на третьи сутки - в 1,8 раза, а на седьмые сутки площадь практически сравнялась с группой контроля. В группе сокультивирования с НКП на первые и третьи сутки нейритов не было обнаружено, либо они были непродолжительными. Однако на седьмые сутки наблюдали короткие отростки у клеток нейробластомы, площадь которых превышала в 1,23 раза площадь культуры с добавлением дихлорида кобальта. Такую же тенденцию наблюдали и при исследовании КС-ГКП и КС-НКП (Рисунок 25).

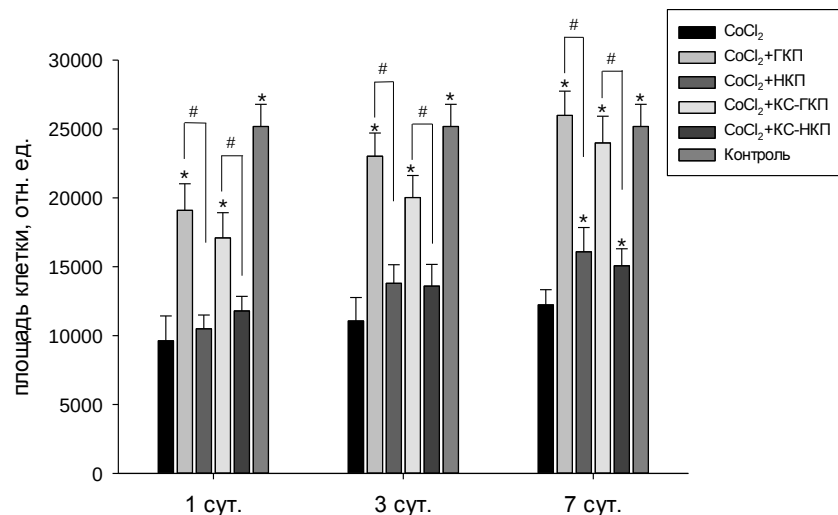


Рисунок 25. Оценка роста нейритов методом морфометрического анализа средней площади клеток в культуре нейробластомы линии SH-SY5Y. * $p \leq 0,05$ достоверность различий при сравнении с дихлоридом кобальта (CoCl₂); # $p \leq 0,05$ при сравнении НКП и ГКП, а также их КС. Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

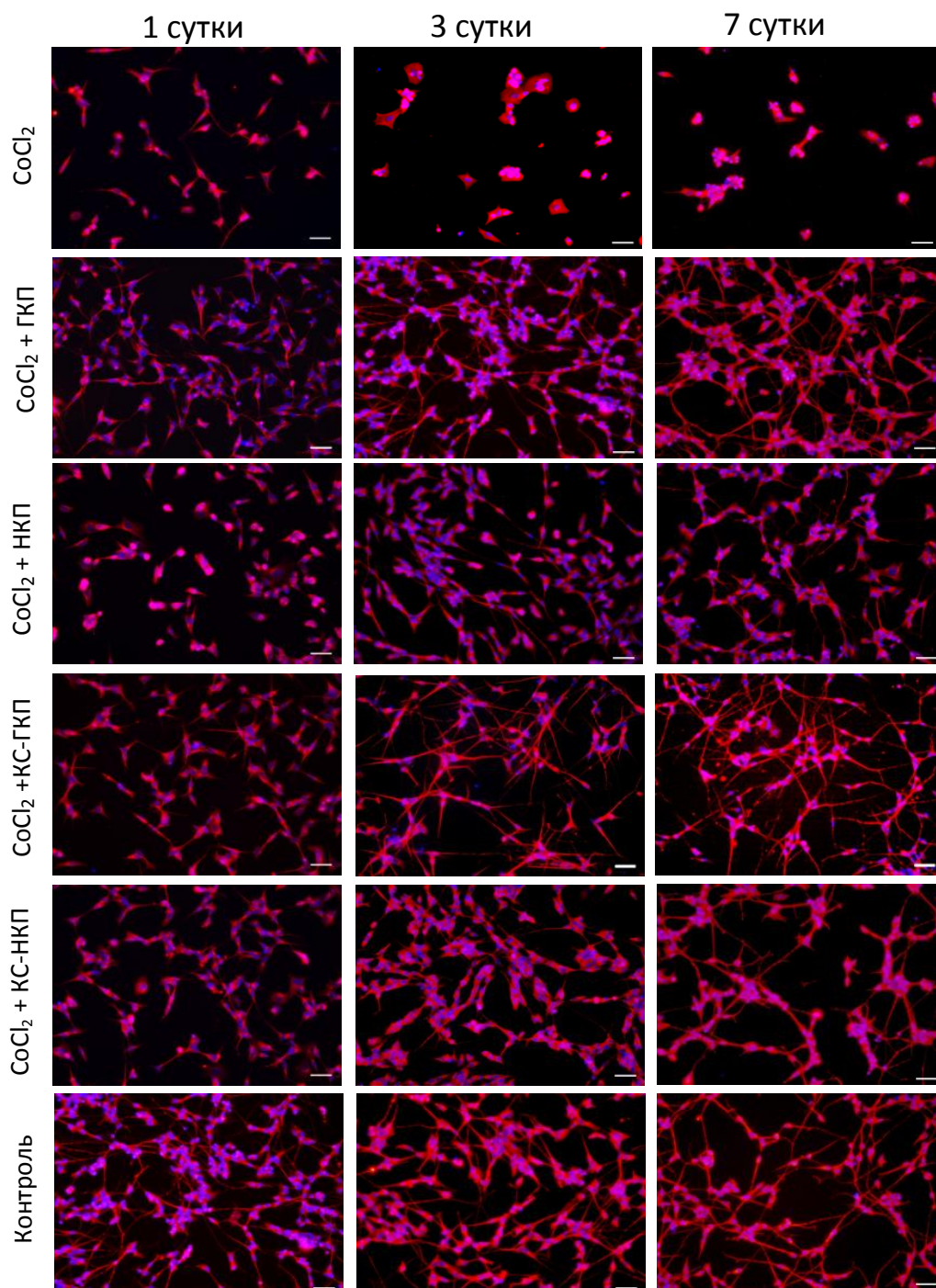


Рисунок 26. Морфология клеточной линии SH-SY5Y. Иммуноцитохимическое окрашивание антителами к β III-тубулину. Ядра окрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок 100 мкм.

Дополнительно степень повреждения нейритов и способность нейронов к репаративным процессам оценивали по экспрессии маркеров нейритогенеза MAP2 и GAP43. Однократное добавление 250 мкМ дихлорида кобальта клеточной линии SH-SY5Y приводила к снижению уровня экспрессии генов MAP2 и GAP43 по сравнению с контрольной группой. Сокультивирование с ГКП

способствовало увеличению экспрессии гена *GAP43* в 2 раза на седьмые сутки и гена *MAP2* в 2 раза на третьи и седьмые сутки эксперимента после моделирования гипоксии. При этом сокультивирование с НКП приводило к усиленной экспрессии гена *GAP43*, но не влияло на увеличение экспрессии гена *MAP2* в клетках нейробластомы. Такие же результаты были получены и при инкубации клеточной линии SH-SY5Y с КС-ГКП и КС-НКП (Рисунок 27).

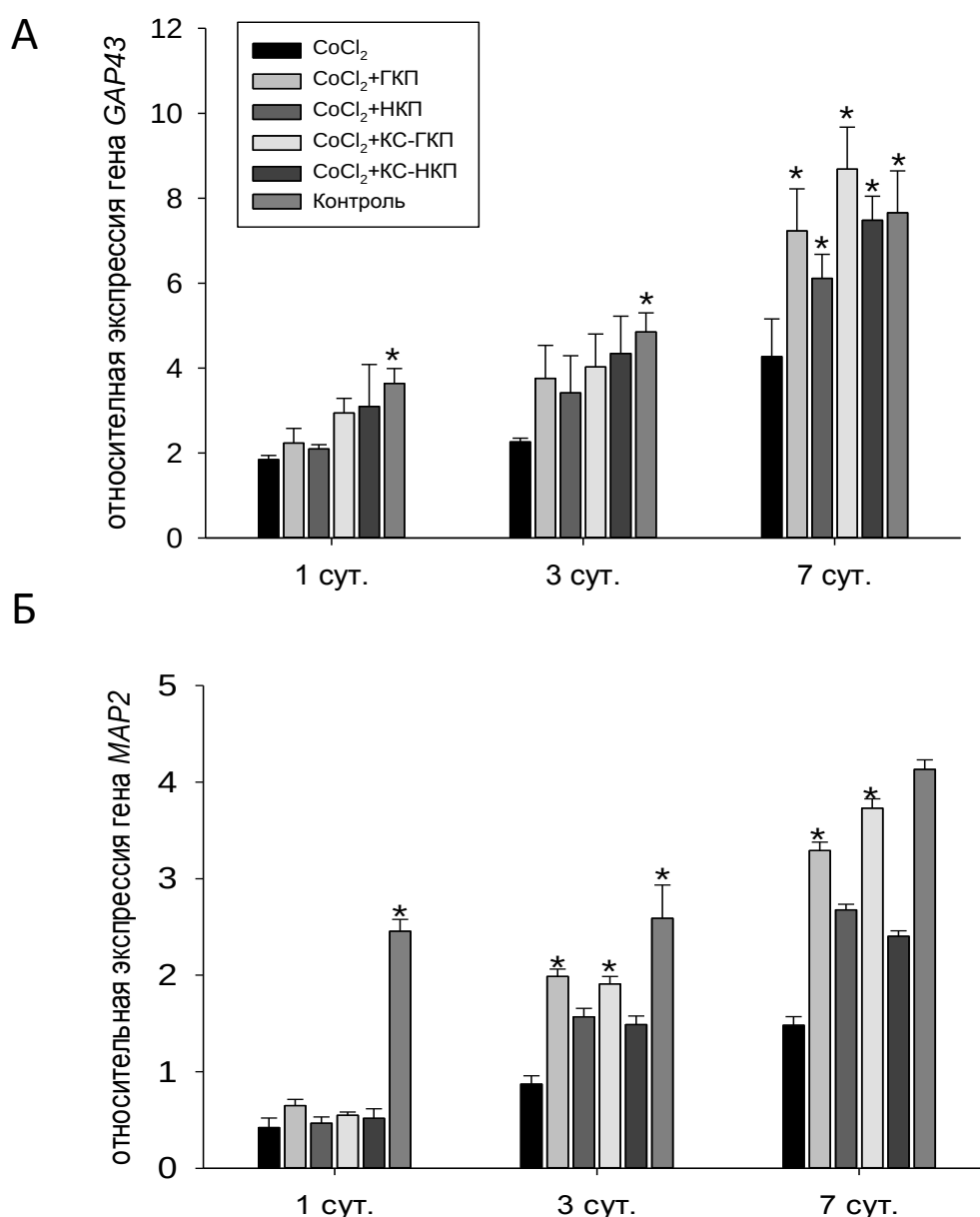


Рисунок 27. Сравнительный анализ экспрессии генов *GAP43* (А) и *MAP2* (Б). ПЦР-РВ. * $p \leq 0,05$ достоверность различий при сравнении с дихлоридом кобальта (CoCl_2). Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

Таким образом, на модели химической гипоксии было показано, что сокультивирование ГКП и НКП с клеточной линией SH-SY5Y способствовало выживанию последних путем уменьшения экспрессии гена *BAX* и увеличения экспрессии гена *BCL2*. При этом ГКП эффективнее увеличивали жизнеспособность клеток нейробластомы. Морфометрический анализ показал, что инкубация с ГКП снижала количество как апоптотических, так и некротических клеток в культуре нейробластомы линии SH-SY5Y. В то время как НКП обладали лишь способностью к уменьшению апоптотических клеток. Также НКП и ГКП, полученные из ИПСК, положительно воздействовали на рост нейритов клеточной линии SH-SY5Y. При этом ГКП обладали более выраженным нейротрофическим действием по сравнению с НКП: была замечена тенденция к росту нейритов на протяжении всего эксперимента и на седьмые сутки экспрессия генов *MAP2* и *GAP43* достигала контрольных значений. При добавлении КС-НКП и КС-ГКП наблюдали те же эффекты.

3.4.2. Сравнительный анализ нейропротективного и прорегенеративного действия нейрональных и глиальных клеток-предшественников на модели глутаматной эксайтотоксичности

3.4.2.1. Оценка жизнеспособности клеток культуры мозжечковых нейронов

С помощью МТТ - и ЛДГ - анализов было установлено, что через 24 часа после инкубации мозжечковых нейронов крысы в присутствии 200 мкМ глутамата происходило снижение числа жизнеспособных нейронов на $51,4 \pm 4,075\%$ и увеличение количества высвобожденного фермента ЛДГ на $23 \pm 2,36\%$ по сравнению с контрольной группой (Рисунок 28). Прединкубация мозжечковых нейронов в течение суток с ГКП оказывало нейропротективное действие, но только в эксперименте с внесением за 24 часа до повреждения. Протекция заключалась в увеличении количества жизнеспособных клеток на $23 \pm 1,66\%$ и снижении высвобождения клетками фермента ЛДГ на $13,23 \pm 3,63\%$. При этом КС-ГКП, оказывая схожее действие, повышала количество жизнеспособных мозжечковых нейронов на $18 \pm 1,42\%$ и уменьшала концентрацию

фермента ЛДГ в культуральной среде мозжечковых нейронов на $14,083 \pm 3,66\%$. Подобного эффекта не было обнаружено при инкубации с НКП или КС-НКП.

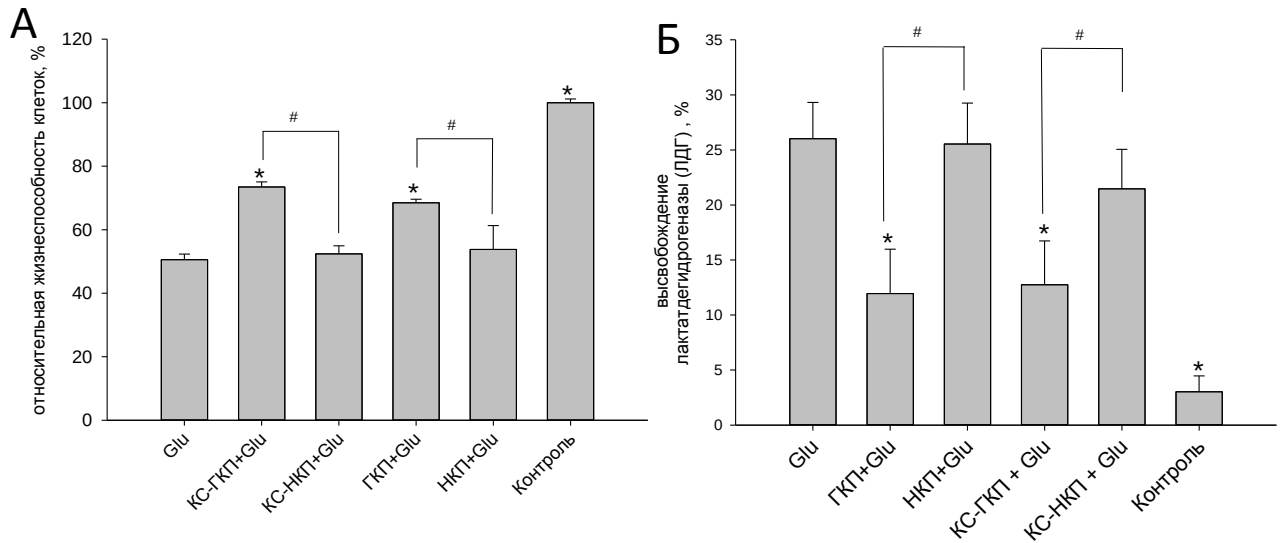


Рисунок 28. Относительная жизнеспособность клеток культуры мозжечковых нейронов. А – МТТ-тест. Б – ЛДГ-тест. * $p \leq 0,05$ достоверность различий при сравнении с глутаматом (Glu); # $p \leq 0,05$ при сравнении НКП и ГКП, а также их КС. Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

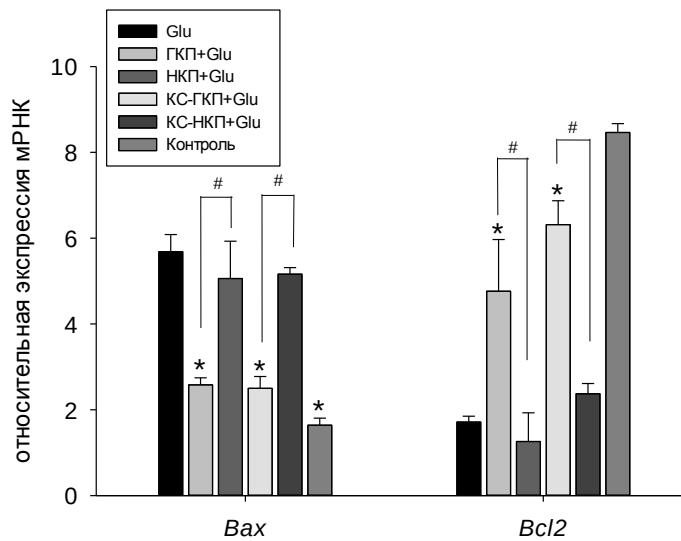


Рисунок 29. Сравнительная экспрессия генов *Bax* и *Bcl2*. ПЦР-РВ. * $p \leq 0,05$ достоверность различий при сравнении с глутаматом (Glu). # $p < 0,05$ при сравнении НКП и ГКП, а также их КС. Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

Для подтверждения жизнеспособности мозжечковых нейронов исследовали экспрессию генов *Bax* и *Bcl2*. Спустя сутки после моделирования глутаматной эксайтотоксичности уровень экспрессии гена *Bcl2* понижался в 5 раз, а гена *Bax*

повышался в 3,5 раза по сравнению с контрольной группой. Сокультивирование с ГКП приводило к снижению экспрессии гена *Bax* в 2,2 раза и к увеличению экспрессии гена *Bcl2* в 2,8 раза в условиях глутаматной эксайтотоксичности. При добавлении КС-ГКП наблюдали те же изменения в экспрессии генов *Bax* и *Bcl2*. Статистически значимых различий в экспрессии генов регуляторов апоптоза при прединкубации с НКП или КС-НКП не было обнаружено (Рисунок 29).

3.4.2.2. Оценка количества некротических и апоптотических клеток

Воздействие глутамата способствовало количественному увеличению апоптотических клеток в 3,3 раза и некротических - в 11 раз по сравнению с контролем. Прединкубация культивируемых мозжечковых нейронов крыс с ГКП приводила к снижению количества апоптотических клеток в 1,5 раза и некротических клеток в 2,2 раза. При этом КС-ГКП действовала схожим образом, уменьшая количество апоптотических клеток в 1,5 раза и некротических клеток в 3,6 раза. Сокультивирование с НКП и добавление КС-НКП не повлияло на изменение количества некротических и апоптотических клеток в культуре мозжечковых нейронов (Рисунок 30).

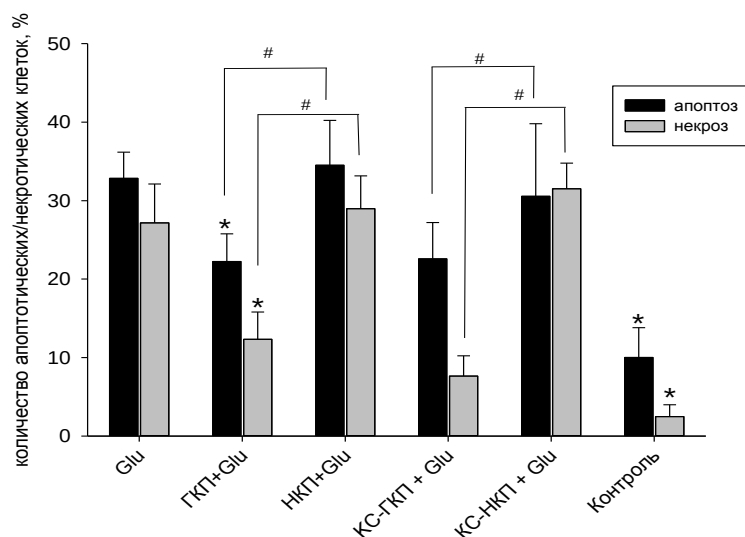
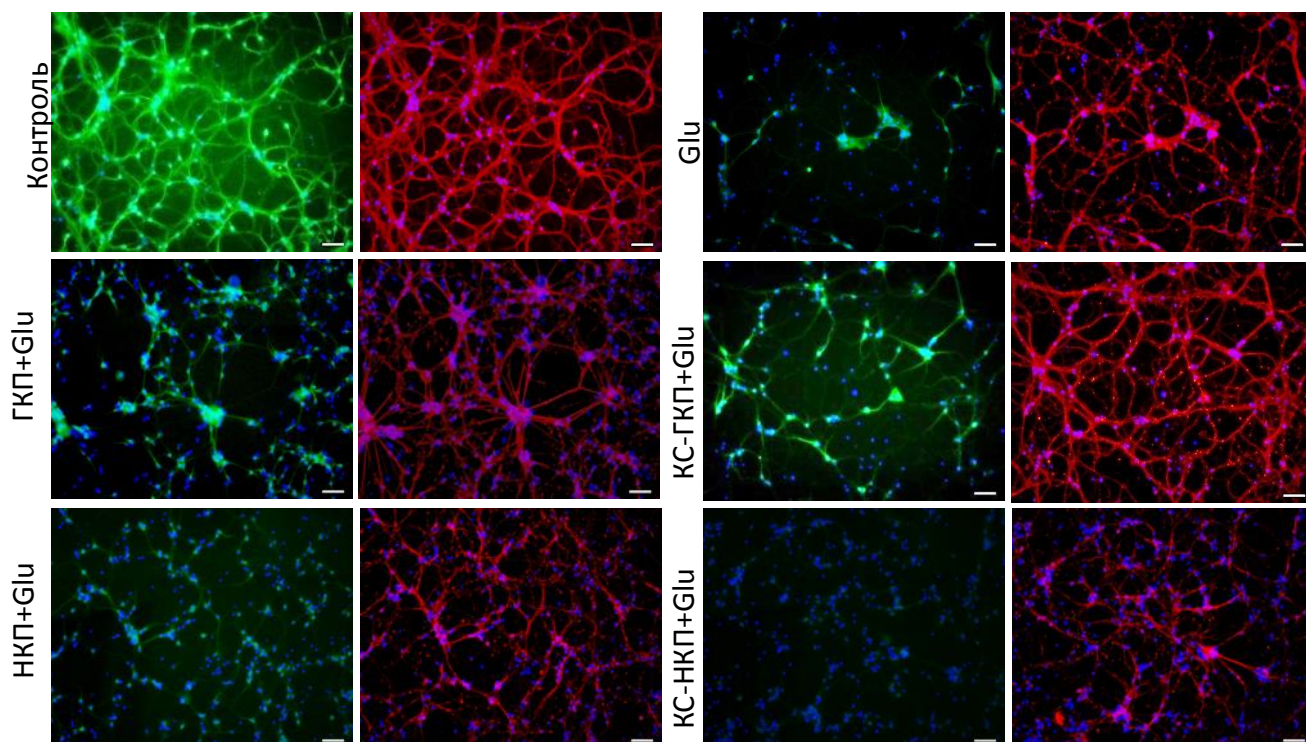


Рисунок 30. Количество апоптотических и некротических клеток в культуре мозжечковых нейронов. * $p \leq 0,05$ достоверность различий при сравнении с глутаматом (Glu); # $p \leq 0,05$ при сравнении НКП и ГКП, а также их КС. Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

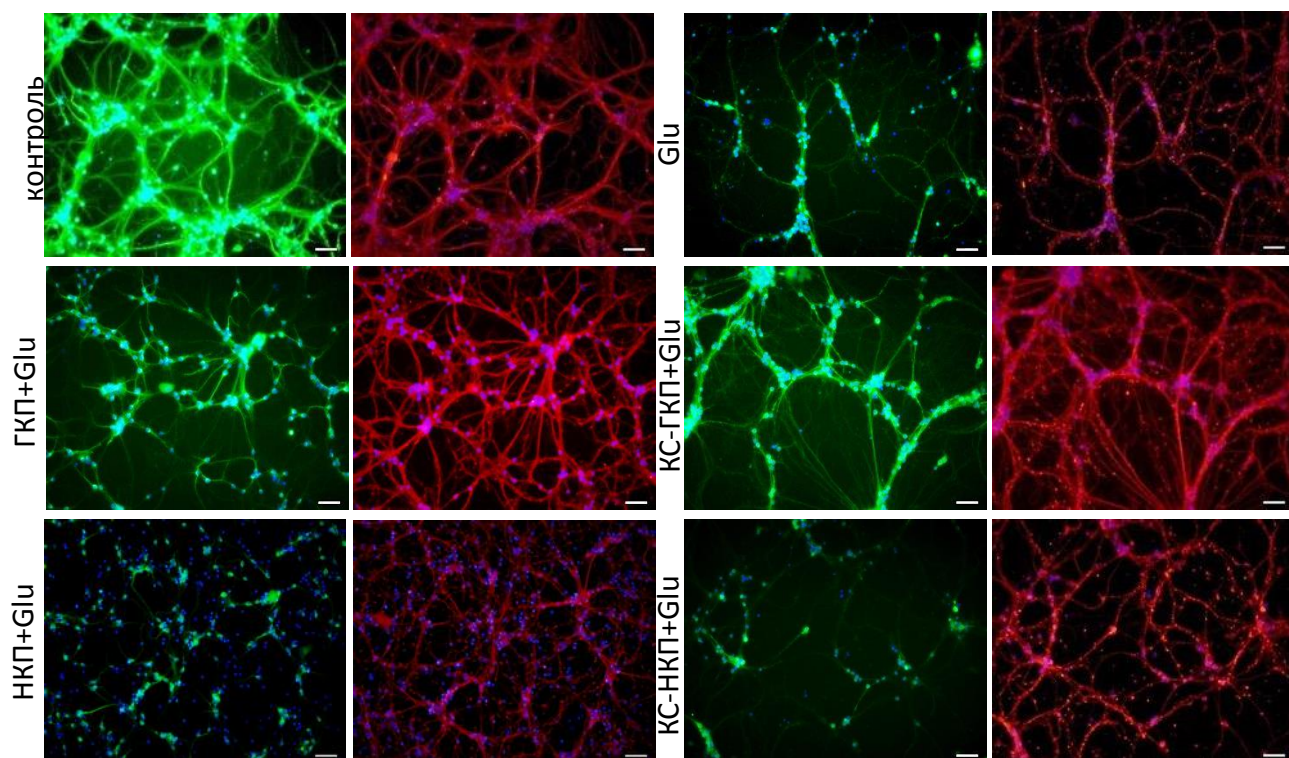
3.4.2.3. Оценка роста нейритов

Степень повреждения аксонов и дендритов оценивали по экспрессии маркеров нейритогенеза MAP2 и GAP43, участвующих в пластичности и регенерации нервных волокон. При глутаматной эксайтотоксичности на протяжении 7 суток у мозжечковых нейронов наблюдали дегенеративные процессы в нейритах, которые проявляли морфологически по иммуноцитохимическому окрашиванию антителами к β III-тубулину и MAP2, а также по экспрессии их генов с помощью ПЦР-анализа в режиме реального времени (Рисунки 31, 32). В контроле выявляли клетки с ветвящимися нейритами, которые хорошо окрашивались антителами к β III-тубулину и MAP2, и уровень экспрессии их генов был превышен в 2 раза по сравнению с культурой мозжечковых нейронов при глутаматной эксайтотоксичности. Сокультивирование с ГКП приводило к регенерации нейритов мозжечковых нейронов в условиях глутаматной эксайтотоксичности: на седьмые сутки эксперимента увеличивался уровень экспрессии генов *Map2* в 3,56 раза и *Gap43* в 2 раза. КС-ГКП обладала подобными свойствами: на третьи сутки происходило изменение уровня мРНК гена *Gap43*, на седьмые сутки возрастала экспрессия генов *Gap43* и *Map2* в 2 раза. Также путем морфологического анализа было выявлено наличие нейритов в культурах мозжечковых нейронов, где происходила инкубация с ГКП или КС-ГКП. НКП и их КС не оказывали влияния на рост аксонов и дендритов, а также экспрессию генов *Map2* и *Gap43* в условиях глутаматной эксайтотоксичности.

1 сутки



3 сутки



7 сутки

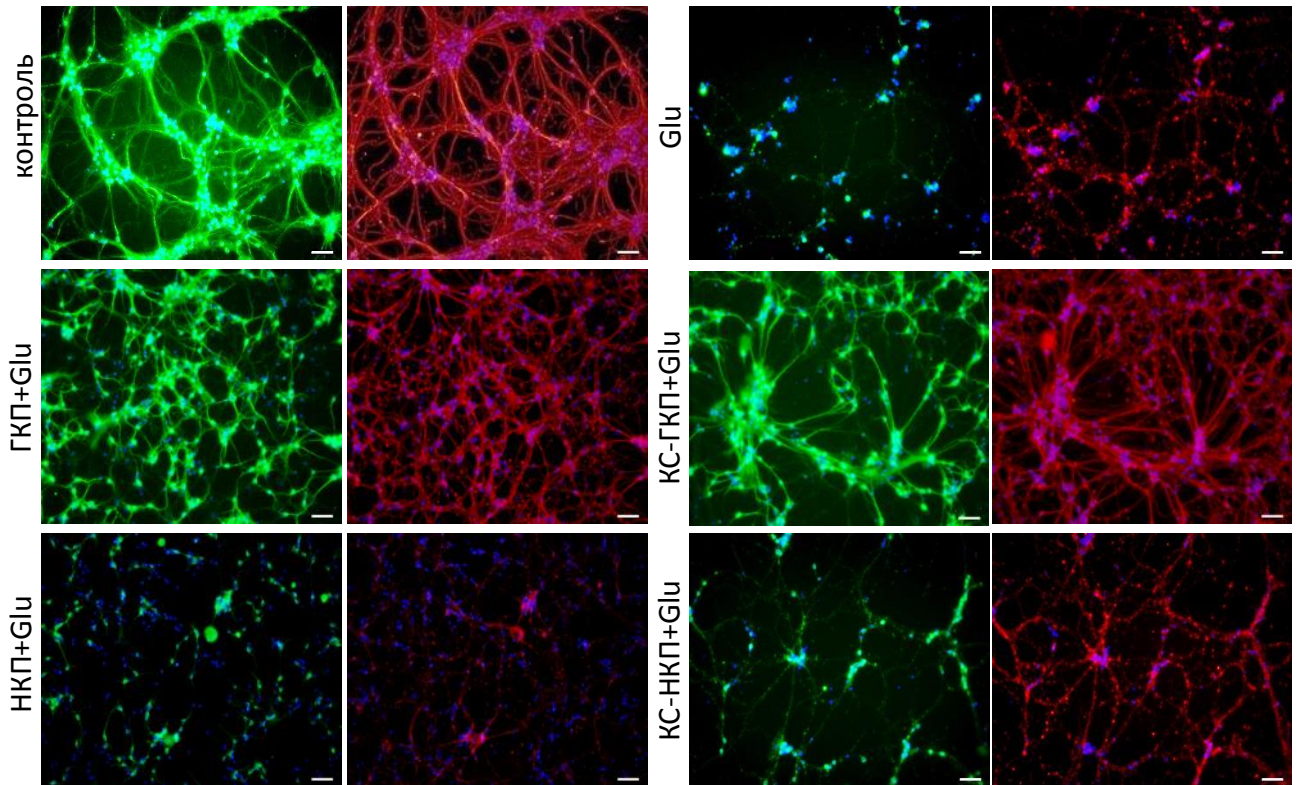


Рисунок 31. Морфология клеток в культуре мозжечковых нейронов. Иммуноцитохимическое окрашивание антителами к MAP2 (зеленый) и β III-тубулину (красный). Ядра окрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок 100 мкм.

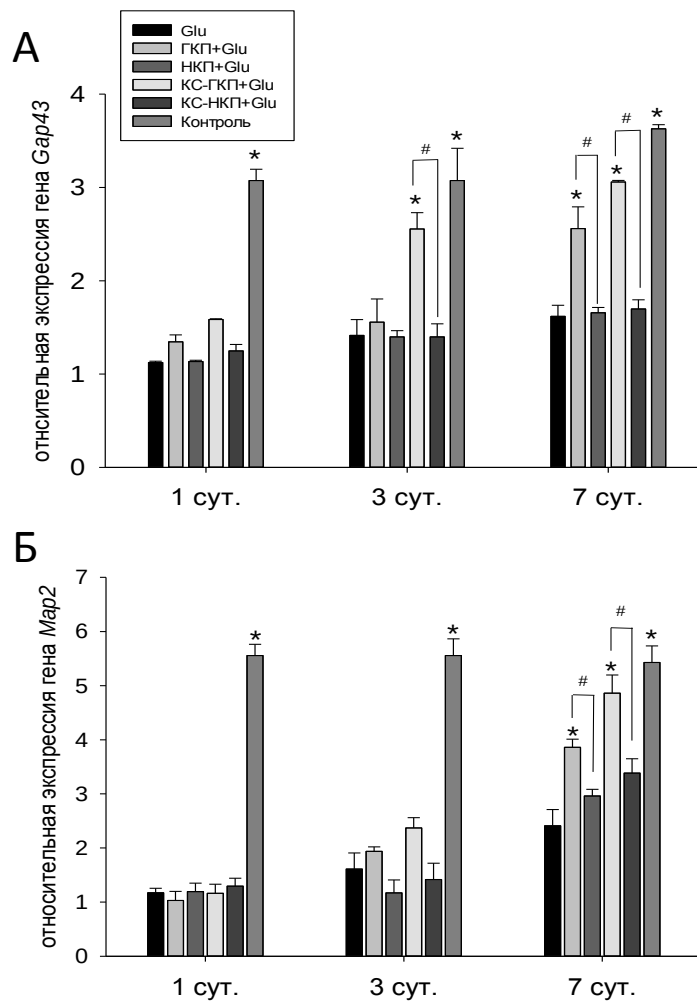


Рисунок 32. Сравнительный анализ экспрессии генов *Gap43* (А) и *Map2* (Б). ПЦР-РВ. * $p \leq 0,05$ достоверность различий при сравнении с глутаматом (Glu); # $p \leq 0,05$ при сравнении двух культур и их КС. Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

Таким образом, на модели глутаматной эксайтотоксичности было показано, что сокультивирование ГКП с культурой мозжечковых нейронов способствует увеличению выживания последних на $23 \pm 2,36\%$. Инкубация с ГКП уменьшала количество апоптотических клеток в культуре мозжечковых нейронов путем снижения экспрессии гена *Bax* и увеличения экспрессии гена *Bcl2*. Сокультивирование с ГКП приводило к снижению высвобождения мозжечковыми нейронами фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ) на $13,23 \pm 3,63\%$, тем самым уменьшая количества некротических клеток в культуре. КС-ГКП оказывала схожее действие на мозжечковые нейроны, повышая их жизнеспособность путем уменьшения количества апоптотических и некротических клеток в культуре.

Подобного эффекта не было обнаружено при инкубации с НКП и КС-НКП. Также ГКП положительно влияли на рост нейритов мозжечковых нейронов, которое было морфологически определено с помощью иммуноцитохимического окрашивания антителами к β III-тубулину и MAP2. Сокультивирование увеличивало уровень экспрессии маркеров нейритогенеза *Map2* и *Gap43* на седьмые сутки эксперимента. При добавлении КС-ГКП наблюдали те же эффекты. Напротив, инкубация с НКП или КС-НКП не оказывала положительного действия на регенерацию и рост нейритов.

3.5. Анализ нейропротективного действия кондиционированных сред глиальных и нейрональных клеток-предшественников на модели экспериментального инфаркта мозга у крыс

3.5.1. Терапевтические эффекты внутриартериального введения кондиционированных сред глиальных и нейрональных клеток-предшественников

3.5.1.1. Оценка выживаемости животных

Кривые выживаемости Каплана-Мейера для сравниваемых групп можно увидеть на Рисунке 33А. Как видно, животные во всех группах погибли в течение первых 3 дней после ОСМА, что связано с образованием вазогенного отека. Попарное сравнение групп с помощью t-теста показало, что достоверных различий между группами не было зафиксировано. Таким образом, введение КС-ГКП или КС-НКП не оказывало влияния на выживаемость животных.

3.5.1.2. Оценка неврологического дефицита

Животные всех групп подвергали тестированию по шкале mNSS в динамике: до введения КС, на 7-е, 14-е, 30-е сутки после введения. Максимальный неврологический дефицит отмечался к 1-м суткам после моделирования острой фокальной ишемии во всех группах, что обусловлено процессом формирования очага инфаркта головного мозга. Затем во всех группах отмечался регресс неврологического дефицита, наиболее интенсивно происходивший в первые 2 недели эксперимента. В группе с введением КС-ГКП степень выраженности неврологического дефицита была достоверно ниже на 14-е сутки в 1,5 раза и на 30-е сутки в 1,6 раза по сравнению с контрольной группой (Рисунок 33Б). Следует отметить, что к 7-м суткам в группе с введением КС-НКП отмечался более выраженный регресс неврологической симптоматики. Однако достоверных различий между группами контроля и терапией КС-НКП по показателям mNSS отмечено не было на протяжении всего эксперимента.

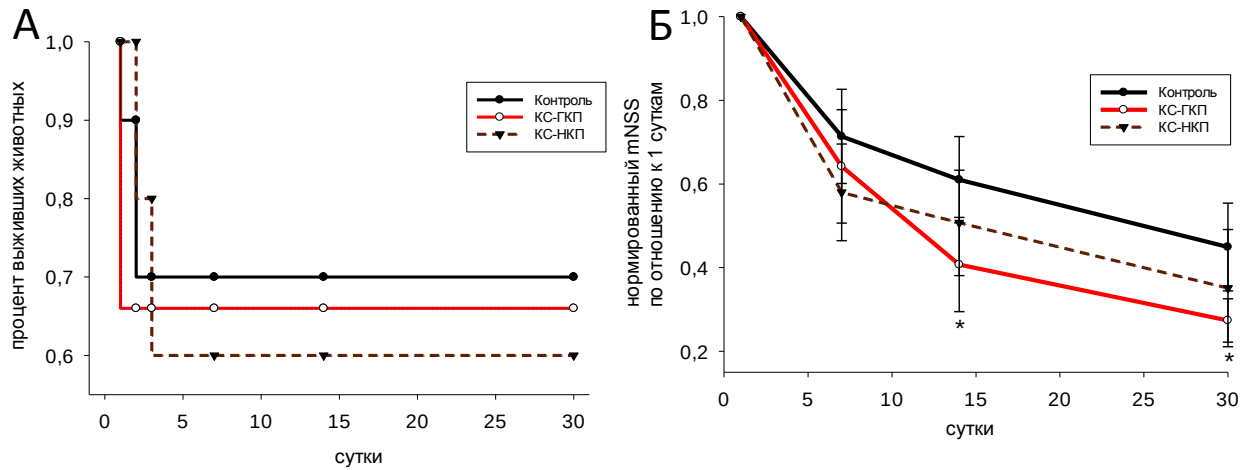


Рисунок 33. Выживаемость и изменение неврологического дефицита животных. А - кривые выживаемости Каплана-Мейера. Б - динамика нормированного mNSS. * $p \leq 0,05$ достоверность различий от группы контроля. Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

3.5.1.3. Оценка изменения объема очага инфаркта

Для оценки объема очага инфаркта использовали T2-взвешенные МРТ-изображения, полученные в динамике.

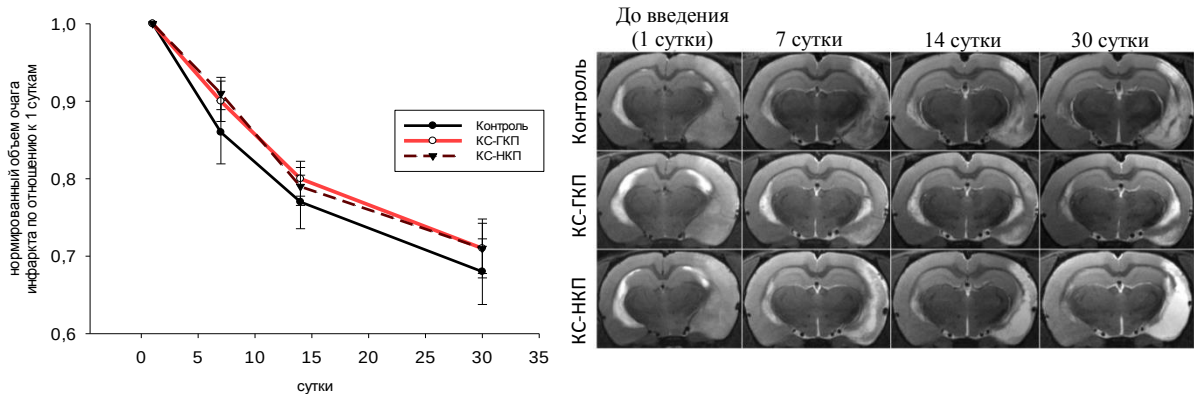


Рисунок 34. Анализ изменения объема очага инфаркта. Гиперинтенсивные (светлые) зоны соответствуют зонам инфаркта. T2-взвешенные изображения (T2-ВИ) мозга крыс 3-х групп. Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

Во всех группах отмечалось уменьшение объема очага ишемии головного мозга в течение всего срока наблюдения. Однако статистически значимых различий между группами не было выявлено (Рисунок 34).

3.5.1.4. Оценка безопасности кондиционированных сред

На протяжении всего эксперимента наблюдалось состояние животных. Контроль осуществлялся с проведением МРТ-диагностики, общего состояния животных и оценке их массы тела. МРТ исследование головного мозга, проведенное животным с экспериментальным инсультом после инфузии КС, не выявило осложнений, в том числе тромбоэмболии введенным веществом, новых зон ишемии и участков обширной геморрагической трансформации зоны инфаркта. Состояние животных относительно группы контроля было удовлетворительное на протяжении всего эксперимента. У животных в группах с введением КС не наблюдали уменьшение массы тела и усиление степени выраженности неврологического дефицита по сравнению с контрольной группой.

3.5.2 Гистологическое и молекулярно-генетическое исследование головного мозга крыс при инфузии кондиционированных сред глиальных и нейрональных клеток-предшественников в условиях острой фокальной ишемии

3.5.2.1. Оценка изменения профиля экспрессии генов в тканях в области повреждения мозга

Для поиска молекулярно-генетических механизмов терапевтического воздействия исследуемых секретомов НКП и ГКП изучали экспрессию генов регуляторов апоптоза, нейритогенеза и воспаления с помощью ПЦР-РВ (Рисунок 35). После введения КС-ГКП уровень гена позитивного регулятора апоптоза *Bax* статистически значимо снижался по сравнению с контрольной группой. Аналогичный уровень экспрессии гена *Bax* был зафиксирован в интактном полушарии (ИП). Введение КС-НКП способствовало увеличению экспрессии гена *Bax* в 2,4 раза по сравнению с интактным полушарием (ИП) и группой с инфузией КС-ГКП. При этом значимых различий в экспрессии гена *Bcl2* между группами сравнения не было обнаружено (Рисунок 35А). Была изучена экспрессия генов *Erk1* и *Erk2*, участвующих в сигнальном пути MAPK/ERK. Данный путь активируется сигнальными молекулами, такими как гормоны, факторы роста, хемокины и нейротрансмиттеры, которые распознаются соответствующими рецепторными тирозинкиназами или рецепторами, ассоциированными с G-белками. Активация MAPK/ERK-пути способствует выживанию, пролиферации и увеличению подвижности клеток. Различия в экспрессии гена *Erk1* были выявлены при сопоставлении групп с введением КС. Уровень экспрессии гена *Erk1* был ниже в группе с введением КС-НКП (Рисунок 35Б). Активацию ангиогенеза оценивали по экспрессии гена *Vegfa*, которая была увеличена в группах с введением КС-ГКП, КС-НКП и интактном полушарии (ИП) по сравнению с контролем.

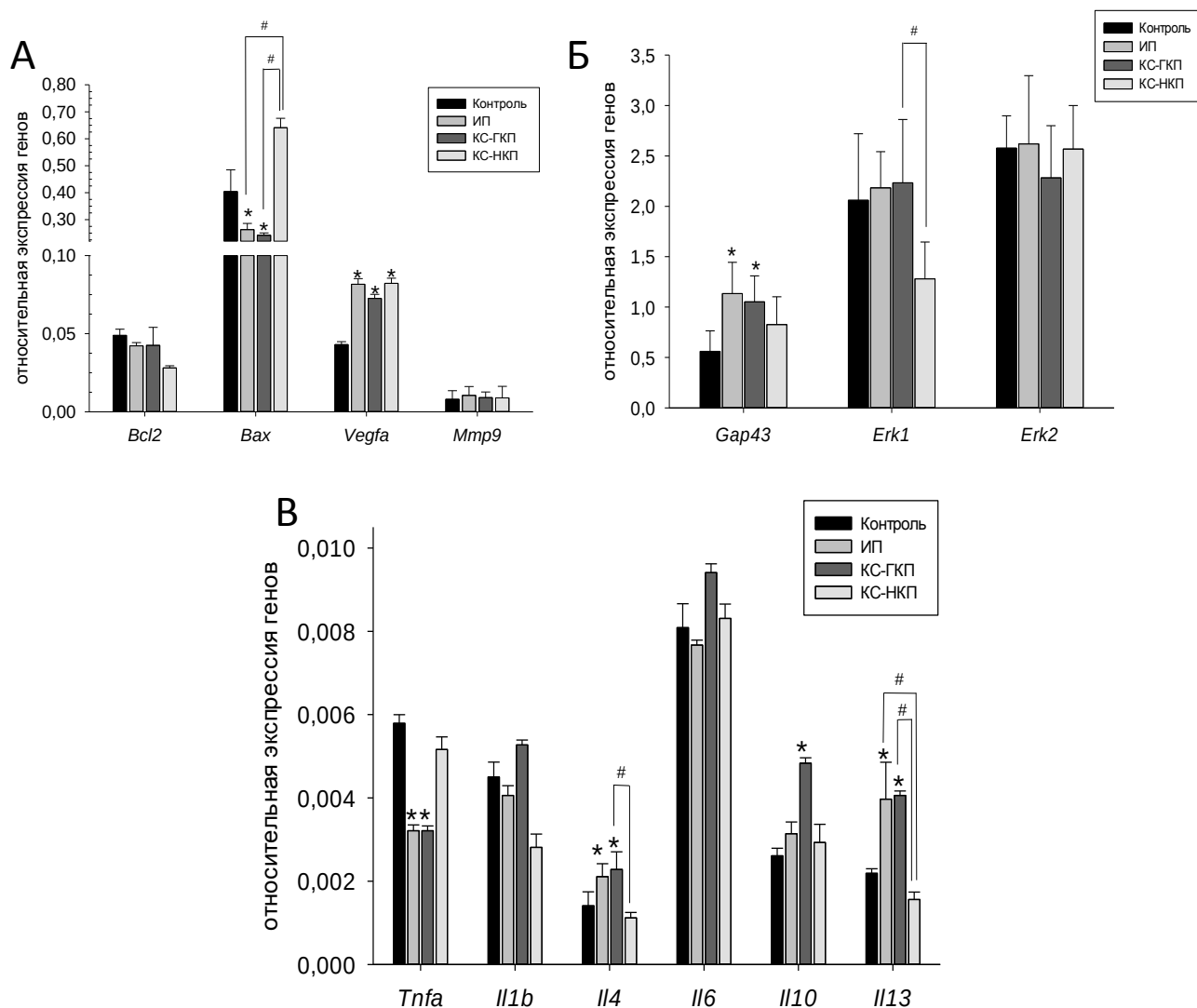


Рисунок 35. Относительная экспрессия генов. ПЦР-РВ. А-экспрессия генов *Vegfa*, *Mmp9* и регуляторов апоптоза *Bcl2* и *Bax*. Б - экспрессия генов, участвующих в сигнальном пути MAPK/ERK, и маркера нейритогенеза *Gap43*. В - экспрессия генов про-и противовоспалительных цитокинов. * $p \leq 0,05$ достоверность различий от группы контроля; # $p \leq 0,05$ при сравнении КС, полученных от двух культур. Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

Способность нейронов к репаративным процессам, в том числе пластичности, росту и регенерации нейритов оценивали по экспрессии гена *Gap43*. Уровень экспрессии гена *Gap43* был выше в группе с введением КС-ГКП и в интактном полушарии (ИП) по сравнению с группой контроля. При этом различий не было обнаружено при введении КС-НКП по сравнению с контролем (Рисунок 35Б).

Сосудистый некроз тканей головного мозга вызывает вторичное, зачастую отсроченное поражение тканей за счет продолжающегося воспаления. Данная реакция сопровождается выработкой провоспалительных цитокинов и факторов роста. Повышенная экспрессия гена *Tnfa* усиливает выраженность поражений при очаговой церебральной ишемии. Введение КС-ГКП уменьшало экспрессию гена *Tnfa* и достоверно усиливало экспрессию генов противовоспалительных цитокинов *Il4*, *Il10* и *Il13* в зоне ишемии головного мозга по сравнению с контролем. В группе с терапией КС-НКП уровень экспрессии генов *Tnfa*, *Il4*, *Il10* и *Il13* был сопоставим с уровнем в контрольной группе (Рисунок 35В). Статистически значимых различий не было выявлено в экспрессии генов *Mmp9*, *Il1b* и *Il6* во всех группах сравнения.

3.5.2.2. Гистологическое исследование

Во всех исследуемых группах на 30 сутки после ИИ наблюдали на месте некротизированного участка сформированные псевдокисты разного размера, образованные вследствие ограниченных регенеративных способностей тканей мозга; небольшое количество клеток, измененных по ишемическому типу; а также незначительный перицеллюлярный и периваскулярный отеки в перифокальной области (Рисунок 36). Гистологическое исследование показало, что введение КС-ГКП и КС-НКП способствовала неоангиогенезу. В группе КС-ГКП в области повреждения мозга морфометрическим анализом было установлено наибольшее количество новообразованных сосудов, что статистически достоверно по сравнению с группой контроля. При этом объемная плотность сосудов была выше в несколько раз в группе с введением КС-НКП (Рисунок 37).

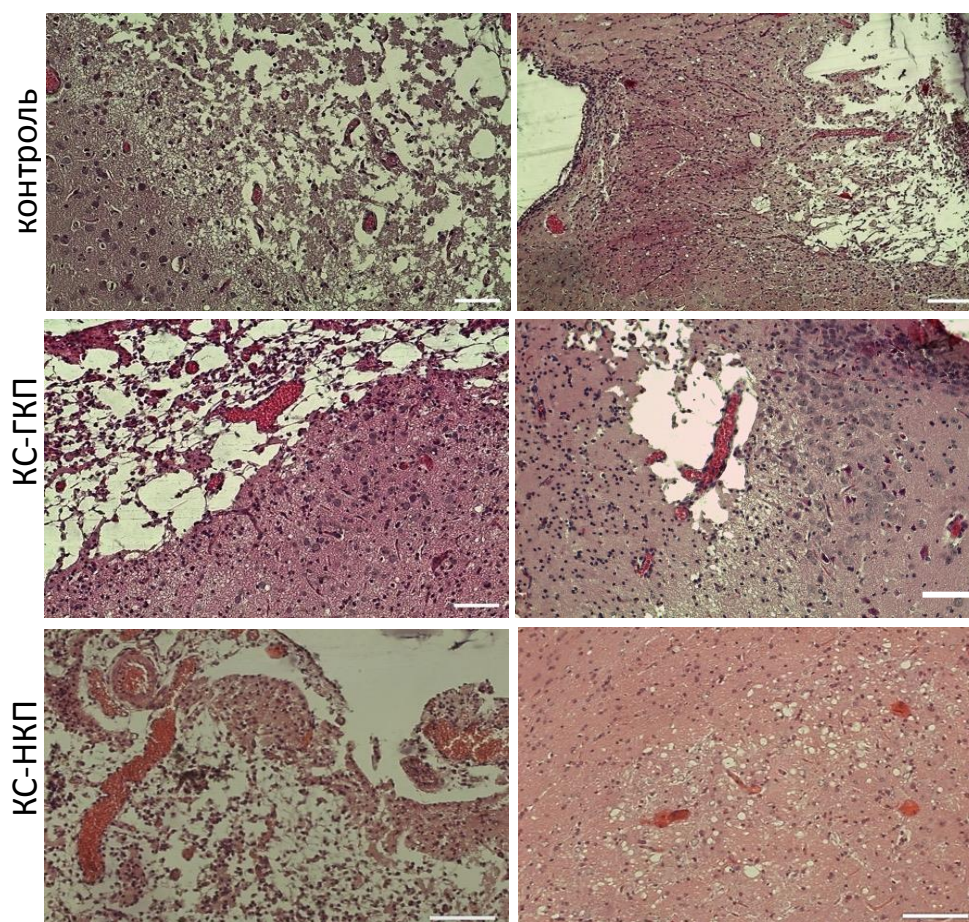


Рисунок 36. Результаты гистологического исследования ткани головного мозга крыс. Фазово-контрастная микроскопия. Масштабный отрезок 200 мкм. Окраска гематоксилином и эозином.

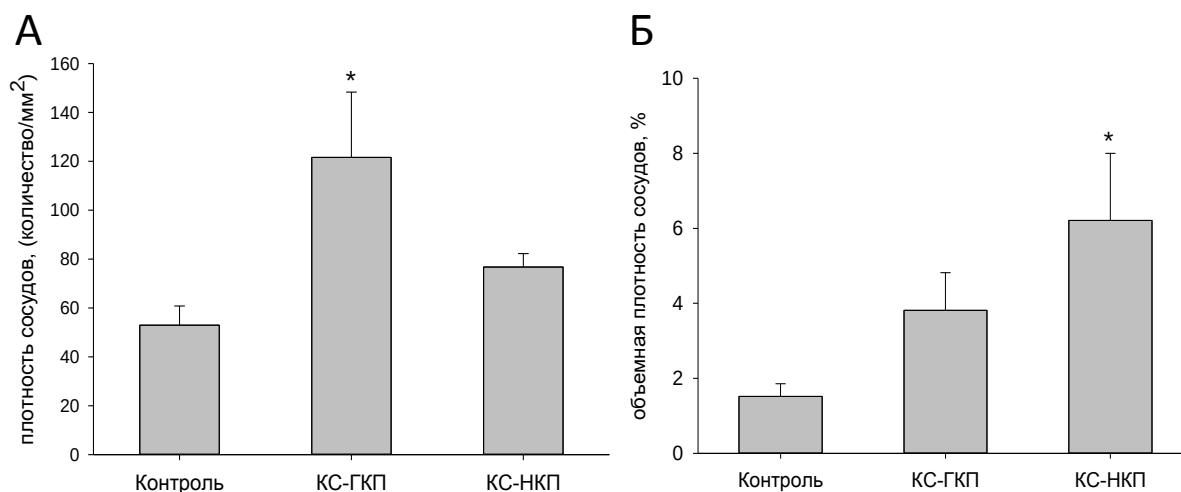


Рисунок 37. Изменение сосудистой плотности при введении кондиционированных сред, полученных от НКП и ГКП. А – количество кровеносных сосудов на 1 мм² площади среза ткани мозга. Б – объемная плотность кровеносных сосудов (отношение площади сосудов к 1 мм² площади среза). * $p \leq 0,05$ достоверность различий от группы контроля. Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

Воспалительная реакция в головном мозге в ответ на ишемическое повреждение характеризуется быстрой активацией и пролиферацией микроглиальных клеток с последующей инфильтрацией нейтрофилов, макрофагов моноцитарного происхождения и других воспалительных клеток в ишемизированную область мозга. Активация микроглии происходит в течение нескольких минут и может длиться несколько недель после начала очаговой ишемии головного мозга (Jin R. et al., 2010). Активированные клетки микроглии/макрофаги производят множество провоспалительных медиаторов, в том числе $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ и IL-6 , которые способствуют отеку мозга после окклюзии средней мозговой артерии у крыс (Tikka T. et al., 2001).

Данные настоящего исследования показали, что через 30 суток после экспериментального инсульта было обнаружено скопление CD68^+ -клеток (маркер фагоцитирующих клеток резидентной микроглии и мигрирующих моноцитарных макрофагов) в области повреждения мозга. Введение КС-ГКП способствовало достоверному уменьшению количества фагоцитирующих клеток по сравнению с контролем. При этом в группе с инфузией КС-НКП наблюдали увеличение количества CD68^+ -клеток, хотя статистически значимых различий по сравнению с контрольной группы обнаружено не было (Рисунок 38).

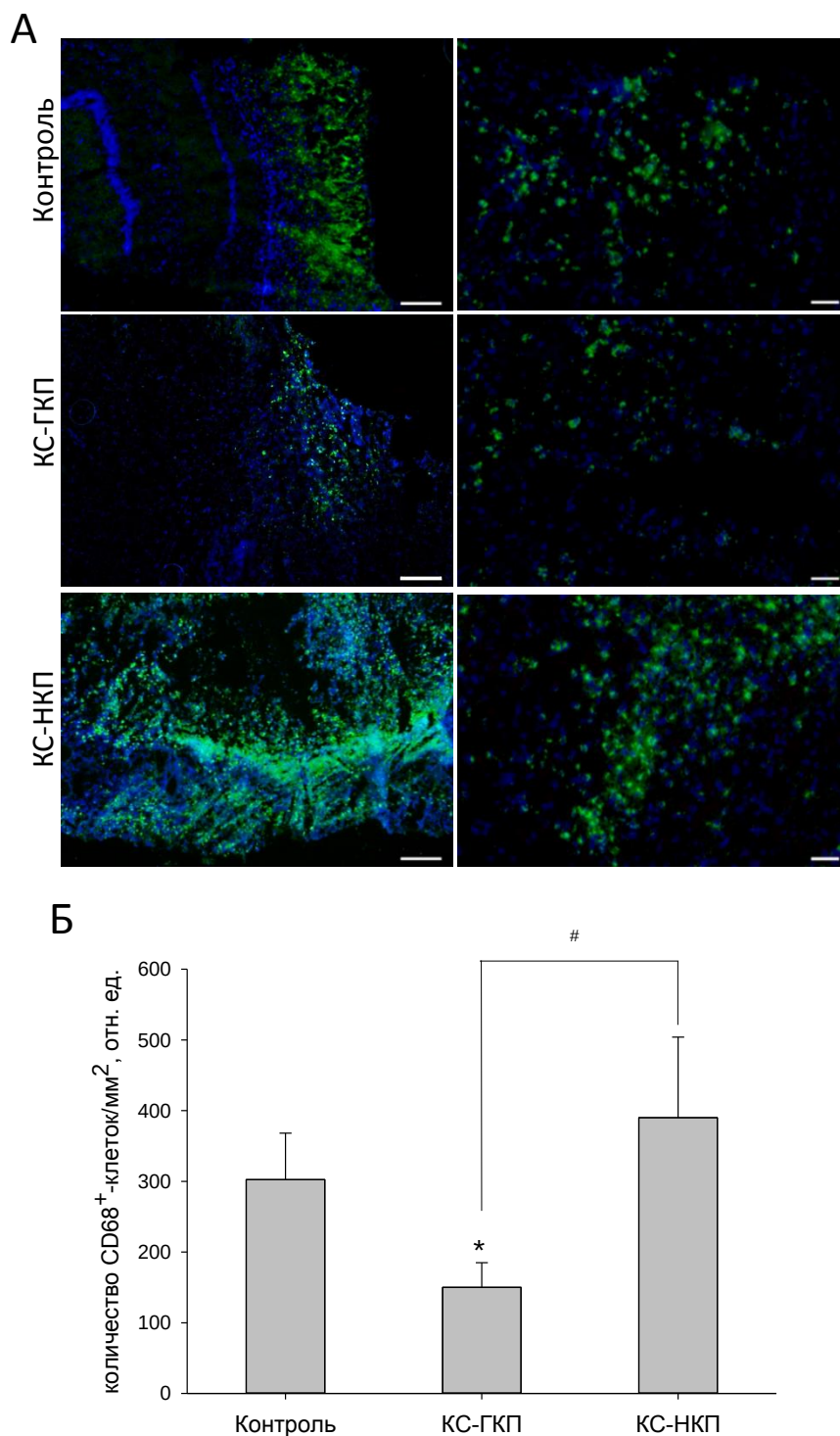


Рисунок 38. Качественная и количественная оценка фагоцитирующих клеток резидентной микроглии и мигрирующих моноцитарных макрофагов в ишемизированной области мозга. А – иммуногистохимическое окрашивание антителами к CD68 (зеленый). Ядра окрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок 100 мкм. Б – количественная оценка CD68⁺-клеток, рассчитанное на 1 мм² площади среза ткани мозга. * $p \leq 0,05$ достоверность различия от группы контроля; # $p \leq 0,05$ при сравнении групп с введением КС-НКП и КС-ГКП. Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

Гибель нейронов в паренхиме мозга приводит к активации микроглиальных клеток, которые на разных стадиях ИИ могут приобретать M1 провоспалительный фенотип, либо M2 противовоспалительный/прорегенераторный фенотип и регулировать репаративные процессы.

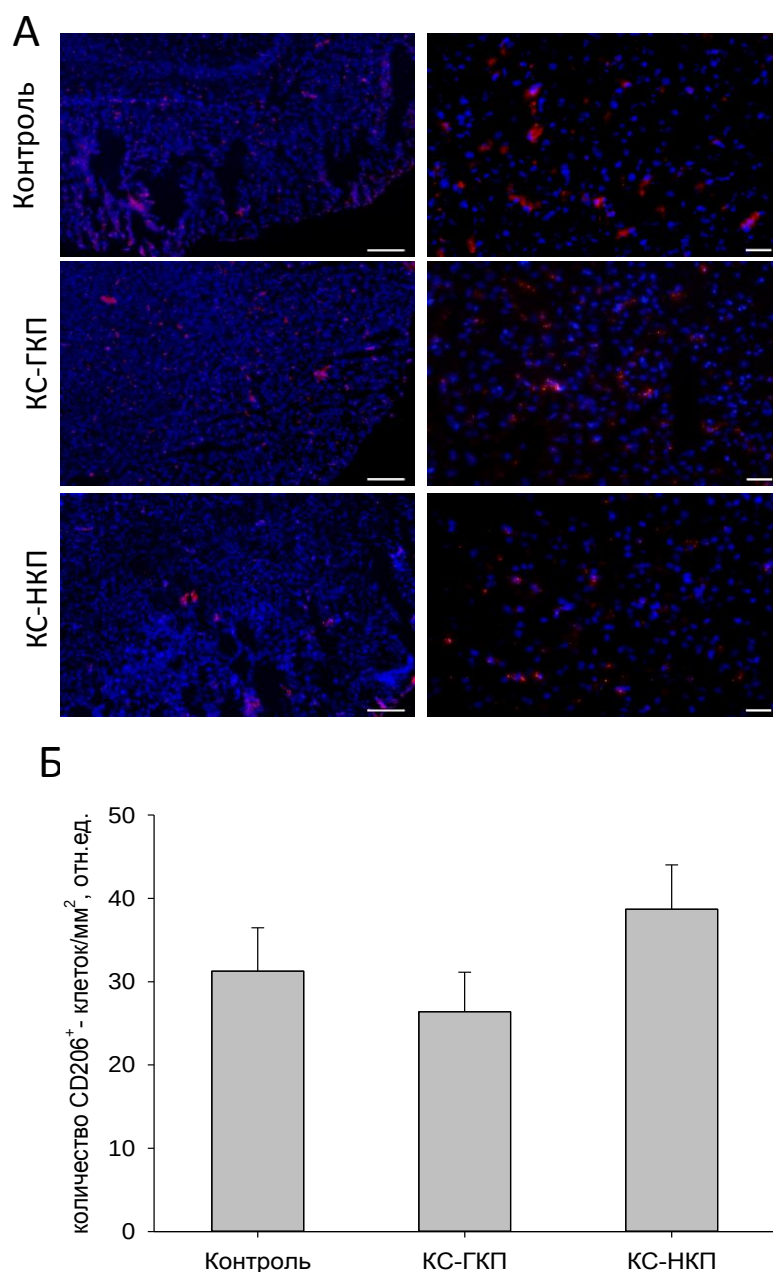


Рисунок 39. Качественная и количественная оценка макрофагов, активированных по M2 фенотипу. А – иммуногистохимическое окрашивание антителами к CD206 (красный) в ишемизированной области. Ядра окрашены DAPI (синий). Масштабные отрезки 50 и 100 мкм. Б – количественная оценка CD206⁺-клеток, рассчитанное на 1 мм² площади среза ткани мозга. Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

На 30 сутки эксперимента в области повреждения мозга наблюдали единичные клетки, иммунопозитивные к маркеру макрофагов M2 фенотипа - CD206 (маннозный рецептор). Причем статистически значимых отличий по количеству CD206⁺-клеток в группах сравнения не было обнаружено (Рисунок 39).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об эффективном функциональном восстановлении животных в ответ на введение КС-ГКП в остром периоде инсульта. Терапевтическое действие КС-ГКП обусловлено изменением экспрессии ряда генов, в том числе противовоспалительных цитокинов, членов семейства BCL2; повышением количества новообразованных сосудов и уменьшением количества фагоцитирующих CD68⁺-клеток в ишемизированной области мозга. КС-НКП в данном эксперименте не оказывала терапевтического действия, за исключением способности к увеличению объемной плотности сосудов в области повреждения мозга.

4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате репрограммирования дермальных фибробластов здоровых доноров были отобраны и охарактеризованы линии IPS1.1S, IPS1.2S, IPS1.3S, полученные с помощью трансдукции вирусом Сендай, и линия IPSRG2L, полученная с помощью лентивирусной инфекции. Все линии имели ЭСК-подобную морфологию и нормальный диплоидный набор хромосом 46XY. Линии IPS1.1S, IPS1.2S, IPS1.3S и IPSRG2L подтвердили плюрипотентный статус посредством экспрессии генов *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* и по наличию поверхностных маркеров SSEA4, TRA-1-81 и транскрипционных факторов OCT4, NANOG. Для функционального подтверждения плюрипотентного состояния линии ИПСК тестировали на способность к образованию эмбрионных тел и дифференцировке в мезодермальном, эктодермальном и энтодермальном направлениях (три зародышевых листка). Линии IPS1.1S, IPS1.2S, IPS1.3S и IPSRG2L формировали эмбрионные тельца и после этапа спонтанной дифференцировки образовывали производные трех зародышевых листков. Для избегания рутинного механического пересева нейральных розеток (НСК) необходим дальнейший отбор линий на способность к эффективной дифференцировке в нейральном направлении. С помощью анализа проточной цитометрии с последующим иммуноцитохимическим окрашиванием антителами к общенейральному маркеру PAX6, было показано, что линии IPS1.1S и IPSRG2L, полученные интеграционным и неинтеграционным методами, после окончания дифференцировки состояли на $98,4 \pm 1,54\%$ и $88 \pm 6,78\%$, соответственно, из НСК. В то время как в дифференцированных культурах IPS1.2S и IPS1.3S количество PAX6⁺-клеток было примерно в 2 раза меньше. Скорее всего, способность к нейральной дифференцировке является индивидуальной особенностью линии и не зависит от метода получения ИПСК. Ранее подобные результаты были получены Бао-Ян Ху, который показал вариабельность количества нейральных стволовых клеток в культурах после дифференцировок ИПСК, полученных с помощью лентивирусной и эписомальной доставки векторов репрограммирования (Hu B. et al., 2010).

Дальнейшая отработка протоколов дифференцировок в нейрональном и глиальном направлениях позволила воспроизводимо получать из НСК нейрональные и глиальные клетки-предшественники, морфологически отличимые друг от друга, и экспрессирующие маркеры, соответствующие их клеточным фенотипам - нейронального β III-тубулина и глиального маркера S100 β .

Для изучения паракринного механизма действия необходимо понимание состава секретомов НКП и ГКП. Для изучения секреторной активности культур были выполнены протеомный и иммуноферментный анализы КС. Так, с применением протеомного анализа наибольшее количество белков (304) было выявлено в КС-НКП. Среди них было обнаружено 136 пептидов, секретируемых только данным типом клеток. В КС-ГКП было установлено 243 белка, 75 из них секретируются только данной культурой. Было выявлено 168 пептидов, присутствующих в КС двух культур (Рисунок 40). Обнаруженные протеомом анализом белки были распределены по биологическим функциям на основе данных литературы и базы Uniprot. Распределение белков по функциональным особенностям показало в секретах двух культур наличие различных регуляторных молекул, обладающих нейропротективными, иммуномодулирующими и прорегенеративными свойствами. Как следует из литературных данных, нейротрофины являются секреторными белками, поддерживающими жизнеспособность нейронов. Данные белки не были обнаружены при протеомном анализе, но их количество было оценено с помощью ИФА. Согласно полученным данным, наибольшая секреция нейротрофических факторов BDNF, GDNF, CNTF и NGF была обнаружена в секрете ГКП, что согласуется с данными литературы (Gozes I. et al., 2004; Jha M. et al., 2018; Kuno R. et al., 2006)

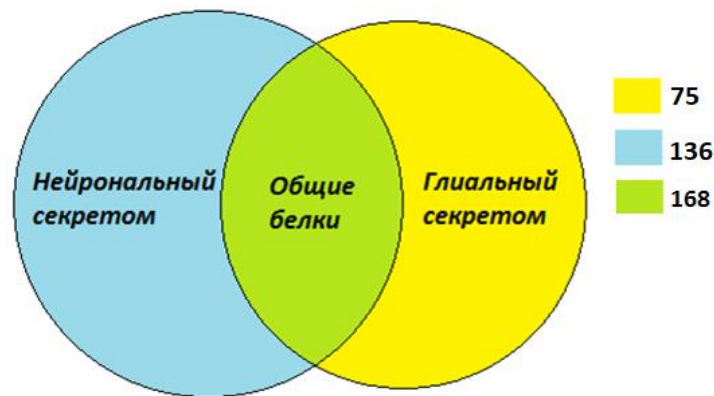


Рисунок 40. Количество общих и уникальных белков, секретируемых НКП и ГКП.

Все клетки организма в разной степени обладают секреторной активностью. Она заключается в синтезировании и выделении разнообразных биохимических соединений в межклеточное пространство, полости органов, кровеносные и лимфатические сосуды. Действие секретируемых белков может быть направлено на регуляцию функциональной активности клеток, поддержание гомеостаза, формирование внеклеточного матрикса и сосудистой системы (Briggs M.S. and Gierasch L.M., 1986). Для лучшего понимания секреции белков клетками многие научные коллективы используют протемные и иммуноферментные анализы кондиционированных культуральных сред. Эти исследования выявляют сотни белков, включая секретируемые белки в составе экзосом (Greco T. et al., 2010; Kim J. et al., 2020). На секреторную активность клеток *in vivo* во многом влияет микроокружение и межклеточное взаимодействие (Greco et al., 2010; Verkhatsky et al., 2016). Поэтому секретом, полученный в условиях *in vitro*, не равнозначен секретому *in vivo*. Секретируемые белки *in vivo* могут быть идентифицированы только путем проведения протеомного анализа жидкостей организма, взятых у донора. Однако это является сложной задачей. Поэтому большинство исследований секретомных профилей было проведено с использованием клеточных линий, первичных культур грызунов или культур, выделенных из эмбриональных тканей. Исследования с применением данных моделей имеют ограничения из-за потери нормальных секреторных сигнатур в процессе

культивирования и пассирования (Brown K.J. et al., 2012). Технология ИПСК позволила в данной работе получить нейрональные и глиальные клетки человека и подробно изучить их секретом, однако в литературе подобных работ не было обнаружено. Тем не менее полученные данные, касающиеся состава секретируемых белков ГКП и НКП, удалось косвенно сравнить с результатами работ других научных коллективов. Так, белки тромбоспондин-1 и 2 (THBS1, 2); аполипопротеин E (APOE); амфотерин (HMGB1); тканевой ингибитор металлопротеиназ 1 (TIMP1); пигментный фактор эпителиального происхождения (SERPINF1); фосфатидилэтаноламин-связывающий белок 1 (PEBP1); катепсин D (CTSD); дистрогликан (DAG1); нейропилин 2 (NRP2); нуклеолин (NCL); гепатоцеллюлярный фактор роста (HDGF); секретируемый белок 1 семейства Frizzled (SFRP1); ингибитор активатора плазминогена 1 (SERPINE1); трансформирующий фактор роста $\beta 2$ (TGFB2); статмин (STMN1); нейропилин 2 (NRP2); периостин (POSTN); винкулин (VCL); дистрогликан (DAG1); агрин (AGRN); фибулин-1 (FBLN1); нексин-1 (SERPINE2); профилин-1 (PFN1); секретируемый кислый белок с высоким содержанием цистеина (SPARC); динактин (DCTN); сортирующий нексин 3 (SNX3); просапозин (PSAP); катепсин B (CTSB); макрофаг-связывающий белок (CAPG); фактор ингибирования миграции макрофагов (MIF); пентраксин-подобный белок (PTX3); серпин B6 (SERPINB6); периостин (POSTN); фактор роста соединительной ткани (CTGF); Rab-белки; белки теплового шока (HSP) 70 и 90, а также их ко-шапероны секретируются первичной культурой астроцитов как человека, так и мыши (Delcourt N. et al., 2005; Han D. et al., 2014; Kim J. et al., 2020; Suk K. et al., 2010; Verkhatsky A. et al., 2016). Эти белки были выявлены в секретоме ГКП, полученных из ИПСК, при проведении протеомного анализа. Однако были выявлены и отличия. По многочисленным данным, астроциты регулируют синаптогенез путем высвобождения белков молекул адгезии и факторов роста, таких как хевин (SPARCL1), протокадгерин (Pcdhs) и нейрегулины (NRGs) (Chung W. et al., 2015; Kucukdereli et al., 2011). Гликопротеин тенасцин-С (TN-C), высоко экспрессируемый в незрелых астроцитах, регулирует различные

клеточные процессы, такие как миграция, пролиферация, аксональное наведение и синаптическая пластичность (Bouvier D.S. et al., 2016). При анализе данных протеомного исследования перечисленные белки в секрете ГКП обнаружены не были.

Согласно проведенному протеомному анализу, Барбаром Мендесом-Пиньейру и его коллегами было установлено 538 белков, секретируемых первичной культурой нейрональных прогениторных клеток человека, что на 70% идентично составу секрета НКП, определенному в данной работе (Mendes-Pinheiro B. et al., 2018). Различия заключались в секреции первичной культурой белков S100-A6 (S10A6), аттрактина (ATRN), кадгерина-11 (CAD11), фибулина-5 (FBLN5), интерстициальной коллагеназы (MMP1), тесстикана-1 (TICN1), ольфактомедин-подобного белка 3 (OLFL3), декорина (PGS2), инсулиноподобного фактора роста II (IGF2), сортирующего нексина-12 (SNX12), экспортина-1 и 2 (XPO1, 2), профилина-2 (PROF2), сортилина (SORT), кофилина-2 (CFL2), транстиретины (TTHY), импортина-5 (IPO5), бигликана (PGS1), тенасцина (TENA), кальсинтенина-1 (CSTN1) и других.

Дополнительно была произведена оценка экспрессии генов регуляторных белков, выявленных при протеомном и иммуноферментном анализах. Так, ГКП экспрессируют на достаточно высоком уровне гены *GREM1*, *GAS6*, *GDF15*, *LIF*, *TWF2*, *SNX3*, *MYDGF* и *TGFb2*. При этом высокая экспрессия генов *FGF8*, *NTN1*, *NPTX2*, *EFBN1*, *SERPINI1* и *VGF* была обнаружена только в культуре НКП. Таким образом, различия между двумя культурами были выявлены не только на уровне секреции регуляторных белков, но и подтверждены посредством экспрессии их генов. Результаты по протеомному и иммуноферментному анализам дали возможность изучить состав КС, а распределение регуляторных белков по функциональным особенностям позволили предположить их направленность действия.

Изучение нейротрофического и нейропротективного действия НКП и ГКП, полученных из ИПСК, осуществлялось на двух *in vitro* моделях – химической гипоксии, вызванной дихлоридом кобальта, и глутаматной эксайтотоксичности, и

двумя способами: методом сокультивирования и путем добавления их КС клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y и первичной культуре мозжечковых нейронов. На модели химической гипоксии было показано, что инкубация ГКП и НКП, а также их КС, с клеточной линией SH-SY5Y способствовала выживанию и положительно влияла на рост нейритов последних. Нейропротективное действие основано на изменении экспрессии генов регуляторов апоптоза *BAX* и *BCL2*. При этом ГКП и КС-ГКП эффективнее увеличивали жизнеспособность клеток нейробластомы и обладали антиапоптотическим и антинекротическим действиями. ГКП и КС-ГКП также отличались более выраженным нейротрофическим действием путем увеличения экспрессии маркеров нейритогенеза *MAP2* и *GAP43* в клеточной линии SH-SY5Y (Салихова Д.И. и др., 2020).

На модели глутаматной эксайтотоксичности было показано, что прединкубация ГКП и их КС с культурой мозжечковых нейронов способствовала увеличению жизнеспособности последних на $23 \pm 1,66\%$ путем изменения экспрессии генов *Bax* и *Bcl2*. Как и при химической гипоксии, ГКП и КС-ГКП в условиях глутаматной эксайтотоксичности способствовали уменьшению количества некротических и апоптотических клеток в культуре и положительно влияли на рост нейритов мозжечковых нейронов крыс, увеличивая уровень экспрессии маркеров нейритогенеза *Map2* и *Gap43*. Напротив, инкубация с НКП и КС-НКП не оказывали положительного действия на мозжечковые нейроны и не способствовали регенерации и росту нейритов (Салихова Д.И. и др., 2019).

Одной из причин гибели клеток при химической гипоксии или глутаматной эксайтотоксичности является накопление АФК, приводящее к развитию окислительного стресса (Chamorro M.D. et al., 2016; C. Yang C. et al., 2011). По данным протемного анализа, ГКП секретируют более разнообразный спектр веществ, участвующих в окислительно-восстановительных реакциях, по сравнению с НКП. Различия в цитопротективных свойствах между двумя культурами могут быть также обусловлены секрецией ГКП веществ, регулирующих апоптоз, таких как лейкемия-ингибирующего фактора (LIF),

белков теплового шока 70 кДа и 105 кДа (HspA4 и HspH1), гремлина-1 (GREM1) и блокирующего рост специфического белка 6 (GAS6). Основной причиной гибели клеток при глутаматной эксайтотоксичности является гиперстимуляция NMDA-рецепторов, которая усиливает ток ионов Ca^{2+} в клетку, что приводит к окислительному стрессу, повреждению митохондрий и инициации апоптоза или некроза (Sattler R., Tymianski M., 2000; Szydlowska K., Tymianski M., 2010). В случае модели глутаматной эксайтотоксичности различия в выживаемости мозжечковых нейронов могут быть обусловлены секрецией ГКП более широкого спектра белков, участвующих в гомеостазе ионов кальция, а именно станниокальцина-2 (STC2), нуклеобиндина-1 (NUCB1) и белка S100-A16 (S100A16). Более выраженное нейротрофическое действие ГКП, показанное на двух моделях, можно объяснить секрецией белков, вовлеченных в рост нейритов и характерных для данного типа клеток, твинфилина-2 (TWF2), просапозина (PSAP), сортирующего нексина 3 (SNX3), тромбоспондина-2 (THBS2) или более высоким уровнем секреции нейротрофинов BDNF, NGF, GDNF, CNTF (Таблица 6).

Терапевтическое действие КС было исследовано на модели экспериментального инсульта крыс. Было показано, что введение КС-ГКП индуцировало значительно более быстрое восстановление функций головного мозга животных, уменьшая степень неврологического дефицита после инсульта по сравнению с контрольной группой. Однако в данной группе не наблюдали выраженного уменьшения объема очага инфаркта и улучшения выживаемости животных. В то же время в группе с введением КС-ГКП уровень экспрессии генов *Bax* и *Tnfa* в ишемизированной области головного мозга снижался, а гена *Gap43* - повышался по сравнению с контролем. Изменялся профиль экспрессии противовоспалительных цитокинов – повышался уровень мРНК генов *Il4*, *Il10* и *Il13* в ответ на введение КС-ГКП. При этом в данной экспериментальной группе наблюдали снижение количества фагоцитирующих клеток микроглии/макрофагов в поврежденной области по сравнению с контрольной группой. Терапия КС-ГКП способствовала количественному увеличению новообразованных кровеносных

сосудов и повышению экспрессии гена *Vegfa* в ишемизированной зоне. Введение КС-НКП животным с экспериментальным инсультом не влияло на степень выраженности неврологического дефицита, выживаемость и объем очага инфаркта.

Таблица 6

Паракринные действия НКП и ГКП, обладающие различными биологическими функциями

Культура	Секретируемые факторы	Оказываемое действие		
ГКП	LIF, HspA4, HspH1, ST13, GREM1, GAS6 и др.	Цитопротекция		↓BAX ↑BCL2 ↑ERK1 ↑ERK2
	COLEC12, KPNB1, TOLLIP, GDF15, SH3BGRL3 и др.	Уменьшение воспаления		↓TNFα ↓IL1b ↓IL6 ↑IL4 ↑IL10 ↑IL13
	TWF2, PSAP, SNX3, THBS2, BDNF, NGF, GDNF, CNTF и др.	Прорегенеративный эффект	Нейритогенез	↑MAP2 ↑GAP43
	MYDGF, HDGF, TGFB2 и др.		Ангиогенез	↑VEGFα
НКП	MFGE8, SCG3 и др.	Прорегенеративный эффект	Ангиогенез	↑VEGFα

При этом было зафиксировано увеличение экспрессии гена *Bax* в 2,4 раза и количества фагоцитирующих CD68⁺-клеток в области повреждения мозга по сравнению с группой КС-ГКП. В ответ на введение КС-НКП в ишемизированной области было выявлено повышение экспрессии гена *Vegfa* и увеличение объемной плотности новообразованных сосудов.

Таким образом, на модели экспериментального инсульта было показано противовоспалительное действие секрета ГКП, которое может быть обусловлено наличием коллектина-12 (COLEC12); бета-субъединицы импортина

1 (KPNB1), Toll-взаимодействующего белка (TOLLIP), фактора дифференциации роста 15 (GDF15), SH3-домен-связывающего богатого глутаминовой кислотой белка 3 (SH3BGRL3) в составе КС. Ангиогенное действие может быть связано с содержанием в глиальном секрете миелиного фактора роста (MYDGF), гепатоцеллюлярного фактора роста (HDGF) и трансформирующего фактора роста $\beta 2$ (TGFB2), а в нейрональном - лактадгерина (MFGE8) и секретогранина 3 (SCG3) (Таблица 6).

Обобщая результаты проведенных исследований, можно сделать вывод, что в представленных моделях *in vitro* и *in vivo* ГКП обладают более выраженным паракринным действием. Условно можно выделить три эффекта, наблюдаемых при терапии КС-ГКП:

- 1) прорегенеративный эффект, который связан с ангиогенезом и увеличением экспрессии гена *Vegfa* в ишемизированной области мозга, ростом нейритов и усиленной экспрессией генов *Map2* и *Gap43*;
- 2) противовоспалительный эффект, направленный на снижение количества фагоцитирующих клеток микроглии/макрофагов и уменьшение экспрессии провоспалительного цитокина *Tnfa* в ишемизированной области мозга;
- 3) цитопротективный эффект, обусловленный снижением количества апоптотических и некротических клеток, а также подавлением гена *Bax* и увеличением экспрессии гена *Bcl2*.

КС являются источником большого количества паракринных факторов, в том числе нейротрофинов, цитокинов, факторов роста и способны оказывать комплексные воздействия при различных патологиях. Существуют исследования, в которых было показано цитопротективное действие КС на различных моделях повреждения нейрональных клеток *in vitro* (Hao P. et al., 2014; Liang P. et al., 2014; Mita T. et al., 2015; Tsai M.J. et al., 2014). КС, полученная при культивировании НСК (КС-НСК), ингибировала апоптоз клеточной линии SH-SY5Y, а также увеличивала процент дифференцированных клеток при совместном применении с ретиноевой кислотой (Jia G. et al., 2020). Была продемонстрирована способность КС-МСК индуцировать нейритогенез клеточной линии SH-SY5Y и двигательных

нейронов спинного мозга (Pires A.O. et al., 2014; Wright K.T. et al., 2007, 2014). В другом исследовании на модели кислородной и глюкозной депривации было показано, что факторы, секретируемые МСК пупочного канатика, оказывают защитное действие на поврежденные неонатальные кортикальные нейроны, уменьшая признаки апоптоза и некроза (Mukai T. et al., 2018). Существуют данные, подтверждающие эффективность КС в моделях *in vivo*. Так, при введении КС-МСК крысам с экспериментальным инсультом показатели неврологического дефицита и объема очага инфаркта снижались по сравнению с контрольными значениями (Yang H.N. et al., 2018). На модели спинномозговой травмы изучалось действие КС-МСК на регенерацию аксонов кортикоспинального тракта. Введение КС приводило к экстенсивному росту аксонов в шейном отделе и увеличению синаптических контактов между интернейронами кортикоспинального тракта (Liang P. et al., 2014). Имеются публикации, описывающие применение КС и при болезни Альцгеймера. Так КС-МСК жировой ткани восстанавливала сокращенное время неподвижности у трансгенных мышей 5xFAD при подвешивании за хвост до нормального уровня, оказывая антидепрессивное воздействие путем ингибирования Akt-сигнального пути и активации GSK-3 β (Yamazaki H. et al., 2015). Терапевтическое действие КС-МСК пульпы зуба было протестировано на модели экзогенного амилоидоза, интраназальное введение которой приводило к значительному улучшению когнитивных функций у животных (Mita T. et al., 2015). КС, полученные из разных типов стволовых клеток, могут обладать противовоспалительным действием (Bermudez M.A. et al., 2016; Khubutiya M.S. et al., 2014; van Buul G.M. et al., 2012). Так, на модели послеоперационной когнитивной дисфункции мышей были продемонстрированы терапевтические эффекты КС-МСК костного мозга, которые были связаны со снижением воспаления, ослаблением окислительного стресса и повышением экспрессии BDNF в тканях головного мозга (Jiang Y. et al., 2019). Внутривенное введение КС-МСК костного мозга крысам с экспериментальным инсультом значительно улучшало функциональное восстановление и ослабляло инфильтрацию микроглии/макрофагов в головном мозге (Tsai M. et al., 2014). Была

продемонстрирована способность НСК в той же модели оказывать иммуномодулирующее действие путем секреции цитокинов и хемокинов в ответ на провоспалительную сигнализацию от активированной микроглии и инфильтрирующих кровеносных иммунных клеток (Watanabe T. et al., 2016; Baker E.W. et al., 2019). Кроме того, секретомы стволовых клеток содержат проангиогенные факторы, способствующие образованию и поддержанию сосудов *in vivo* (Bronckaers A. et al., 2014; Hung S.C. et al., 2007; Katagiri W. et al., 2017). Исследования на грызунах с экспериментальным инсультом показали, что трансплантированные НСК увеличивают пролиферацию эндотелиальных клеток и плотность микрососудов в зоне пенумбры мозговой ткани (Ryu S. et al., 2016; Baker E.W. et al., 2019; Zhang G.L. et al., 2019) за счет секреции VEGF (Wang L. et al., 2017; Willis M.C. et al., 2020). Хикс и его коллеги показали, что первичная культура НСК секретирует фактор ангиогенеза ангиопозтин 1 (Ang1), который приводит к увеличению количества микрососудов в ишемизированной области мозга (Hicks C. et al., 2013).

Полученные в данной работе результаты частично согласуются с проведенными ранее исследованиями по изучению КС. В связи с вышесказанным возникает вопрос о выборе типа клеток как для непосредственно клеточной терапии, так и для получения КС. Способность ГКП и НКП к дифференцировке в зрелые нейроны и астроглию, а также секреция факторов, характерных для ранних этапов формирования ЦНС, делают эти культуры более подходящим объектом для терапии различных патологий головного мозга по сравнению с культурами других типов клеток. Несмотря на то, что КС-НКП характеризуется наибольшим количеством секретируемых белков, их функциональные свойства ограничиваются лишь способностью стимулировать ангиогенез ишемизированной зоны мозга. Напротив, КС-ГКП обладает более широким спектром биологических функций. Ее способность к восстановлению нейронов/нервной ткани многогранна и обусловлена несколькими механизмами действия: нейропротективным, прорегенеративным и противовоспалительным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день большинство методов терапии сосудистых заболеваний головного мозга не позволяют в полной мере восстановить поврежденные ткани, добиться значительного терапевтического эффекта и улучшить результаты неврологической реабилитации. Все эти данные указывают на то, что поиск новых способов регенерации тканей мозга остается актуальной задачей для современной медицины.

В ходе диссертационной работы была произведена оценка продуцирующей активности НКП и ГКП с применением иммуноферментного и протеомного анализов КС, которые позволили выявить различия в секреции нейротрофинов, факторов роста, цитокинов, белков теплового шока и других веществ. Исследованы паракринные механизмы, лежащие в основе нейропротекции, ангиогенеза и снижения уровня воспаления. Показано, что ГКП, в отличие от НКП, обладают более выраженным паракринным действием предположительно за счет секреции уникальных белков – лейкоemia-ингибирующего фактора, белков теплового шока 70 и 105 кДа, твинфилина-2, просапозина, сортирующего нексина 3, тромбоспондина-2; миелоидного фактора роста, гепатоцеллюлярного фактора роста, трансформирующего фактора роста $\beta 2$ и других. Основываясь на проведенном исследовании, можно предположить, что культура ГКП – перспективный и доступный источник белков и пептидов для терапии сосудистых и дегенеративных заболеваний головного мозга, поскольку может быть получена непосредственно от пациента. Результаты о нейропротективных, противовоспалительных и прорегенеративных свойствах ГКП являются экспериментальным обоснованием развития направления по разработке ноотропных лекарственных препаратов нового поколения.

ВЫВОДЫ

1. Отбор линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, проведенный по морфологическим критериям и способности к эффективной нейральной дифференцировке, позволяет получать обогащённые популяции нейрональных и глиальных клеток-предшественников. Продemonстрирована способность линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных интеграционным и неинтеграционным методами, дифференцироваться в нейральном направлении с различной эффективностью генерации PAX6⁺ - клеток (маркер нейральных стволовых клеток) в культуре.

2. Сравнительный протеомный анализ кондиционированных сред, полученных при культивировании нейрональных и глиальных клеток-предшественников, выявил различия в секреции биологически активных веществ: 45% нейронального и 31% глиального секрета составляют уникальные белки. При этом концентрация нейротрофинов BDNF, CNTF, NGF и GDNF, определяемая иммуноферментным анализом, больше в секрете глиальных клеток-предшественников. Выявленные различия между двумя культурами в секреции белков подтверждаются экспрессией соответствующих им генов.

3. Сокультивирование глиальных клеток-предшественников в системе Transwell или добавление их кондиционированной среды способствуют эффективной цитопротекции путем подавления гена *Bax* и увеличения экспрессии гена *Bcl2*. Протективное действие заключается в уменьшении количества апоптотических и некротических клеток в первичной культуре мозжечковых нейронов в условиях глутаматной эксайтотоксичности и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y при гипоксии. Глиальные клетки-предшественники и кондиционированная ими среда обладают выраженным нейротрофическим действием и способствуют восстановлению и росту нейритов клеток, увеличивая экспрессию маркеров нейритогенеза *Map2* и *Gap43*.

4. Внутриаартериальное введение кондиционированной среды, содержащей продукты секреции глиальных клеток-предшественников, в модели острой фокальной ишемии головного мозга крыс обеспечивает наибольший терапевтический эффект по сравнению с кондиционированной средой, полученной при культивировании нейрональных клеток-предшественников, что выражается в снижении проявлений неврологического дефицита, но по данным МРТ-диагностики площадь очагов повреждения остается неизменной.

5. Терапевтическое воздействие кондиционированной среды, полученной при культивировании глиальных клеток-предшественников, обусловлено низкой инфильтрацией фагоцитирующих $CD68^{+}$ -клеток, высокой экспрессией генов противовоспалительных цитокинов (*Il4*, *Il10*, *Il13*) и низкой - провоспалительного цитокина *Tnfa*, а также высокой экспрессией гена ангиогеназа (*Vegfa*) и увеличением количества новообразованных кровеносных сосудов в области ишемического повреждения головного мозга.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АТФ – аденозинтрифосфорная кислота
- АФА – активные формы азота
- АФК – активные формы кислорода
- ВСА – внутренняя сонная артерия
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
- ГКП – глиальные клетки-предшественники
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИИ – ишемический инсульт
- ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки
- КС – кондиционированная среда
- КС-ГКП – кондиционированная среда глиальных клеток-предшественников
- КС-НКП – кондиционированная среда нейрональных клеток-предшественников
- ММП – матричные металлопротеиназы
- МСК – мезенхимальные стромальные клетки
- МРТ – магнитно-резонансная томография
- НАД – никотинамидадениндинуклеотид
- НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
- НКП – нейрональные клетки-предшественники
- НСА – наружная сонная артерия
- НСК – нейральные стволовые клетки
- ОСМА – окклюзия средней мозговой артерии
- ОСА – общая сонная артерия
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- СМА – средняя мозговая артерия
- ЦНС – центральная нервная система
- ЭСК – эмбриональные стволовые клетки
- ВМР – bone morphogenetic protein (костный морфогенетический белок)

BDNF – brain derived neurotrophic factor (нейротрофический фактор мозга)
CNTF – ciliary neurotrophic factor (цилиарный нейротрофический фактор)
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EGF – epidermal growth factor (эпидермального фактора роста)
ENO2 – enolase 2 (енолаза 2 или гамма-енолаза)
FBS – fetal bovine serum (эмбриональная бычья сыворотка)
FGF2 – fibroblast growth factor 2 (фактор роста фибробластов 2)
GFAP – glial fibrillary acidic protein (глиальный фибриллярный кислый протеин)
GDNF – glial cell-derived neurotrophic factor (глиальный нейротрофический фактор)
Hsp – heat shock proteins (белки теплового шока)
IL – interleukin (интерлейкин)
MAP2 – microtubule-associated protein 2 (белки, ассоциированные с микротрубочками)
NGF – nerve growth factor (фактор роста нервов)
PDGF – platelet-derived growth factor (тромбоцитарным фактором роста)
PI3K –phosphoinositide 3-kinas (фосфатидилинозитол-3-киназа)
SHH – sonic hedgehog
TNF α – tumor necrosis factor α (фактор некроза опухоли α)
VEGF – vascular endothelial growth factor (фактор роста эндотелия сосудов)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кулеш А.А. Нейровоспалительные, нейродегенеративные и структурные церебральные маркеры основных клинических вариантов постинсультных когнитивных нарушений в остром периоде ишемического инсульта //Вестник Российской академии медицинских наук. – 2016. – Т. 71. – № 4.
2. Лебедева О. С. Создание модельной системы для изучения функции генов, ассоциированных с болезнью Паркинсона, с использованием технологии генетического репрограммирования: дис. канд. биол. наук: 03.02.07 /Лебедева Ольга Сергеевна. – М., 2016. – 158 с.
3. Наместникова Д.Д. Терапевтическая эффективность внутриартериального введения нейральных прогениторных клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, при остром экспериментальном ишемическом инсульте у крыс //Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Т. 21. – № 1. – С. 153-164.
4. Новиков В.Е. Гипоксией индуцированный фактор (HIF-1 α) как мишень фармакологического воздействия //Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2013. – Т. 11. – № 2.
5. Новиков В.Е. Перспективы применения индукторов фактора адаптации к гипоксии в терапии ишемических заболеваний //Вестник уральской медицинской академической науки. – 2014. – № 5. – С. 132-138.
6. Салихова Д.И. Ключевые этапы дифференцировки ИПСК в нейрональные и глиальные клетки //Гены и клетки. - 2018. - Т.13. - № 3. - С.52-55.
7. Салихова Д.И. Сравнительный анализ влияния кондиционированных сред, полученных от нейрональных и глиальных предшественников, на мозжечковые нейроны при глутаматной эксайтотоксичности //Гены и Клетки. - 2019. - Т.14. - №4. - С. 46-53.
8. Салихова Д.И. Сравнительный анализ паракринного действия нейрональных и глиальных предшественников, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека //Клеточные технологии в биологии и медицине. - 2020. - №1. - С.62-68.
9. Смирнова Н.А. и др. Каталитический механизм и субстратная специфичность HIF пролилгидроксилаз //Биохимия. – 2012. – Т. 77. – № 10. – С. 1337-1349.
10. Стародубцева О.С. Анализ заболеваемости инсультом с использованием информационных технологий //Фундаментальные исследования. – 2012. – № 8-2. – С. 424-427.
11. Хубутия М.Ш.. Паракринные механизмы противовоспалительного и органопротективного действия при трансплантации мезенхимальных стволовых клеток. Обзор литературы //Трансплантология. – 2012. – № 1-2.
12. Черкашова Э.А. Сравнительный анализ эффектов внутривенного введения мезенхимных стромальных клеток плаценты и нейральных прогениторных клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, на течение острого экспериментального инфаркта у крыс //Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2018. – №4. – С. 36-45 .
13. Aasen T. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes // Nat. Biotechnol. –2008. –V. 26. – № 11. С. – P.1276–1284.
14. Ababneh N. Correction of amyotrophic lateral sclerosis related phenotypes in induced pluripotent stem cell-derived motor neurons carrying a hexanucleotide expansion mutation in C9orf72 by CRISPR/Cas9 genome editing using homology-directed repair // bioRxiv. – 2019.
15. Abati E. Advances, challenges and perspectives in translational stem cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis // Mol. Neurobiol. – 2019. – V. 56. – № 10. – P. 6703–6715.
16. Abeliovich A., Doege C.A. Reprogramming therapeutics: iPS cell prospects for neurodegenerative disease // Neuron. – 2009. – V. 61. – № 3. – P. 337–339.
17. Ahmad S. The role of complement C3a receptor in stroke // NeuroMolecular Med. – 2019. – V.

21. – № 4. – P. 467–473.
18. Aitken A. 14-3-3 proteins: a historic overview // Elsevier. – 2006. – Т. 16. – № 3. – P. 162–172.
19. Akiba R. Toward establishment of regenerative cell therapy for retinitis pigmentosa using iPS cell derived retinal sheet // Folia Pharmacol. Jpn. – 2020. – Т. 155. – № 2. – P. 93–98.
20. Albrecht P. Mechanisms of oxidative glutamate toxicity: the glutamate/cystine antiporter system, as a neuroprotective drug target // CNS Neurol. Disord. - Drug Targets. – 2012. – V. 9. № 3. – P. 373–382.
21. Allen M. P. et al. Growth arrest-specific gene 6 (Gas6)/adhesion related kinase (Ark) signaling promotes gonadotropin-releasing hormone neuronal survival via extracellular signal-regulated kinase (ERK) and Akt //Molecular Endocrinology. – 1999. – V. 13. – №. 2. – P. 191-201.
22. Amin N. Recent advances of induced pluripotent stem cells application in neurodegenerative diseases // Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry. – 2019. – V. 95. – P. 109674.
23. Andersson E. Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons // Cell. – 2006. – V. 124. – № 2. – P. 393–405.
24. Aoi T. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells // Science. – 2008. – V. 321. – № 5889. – P. 699–702.
25. Arrigo A.P. Hsp27 consolidates intracellular redox homeostasis by upholding glutathione in its reduced form and by decreasing iron intracellular levels // Antioxidants Redox Signal. – 2005. – V. 7. – № 3–4. – P. 414–424.
26. Arumugam T. V. Neuroprotection in stroke by complement inhibition and immunoglobulin therapy //Neuroscience. – 2009. – V. 158. – №. 3. – P. 1074-1089.
27. Asahi M. et al. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood–brain barrier and white matter components after cerebral ischemia //Journal of Neuroscience. – 2001. – V. 21. – №. 19. – P. 7724-7732.
28. Atochin D.N. Mouse model of microembolic stroke and reperfusion // Stroke. – 2004. V. 5. – № 9. – P. 2177–2182.
29. Augustyniak J. Reprogramming of somatic cells: possible methods to derive safe, clinical-grade human induced pluripotent stem cells //Acta Neurobiol Exp. – 2014. – V. 74. – P. 373-382.
30. Bachiller D. The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development // Nature. –2000. – V. 403. –№ 6770. – P. 658–661.
31. Baglio S.R., Pegtel D. M., Baldini N. Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy //Frontiers in physiology. – 2012. – V. 3. – P. 359.
32. Baharvand H. Neural differentiation from human embryonic stem cells in a defined adherent culture condition // Int. J. Dev. Biol. –2007. – V. 51. –№ 5. – P. 371–378.
33. Baizabal J.M., Covarrubias L. The embryonic midbrain directs neuronal specification of embryonic stem cells at early stages of differentiation // Dev. Biol. – 2009. – V. 325. – № 1. – P. 49–59.
34. Baker E.W., Kinder H.A., West F.D. Neural stem cell therapy for stroke: A multimechanistic approach to restoring neurological function // Brain Behav. – 2019. –V. 9. – № 3. – P. 1214.
35. Baloh R.H., Glass J.D., Svendsen C.N. Stem cell transplantation for amyotrophic lateral sclerosis // Curr. Opin. Neurol. –2018. – V. 31. –№ 5. – P. 655–661.
36. Bandera E. и др. Cerebral blood flow threshold of ischemic penumbra and infarct core in acute ischemic stroke: a systematic review. // Stroke. – 2006. – V. 37. № 5. – P. 1334–1339.
37. Baraniak P.R., McDevitt T.C. Stem cell paracrine actions and tissue regeneration // Regen. Med. – 2010. – V. 5. – № 1. – P. 121–143.
38. Bauer S. Leukemia inhibitory factor is a key signal for injury-induced neurogenesis in the adult mouse olfactory epithelium //Journal of Neuroscience. – 2003. – V. 23. – №. 5. – P. 1792-1803.
39. Ben-Hur T. Cell Therapy for Multiple Sclerosis // Neurotherapeutics. –2011. – V. 8. – № 4. – P. 625–642.
40. Benitez M. J. et al. Hsp90 activity is necessary to acquire a proper neuronal polarization

- //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. – 2014. – V. 1843. – №. 2. – P. 245-252.
41. Berggren M. I. et al. Thioredoxin peroxidase-1 (peroxiredoxin-1) is increased in thioredoxin-1 transfected cells and results in enhanced protection against apoptosis caused by hydrogen peroxide but not by other agents including dexamethasone, etoposide, and doxorubicin //Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2001. – V. 392. – №. 1. – P. 103-109.
 42. Berkhemer O. A. et al. A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke //n Engl J Med. – 2015. – V. 372. – P. 11-20.
 43. Bermudez M.A. Anti-inflammatory effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells in uveitis // Exp. Eye Res. – 2016. – V. 149. – P. 84–92.
 44. Bérubé N. G. et al. Cloning and characterization of CRF, a novel C1q-related factor, expressed in areas of the brain involved in motor function //Molecular brain research. – 1999. – V. 63. – №. 2. – P. 233-240.
 45. Bhargava N. et al. Generation and characterization of induced pluripotent stem cell line (IGiBi001-A) from a sickle cell anemia patient with homozygous β -globin mutation //Stem cell research. – 2019. – V. 39. – P. 101484.
 46. Bhasin A. Paracrine Mechanisms of Intravenous Bone Marrow-Derived Mononuclear Stem Cells in Chronic Ischemic Stroke // Cerebrovasc. Dis. Extra. – 2016. – V. 6. № 3. P. 107–119.
 47. Bilimoria P.M., Bonni A. Cultures of cerebellar granule neurons // Cold Spring Harb. Protoc. 2008. T. 3. № 12.
 48. Bilimoria P. M., Bonni A. Cultures of cerebellar granule neurons //Cold Spring Harbor Protocols. – 2008. – V. 2008. – №. 12. – P. 5107.
 49. Blackburn W. D. et al. Apolipoprotein AI decreases neutrophil degranulation and superoxide production //Journal of lipid research. – 1991. – V. 32. – №. 12. – P. 1911-1918.
 50. Bliss T. Cell transplantation therapy for stroke. // Stroke. – 2007. – T. 38. – № 2. – P.817–26.
 51. Bonaguidi M.A. и др. LIF and BMP signaling generate separate and discrete types of GFAP-expressing cells // Development. 2005. T. 132. № 24. C. 5503–5514.
 52. Bottazzi B. The pentraxins PTX3 and SAP in innate immunity, regulation of inflammation and tissue remodelling //Journal of hepatology. – 2016. – V. 64. – №. 6. – P. 1416-1427.
 53. Bouvier D. S. High resolution dissection of reactive glial nets in Alzheimer's disease //Scientific reports. – 2016. – V. 6. – P. 24544.
 54. Brandl C. Generation of Functional Retinal Pigment Epithelium from Human Induced Pluripotent Stem Cells //Retinal Degeneration. –2019. – P. 87-94.
 55. Briggs M. S., Gierasch L. M. Molecular mechanisms of protein secretion: the role of the signal sequence //Advances in protein chemistry. – Academic Press, 1986. – V. 38. – P. 109-180.
 56. Brigstock D. R. Regulation of angiogenesis and endothelial cell function by connective tissue growth factor (CTGF) and cysteine-rich 61 (CYR61) //Angiogenesis. – 2002. – V. 5. – №. 3. – P. 153-165.
 57. Bronckaers A. Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic approach to accelerate angiogenesis //Pharmacology & therapeutics. – 2014. – V. 143. – №. 2. – P. 181-196.
 58. Brooks S. D. Admission neutrophil–lymphocyte ratio predicts 90 day outcome after endovascular stroke therapy //Journal of neurointerventional surgery. – 2014. – V. 6. – №. 8. – P. 578-583.
 59. Broughton B. R., Reutens D. C., Sobey C. G. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia //Stroke. – 2009. – V. 40. – №. 5. – P. 331-339.
 60. Brown K. J. et al. Advances in the proteomic investigation of the cell secretome //Expert review of proteomics. – 2012. – V. 9. – №. 3. – P. 337-345.
 61. Van Buul G. M. Mesenchymal stem cells secrete factors that inhibit inflammatory processes in short-term osteoarthritic synovium and cartilage explant culture //Osteoarthritis and Cartilage. – 2012. – V. 20. – №. 10. – P. 1186-1196.
 62. Calvo-Anguiano G. Comparison of specific expression profile in two in vitro hypoxia models

- //Experimental and therapeutic medicine. – 2018. – V. 15. – №. 6. – P. 4777-4784.
63. Canazza A. Experimental models of brain ischemia: a review of techniques, magnetic resonance imaging, and investigational cell-based therapies //Frontiers in neurology. – 2014. – V. 5. – P. 19.
 64. Cao W. Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal neurons against hydrogen peroxide-induced cell death //Journal of neuroscience research. – 1999. – V. 57. – № 6. – P. 789-800.
 65. Ceornodolea A. D., Bal R., Severens J. L. Epidemiology and management of atrial fibrillation and stroke: review of data from four European countries //Stroke research and treatment. – 2017. – V. 2017.
 66. Chambers S.M. et al. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling //Nature biotechnology. – 2009. – V. 27. – №. 3. – P. 275.
 67. Chamorro Á. et al. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation //The Lancet Neurology. – 2016. – V. 15. – №. 8. – P. 869-881.
 68. Chanoumidou K. et al. Stem cell derived oligodendrocytes to study myelin diseases //Glia. – 2020. – V. 68. – №. 4. – P. 705-720.
 69. Chaurasiya N. D., Shukla S., Tekwani B. L. A combined in vitro assay for evaluation of neurotrophic activity and cytotoxicity //SLAS DISCOVERY: Advancing Life Sciences R&D. – 2017. – V. 22. – №. 6. – P. 667-675.
 70. Chauvin S., Sobel A. Neuronal stathmins: a family of phosphoproteins cooperating for neuronal development, plasticity and regeneration //Progress in neurobiology. – 2015. – V. 126. – P. 1-18.
 71. Chen J. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats//Circulation research. – 2003. – V. 92. – №. 6. – P. 692-699.
 72. Chen W. Osteopontin reduced hypoxia-ischemia neonatal brain injury by suppression of apoptosis in a rat pup model //Stroke. – 2011. – V. 42. – №. 3. – P. 764-769.
 73. Chen Z. Tetranectin gene deletion induces Parkinson's disease by enhancing neuronal apoptosis //Biochemical and biophysical research communications. – 2015. – V. 468. – №. 1-2. – P. 400-407.
 74. Cheng Y. D., Al-Khoury L., Zivin J. A. Neuroprotection for ischemic stroke: two decades of success and failure //NeuroRx. – 2004. – V. 1. – №. 1. – P. 36-45.
 75. Chernykh E.R. Immunopathogenetic aspects of ischemic stroke //Meditsinskaya Immunologiya. – 2018. – T. 20. – №. 1. – C. 19.
 76. Chi C.L. The isthmus organizer signal FGF8 is required for cell survival in the prospective midbrain and cerebellum //Development. – 2003. – V. 130. – №. 12. – P. 2633-2644.
 77. Cho Y.J. Therapeutic effects of human adipose stem cell-conditioned medium on stroke //Journal of neuroscience research. – 2012. – V. 90. – №. 9. – P. 1794-1802.
 78. Choudhary C. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions //Science. – 2009. – V. 325. – №. 5942. – P. 834-840.
 79. Chung W. S., Allen N. J., Eroglu C. Astrocytes control synapse formation, function, and elimination //Cold Spring Harbor perspectives in biology. – 2015. – V. 7. – №. 9. – P. 20370.
 80. Colamarino S. A., Tessier-Lavigne M. The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons //Cell. – 1995. – V. 81. – №. 4. – P. 621-629.
 81. Constantinescu R. Neuronal differentiation and long-term culture of the human neuroblastoma line SH-SY5Y //Neuropsychiatric disorders an integrative approach. – 2007. – P. 17-28.
 82. Crack P. J., Wong C. H. Y. Modulation of neuro-inflammation and vascular response by oxidative stress following cerebral ischemia-reperfusion injury //Current medicinal chemistry. – 2008. – V. 15. – №. 1. – P. 1-14.

83. Culmsee C., Mattson M. P. p53 in neuronal apoptosis //Biochemical and biophysical research communications. – 2005. – V. 331. – №. 3. – P. 761-777.
84. Culmsee C., Kriegelstein J. Ischaemic brain damage after stroke: new insights into efficient therapeutic strategies //EMBO reports. – 2007. – V. 8. – №. 2. – P. 129-133.
85. Culver J. P. Diffuse optical tomography of cerebral blood flow, oxygenation, and metabolism in rat during focal ischemia //Journal of cerebral blood flow & metabolism. – 2003. – V. 23. – №. 8. – P. 911-924.
86. Cunningham C. J., Redondo-Castro E., Allan S. M. The therapeutic potential of the mesenchymal stem cell secretome in ischaemic stroke //Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 2018. – V. 38. – №. 8. – P. 1276-1292.
87. Cunningham D. D., Gurwitz D. Proteolytic regulation of neurite outgrowth from neuroblastoma cells by thrombin and protease nexin-1 //Journal of cellular biochemistry. – 1989. – V. 39. – №. 1. – P. 55-64.
88. Czepiel M. Differentiation of induced pluripotent stem cells into functional oligodendrocytes //Glia. – 2011. – V. 59. – №. 6. – P. 882-892.
89. D'Antonio-Chronowska A., D'Antonio M., Frazer K. A. In vitro Differentiation of Human iPSC-derived Retinal Pigment Epithelium Cells (iPSC-RPE). – 2019.
90. Das M. Thyroid Hormone and Astrocyte Differentiation //Vitamins and hormones. – 2018. – V. 106. – P. 283-312.
91. Datta A. Cell Death Pathways in Ischemic Stroke and Targeted Pharmacotherapy //Translational stroke research. – 2020. – P. 1-18.
92. Davis S. M. Leukemia inhibitory factor protects neurons from ischemic damage via upregulation of superoxide dismutase 3 //Molecular neurobiology. – 2017. – V. 54. – №. 1. – P. 608-622.
93. Delcourt N. Difference in mass analysis using labeled lysines (DIMAL-K): a new, efficient proteomic quantification method applied to the analysis of astrocytic secretomes //Molecular & Cellular Proteomics. – 2005. – V. 4. – №. 8. – P. 1085-1094.
94. Deng H. et al. Mild hypothermia inhibits inflammation after experimental stroke and brain inflammation //Stroke. – 2003. – V. 34. – №. 10. – P. 2495-2501.
95. Denham M., Dottori M. Neural differentiation of induced pluripotent stem cells //Neurodegeneration. – 2011. – P. 99-110.
96. DeVries A. C. Cognitive and behavioral assessment in experimental stroke research: will it prove useful? //Neuroscience & Biobehavioral Reviews. – 2001. – V. 25. – №. 4. – P. 325-342.
97. Ding G. Magnetic resonance imaging of stroke in the rat // Chinese journal of microwave & radio-frequency spectroscopy. – 2014. – V. 31. – №. 1. – P. 116.
98. Djouad F. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism //Stem cells. – 2007. – V. 25. – №. 8. – P. 2025-2032.
99. Dhara S. K., Stice S. L. Neural differentiation of human embryonic stem cells //Journal of cellular biochemistry. – 2008. – V. 105. – №. 3. – P. 633-640.
100. Duchen M. R. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death //The Journal of physiology. – 2000. – V. 529. – №. 1. – P. 57-68.
101. Dufourcq P. Regulation of endothelial cell cytoskeletal reorganization by a secreted frizzled-related protein-1 and frizzled 4-and frizzled 7-dependent pathway: role in neovessel formation //The American journal of pathology. – 2008. – V. 172. – №. 1. – P. 37-49.
102. Eaton B. A. Dynactin is necessary for synapse stabilization //Neuron. – 2002. – V. 34. – №. 5. – P. 729-741.
103. Edwards A. Unlocking the full potential of induced pluripotent stem cells for drug discovery //Drug Discovery. – 2018. – P. 45.
104. Egashira Y. The conditioned medium of murine and human adipose-derived stem cells exerts neuroprotective effects against experimental stroke model //Brain research. – 2012. – V. 1461. – P. 87-95.

- 105.Ehrhardt T. Patient-specific in vitro models for the analysis of late-onset Alzheimer's disease //European Neuropsychopharmacology. – 2019. – V. 29. – P. 904-905.
- 106.Emdad L. Efficient differentiation of human embryonic and induced pluripotent stem cells into functional astrocytes //Stem cells and development. – 2012. – V. 21. – №. 3. – P. 404-410.
- 107.Eminli S. Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression //Stem cells. – 2008. – V. 26. – №. 10. – P. 2467-2474.
- 108.Emsley H. C. Correlation of systemic inflammatory response with infarct volume in acute ischemic stroke patients //Stroke. – 2005. – V. 36. – №. 2. – P. 228.
- 109.Endres M. Ischemia and stroke //Molecular and Cellular Biology of Neuroprotection in the CNS. –2003. – P. 455-473.
- 110.Enomoto H. Hepatoma-derived growth factor is induced in liver regeneration //Hepatology Research. – 2009. – V. 39. – №. 10. – P. 988-997.
- 111.Ernst A. Patterning of the neural tube: A 3D computational modelling approach. – 2019.
- 112.Everett A. D. Hepatoma-derived growth factor is a pulmonary endothelial cell-expressed angiogenic factor //American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. – 2004. – V. 286. – №. 6. – P. 1194-1201.
- 113.Fantetti K. N. Members of the BMP, Shh, and FGF morphogen families promote chicken statoacoustic ganglion neurite outgrowth and neuron survival in vitro //Developmental neurobiology. – 2012. – V. 72. – №. 9. – P. 1213-1228.
- 114.Farhy-Tselnicker I. Astrocyte-secreted glypican 4 regulates release of neuronal pentraxin 1 from axons to induce functional synapse formation //Neuron. – 2017. – V. 96. – №. 2. – P. 428-445.
- 115.Fluri F. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research //Drug design, development and therapy. – 2015. – V. 9. – P. 3445.
- 116.Fortugno P. Regulation of survivin function by Hsp90 //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2003. – V. 100. – №. 24. – P. 13791-13796.
- 117.Franze K. The mechanical control of nervous system development //Development. – 2013. – V. 140. – №. 15. – P. 3069-3077.
- 118.Frost E. E. PDGF and FGF2 regulate oligodendrocyte progenitor responses to demyelination //Journal of neurobiology. – 2003. – V. 54. – №. 3. – P. 457-472.
- 119.Fukuda S. Potentiation of astrogliogenesis by STAT3-mediated activation of bone morphogenetic protein-Smad signaling in neural stem cells //Molecular and cellular biology. – 2007. – V. 27. – №. 13. – P. 4931-4937.
- 120.Furlaneto C. J. Apolipoproteins A-I and A-II downregulate neutrophil functions //Lipids. – 2002. – V. 37. – №. 9. – P. 925-928.
- 121.Fusaki N. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome //Proceedings of the Japan Academy, Series B. – 2009. – V. 85. – №. 8. – P. 348-362.
- 122.García-Hernández S. Role of fibroblast growth factor 8 in neurite outgrowth from spiral ganglion neurons in vitro //Brain research. – 2013. – V. 1529. – P. 39-45.
- 123.Garcia A.D. Inducible Differentiation of iPS-Derived Cardiomyocyte Precursor Cells into Cardiomyocytes Using Biomimetic shRNA Technology //The Thoracic and Cardiovascular Surgeon. – 2019. – V. 67. – №. 1. – P. 159.
- 124.Giffard R.G. Many mechanisms for hsp70 protection from cerebral ischemia //Journal of neurosurgical anesthesiology. – 2004. – V. 16. – №. 1. – P. 53-61.
- 125.Ginsberg M. Rodent models of cerebral ischemia //Stroke. – 1989. – V. 20. – №. 12. – P. 1627-1642.
- 126.Glover J. Retinoic acid and hindbrain patterning //Journal of neurobiology. – 2006. – V. 66. – №. 7. – P. 705-725.
- 127.Gnecchi M. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cells in tissue repair //Mesenchymal Stem Cells. – 2016. – P. 123-146.
- 128.Goto S. Poly (ADP-ribose) polymerase impairs early and long-term experimental stroke

- recovery //Stroke. – 2002. – V. 33. – №. 4. – P. 1101-1106.
- 129.Furman S. Subcellular localization and secretion of activity-dependent neuroprotective protein in astrocytes //Neuron glia biology. – 2004. – V. 1. – №. 3. – P. 193-199.
 - 130.Greco T. M. Quantitative mass spectrometry-based proteomics reveals the dynamic range of primary mouse astrocyte protein secretion //Journal of proteome research. – 2010. – V. 9. – №. 5. – P. 2764-2774.
 - 131.Grenningloh G. Role of the microtubule destabilizing proteins SCG10 and stathmin in neuronal growth //Journal of neurobiology. – 2004. – V. 58. – №. 1. – P. 60-69.
 - 132.Grskovic M. Induced pluripotent stem cells—opportunities for disease modelling and drug discovery //Nature reviews Drug discovery. – 2011. – V. 10. – №. 12. – P. 915-929.
 - 133.Guan X. Transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial function and reverses ventricular remodeling in infarcted rat hearts //Stem cell research & therapy. – 2020. – V. 11. – №. 1. – P. 1-11.
 - 134.Gunaseeli I. Induced pluripotent stem cells as a model for accelerated patient-and disease-specific drug discovery //Current medicinal chemistry. – 2010. – V. 17. – №. 8. – P. 759-766.
 - 135.Hackett C. H. Embryonic stem cells and iPS cells: sources and characteristics //Veterinary Clinics: Equine Practice. – 2011. – V. 27. – №. 2. – P. 233-242.
 - 136.Han D. Proteomic analysis of mouse astrocytes and their secretome by a combination of FASP and StageTip-based, high pH, reversed-phase fractionation //Proteomics. – 2014. – V. 14. – №. 13-14. – P. 1604-1609.
 - 137.Hanna J. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin //Science. – 2007. – V. 318. – №. 5858. – P. 1920-1923.
 - 138.Hao P. Conditioned medium of human adipose-derived mesenchymal stem cells mediates protection in neurons following glutamate excitotoxicity by regulating energy metabolism and GAP-43 expression //Metabolic brain disease. – 2014. – V. 29. – №. 1. – P. 193-205.
 - 139.Harada H. Fgf8 signaling for development of the midbrain and hindbrain //Development, growth & differentiation. – 2016. – V. 58. – №. 5. – P. 437-445.
 - 140.Hardiman O. Amyotrophic lateral sclerosis //Nature Reviews Disease Primers. – 2017. – V. 3. – №. 1. – P. 1-19.
 - 141.Harms C. Neuronal gelsolin prevents apoptosis by enhancing actin depolymerization //Molecular and Cellular Neuroscience. – 2004. – V. 25. – №. 1. – P. 69-82.
 - 142.Haro-Mora J.J. Biallelic correction of sickle cell disease-derived induced pluripotent stem cells (iPSCs) confirmed at the protein level through serum-free iPS-sac/erythroid differentiation //Stem Cells Translational Medicine. – 2020. – V. 9. – №. 5. – P. 590.
 - 143.Hartfield E. M. Physiological characterisation of human iPS-derived dopaminergic neurons //PloS one. – 2014. – V. 9. – №. 2.
 - 144.Hayashi Y. The intra-arterial injection of microglia protects hippocampal CA1 neurons against global ischemia-induced functional deficits in rats //Neuroscience. – 2006. – V. 142. – №. 1. – P. 87-96.
 - 145.Henry G. L. TGF-beta signals and a pattern in *Xenopus laevis* endodermal development //Development. – 1996. – V. 122. – №. 3. – P. 1007-1015.
 - 146.Hermanto Y. Xeno-free culture for generation of forebrain oligodendrocyte precursor cells from human pluripotent stem cells //Journal of neuroscience research. – 2019. – V. 97. – №. 7. – P. 828-845.
 - 147.Herradon G. Targeting midkine and pleiotrophin signalling pathways in addiction and neurodegenerative disorders: recent progress and perspectives //British journal of pharmacology. – 2014. – V. 171. – №. 4. – P. 837-848.
 - 148.Hicks C. In vivo and in vitro characterization of the angiogenic effect of CTX0E03 human neural stem cells //Cell transplantation. – 2013. – V. 22. – №. 9. – P. 1541-1552.
 - 149.Hida H. Pleiotrophin exhibits a trophic effect on survival of dopaminergic neurons in vitro //European Journal of Neuroscience. – 2003. – V. 17. – №. 10. – P. 2127-2134.
 - 150.Hirata S. Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia iPS cells exhibit defective MPL-

- mediated signaling //The Journal of clinical investigation. – 2013. – V. 123. – №. 9. – P. 3802-3814.
- 151.Hoffman J. R. Thrombospondin expression in nerve regeneration I. Comparison of sciatic nerve crush, transection, and long-term denervation //Brain research bulletin. – 1999. – V. 48. – №. 4. – P. 413-420.
 - 152.Hoffman L. M. Characterization and culture of human embryonic stem cells //Nature biotechnology. – 2005. – V. 23. – №. 6. – P. 699-708.
 - 153.Horna-Terrón E. TXNDC5, a newly discovered disulfide isomerase with a key role in cell physiology and pathology //International journal of molecular sciences. – 2014. – V. 15. – №. 12. – P. 23501-23518.
 - 154.Hosokawa H. Vascular endothelial cells that express dystroglycan are involved in angiogenesis //Journal of cell science. – 2002. – V. 115. – №. 7. – P. 1487-1496.
 - 155.Hu B. Y. Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2010. – V. 107. – №. 9. – P. 4335-4340.
 - 156.Hu X. Microglial and macrophage polarization—new prospects for brain repair //Nature Reviews Neurology. – 2015. – V. 11. – №. 1. – P. 56.
 - 157.Hu X. Peroxiredoxin-2 protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic neurodegeneration via attenuation of the apoptosis signal-regulating kinase (ASK1) signaling cascade //Journal of Neuroscience. – 2011. – V. 31. – №. 1. – P. 247-261.
 - 158.Hu X. L. Dynamic changes of the anti-and pro-apoptotic proteins Bcl-w, Bcl-2, and Bax with Smac/Diablo mitochondrial release after photothrombotic ring stroke in rats //European journal of neuroscience. – 2004. – V. 20. – №. 5. – P. 1177-1188.
 - 159.Hung S.C. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis //Stem cells. – 2007. – V. 25. – №. 9. – P. 2363-2370.
 - 160.Huot J. Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells //Circulation research. – 1997. – V. 80. – №. 3. – P. 383-392.
 - 161.Huzé C. Identification of an agrin mutation that causes congenital myasthenia and affects synapse function //The American Journal of Human Genetics. – 2009. – V. 85. – №. 2. – P. 155-167.
 - 162.Iadecola C. The immunology of stroke: from mechanisms to translation //Nature medicine. – 2011. – V. 17. – №. 7. – P. 796.
 - 163.Ignácio Z.M. Pathophysiological mechanisms of Huntington's disease //Pathology, Prevention and Therapeutics of Neurodegenerative Disease. –2019. – P. 49-60.
 - 164.Imai H. Antioxidant ebselen reduces oxidative damage in focal cerebral ischemia //Free Radical Biology and Medicine. – 2003. – V. 34. – №. 1. – P. 56-63.
 - 165.Irioka T. Distinct effects of caudalizing factors on regional specification of embryonic stem cell-derived neural precursors //Developmental brain research. – 2005. – V. 154. – №. 1. – P. 63-70.
 - 166.Ishida M. Transplantation of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes is superior to somatic stem cell therapy for restoring cardiac function and oxygen consumption in a porcine model of myocardial infarction //Transplantation. – 2019. – V. 103. – №. 2. – P. 291.
 - 167.Ishihara A. Transforming growth factor- β 1 and- β 2 promote neurite sprouting and elongation of cultured rat hippocampal neurons //Brain research. – 1994. – V. 639. – №. 1. – P. 21-25.
 - 168.Itskovitz-Eldor J. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers //Molecular medicine. – 2000. – V. 6. – №. 2. – P. 88.
 - 169.Jessen K.R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves //Nature Reviews Neuroscience. – 2005. – V. 6. – №. 9. – P. 671-682.
 - 170.Jha M.K. Functional dissection of astrocyte-secreted proteins: implications in brain health and

- diseases //Progress in neurobiology. – 2018. – V. 162. – P. 37-69.
- 171.Jha M.K. Proteome of brain glia: the molecular basis of diverse glial phenotypes //Proteomics. – 2014. – V. 14. – № 4-5. – P. 378-398.
 - 172.177. Jia G. Neural stem cell-conditioned medium ameliorates A β 25–35-induced damage in SH-SY5Y cells by protecting mitochondrial function //Bosnian Journal of Basic Medical Sciences. – 2020.
 - 173.Jia J. Immunology of Ischemic Stroke: Impact, Mechanisms, and Immunomodulatory Therapies //Translational Research in Stroke. –2017. – P. 237-277.
 - 174.Jiang Y. Amelioration of postoperative cognitive dysfunction in mice by mesenchymal stem cell-conditioned medium treatments is associated with reduced inflammation, oxidative stress and increased BDNF expression in brain tissues //Neuroscience letters. – 2019. – V. 709. – P. 134372.
 - 175.Jin R. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells //Journal of leukocyte biology. – 2010. – V. 87. – № 5. – P. 779-789.
 - 176.Joel M.D. MSC: immunoregulatory effects, roles on neutrophils and evolving clinical potentials //American journal of translational research. – 2019. – V. 11. – № 6. – P. 3890.
 - 177.Julia T.C. An efficient platform for astrocyte differentiation from human induced pluripotent stem cells //Stem cell reports. – 2017. – V. 9. – № 2. – P. 600-614.
 - 178.Jung M. Modeling schizophrenia in vitro by the generation of neurons from of neurons from patient-specific stem cells //European Neuropsychopharmacology. – 2019. – V. 29. – P. 946.
 - 179.Kaji K. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors //Nature. – 2009. – V. 458. – № 7239. – P. 771-775.
 - 180.Karney-Grobe S. HSP90 is a chaperone for DLK and is required for axon injury signaling //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2018. – V. 115. – № 42. – P. 9899-9908.
 - 181.Katagiri W. Angiogenesis in newly regenerated bone by secretomes of human mesenchymal stem cells //Maxillofacial plastic and reconstructive surgery. – 2017. – V. 39. – № 1. – P. 1-8.
 - 182.Kaur H. Animal Models of Ischemic Stroke //Application of Biomedical Engineering in Neuroscience. – 2019. – P. 41-50.
 - 183.Keirstead H.S. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury //Journal of Neuroscience. – 2005. – V. 25. – № 19. – P. 4694-4705.
 - 184.Khoshnam S.E. Pathogenic mechanisms following ischemic stroke //Neurological Sciences. – 2017. – V. 38. – № 7. – P. 1167-1186.
 - 185.Khubutiya M.S. Paracrine mechanisms of proliferative, anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of mesenchymal stromal cells in models of acute organ injury //Cytotherapy. – 2014. – V. 16. – № 5. – P. 579-585.
 - 186.Kikuchi T. Survival of human induced pluripotent stem cell-derived midbrain dopaminergic neurons in the brain of a primate model of Parkinson's disease //Journal of Parkinson's disease. – 2011. – V. 1. – № 4. – P. 395-412.
 - 187.Kim D. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins //Cell stem cell. – 2009. – V. 4. – № 6. – P. 472.
 - 188.Kim G. W. Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates cerebral infarction after focal cerebral ischemia/reperfusion in mice: implications for the production and role of superoxide radicals //Stroke. – 2002. – V. 33. – № 3. – P. 809-815.
 - 189.Kim J.H. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease //Nature. – 2002. – V. 418. – № 6893. – P. 50-56.
 - 190.Kim J.H. Proteomic examination of the neuroglial secretome: lessons for the clinic //Expert Review of Proteomics. – 2020.
 - 191.Kim J.T. Treatment with tissue plasminogen activator in the golden hour and the shape of the 4.5-hour time-benefit curve in the National United States Get With The Guidelines-Stroke Population //Circulation. – 2017. – V. 135. – № 2. – P. 128-139.
 - 192.Kitagawa K. Amelioration of hippocampal neuronal damage after global ischemia by neuronal

- overexpression of BCL-2 in transgenic mice //Stroke. – 1998. – V. 29. – P. 2616-2620.
- 193.Koizumi J. Experimental studies of ischemic brain edema. 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area //Jpn J stroke. – 1986. – V. 8. – P. 1-8.
 - 194.Korf-Klingebiel M. Bone marrow cells are a rich source of growth factors and cytokines: implications for cell therapy trials after myocardial infarction //European heart journal. – 2008. – V. 29. – № 23. – P. 2851-2858.
 - 195.Kotani Y. Prosaposin facilitates sciatic nerve regeneration in vivo //Journal of neurochemistry. – 1996. – V. 66. – № 5. – P. 2019-2025.
 - 196.Koya R. C. et al. Gelsolin inhibits apoptosis by blocking mitochondrial membrane potential loss and cytochrome c release //Journal of Biological Chemistry. – 2000. – V. 275. – №. 20. – P. 15343-15349.
 - 197.Krämer D. Cell culture of primary cerebellar granule cells //Mouse Cell Culture. – 2010. – P. 233-239.
 - 198.Kratsios P. Nervous system development: flies and worms converging on neuron identity control //Current Biology. – 2018. – V. 28. – №. 19. – P. 1154-1157.
 - 199.Krencik R. Directed differentiation of functional astroglial subtypes from human pluripotent stem cells //Nature protocols. – 2011. – V. 6. – №. 11. – P. 1710.
 - 200.Kritis A.A. Researching glutamate-induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study //Frontiers in cellular neuroscience. – 2015. – V. 9. – P. 91.
 - 201.Kubal C. Bone marrow cells have a potent anti-ischemic effect against myocardial cell death in humans //The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. – 2006. – V. 132. – №. 5. – P. 1112-1118.
 - 202.Kucukdereli H. Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2011. – V. 108. – №. 32. – P. 440-449.
 - 203.Kumar P. The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine //Cytokine & growth factor reviews. – 2019. – V. 46. – P. 1-9.
 - 204.Kuno R. The role of TNF-alpha and its receptors in the production of NGF and GDNF by astrocytes //Brain research. – 2006. – V. 1116. – №. 1. – P. 12-18.
 - 205.210. Kurosawa N. Glypican-2 binds to midkine: the role of glypican-2 in neuronal cell adhesion and neurite outgrowth //Glycoconjugate journal. – 2001. – V. 18. – №. 6. – P. 499-507.
 - 206.Kwon D.J. Generation of leukemia inhibitory factor-dependent induced pluripotent stem cells from the Massachusetts General Hospital miniature pig //BioMed research international. – 2013. – V. 2013.
 - 207.Lagarkova M.A. Induction of pluripotency in human endothelial cells resets epigenetic profile on genome scale //Cell cycle. – 2010. – V. 9. – №. 5. – P. 937-946.
 - 208.Laing A.G. Mesenchymal stem cells inhibit T-cell function through conserved induction of cellular stress //PloS one. – 2019. – V. 14. – №. 3.
 - 209.Lee H.W. Involvement of thioredoxin domain-containing 5 in resistance to nitrosative stress //Free Radical Biology and Medicine. – 2010. – V. 49. – №. 5. – P. 872-880.
 - 210.Lee I.H. Delayed epidural transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived neural progenitors enhances functional recovery after stroke //Scientific reports. – 2017. – V. 7. – №. 1. – P. 1-12.
 - 211.Levine A.J. Proposal of a model of mammalian neural induction //Developmental biology. – 2007. – V. 308. – №. 2. – P. 247-256.
 - 212.Lewis J.A. Degradation of the death domain kinase RIP induced by the Hsp90 specific inhibitor geldanamycin sensitizes cells to TNF-induced apoptosis //J Biol Chem. – 2000. – V. 275. – P. 10519-26.

- 213.Li L. Use of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride-stained brain tissues for immunofluorescence analyses after focal cerebral ischemia in rats //Pathology-Research and Practice. – 2018. – V. 214. – №. 1. – P. 174-179.
- 214.Li P. Accelerated generation of oligodendrocyte progenitor cells from human induced pluripotent stem cells by forced expression of Sox10 and Olig2 //Science China Life Sciences. – 2016. – V. 59. – №. 11. – P. 1131-1138.
- 215.Li S. Rapid and Efficient Differentiation of Rodent Neural Stem Cells into Oligodendrocyte Progenitor Cells //Developmental neuroscience. – 2019. – V. 41. – №. 1-2. – P. 79-93.
- 216.Li W. Generation of human-induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 //Stem cells. – 2009. – V. 27. – №. 12. – P. 2992-3000.
- 217.Li W. Angiogenesis and neurogenesis after ischemic stroke //Translational Research in Stroke. – 2017. – P. 297-317.
- 218.Liang P. Neural stem cell-conditioned medium protects neurons and promotes propriospinal neurons relay neural circuit reconnection after spinal cord injury //Cell transplantation. – 2014. – V. 23. – №. 1. – P. 45-56.
- 219.Lim M.S. FGF8 is essential for functionality of induced neural precursor cell-derived dopaminergic neurons //International journal of stem cells. – 2015. – V. 8. – №. 2. – P. 228.
- 220.Lin M.T. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases //Nature. – 2006. – V. 443. – №. 7113. – P. 787-795.
- 221.Liu F. C1ql1/Ctrp14 and C1ql4/Ctrp11 promote angiogenesis of endothelial cells through activation of ERK1/2 signal pathway //Molecular and cellular biochemistry. – 2017. – V. 424. – №. 1-2. – P. 57-67.
- 222.Liu H. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts //Cell stem cell. – 2008. – V. 3. – №. 6. – P. 587-590.
- 223.Liu H. Specification of neuronal and glial subtypes from human pluripotent stem cells //Cellular and Molecular Life Sciences. – 2011. – V. 68. – №. 24. – P. 3995-4008.
- 224.Liu J.P. Assigning the positional identity of spinal motor neurons: rostrocaudal patterning of Hox-c expression by FGFs, Gdf11, and retinoids //Neuron. – 2001. – V. 32. – №. 6. – P. 997-1012.
- 225.Liu S. Hydroxyl radical formation is greater in striatal core than in penumbra in a rat model of ischemic stroke //Journal of neuroscience research. – 2003. – V. 71. – №. 6. – P. 882-888.
- 226.Liu Y. NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo //Journal of Neuroscience. – 2007. – V. 27. – №. 11. – P. 2846-2857.
- 227.Lo E.H. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke //Nature reviews neuroscience. – 2003. – V. 4. – №. 5. – P. 399-414.
- 228.Locatelli F. Stem cell therapy in stroke //Cellular and Molecular Life Sciences. – 2009. – V. 66. – №. 5. – P. 757-772.
- 229.Lorenzo A.F. Hsp70 regulation on Nox4/p22phox and cytoskeletal integrity as an effect of losartan in vascular smooth muscle cells //Cell Stress and Chaperones. – 2014. – V. 19. – №. 1. – P. 115-134.
- 230.Longa E. Z. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats //Stroke. – 1989. – V. 20. – №. 1. – P. CP84-91.
- 231.Lucas S.M. The role of inflammation in CNS injury and disease //British journal of pharmacology. – 2006. – V. 147. – №. 1. – P. 232-240.
- 232.Marz P. Ataxin-10, the spinocerebellar ataxia type 10 neurodegenerative disorder protein, is essential for survival of cerebellar neurons //Journal of Biological Chemistry. – 2004. – V. 279. – №. 34. – P. 35542-35550.
- 233.Ma Y. The biphasic function of microglia in ischemic stroke //Progress in neurobiology. – 2017. – V. 157. – P. 247-272.
- 234.Maherali N. A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells //Cell stem cell. – 2008. – V. 3. – №. 3. – P. 340-345.
- 235.Malone K. The immune system and stroke: from current targets to future therapy //Immunology

- and cell biology. – 2019. – V. 97. – №. 1. – P. 5-16.
- 236.Mangin G. Cell therapy for ischemic stroke: how to turn a promising preclinical research into a successful clinical story //Stem cell reviews and reports. – 2019. – V. 15. – №. 2. – P. 176-193.
 - 237.Manley N.C. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cells: preclinical efficacy and safety in cervical spinal cord injury //Stem cells translational medicine. – 2017. – V. 6. – №. 10. – P. 1917-1929.
 - 238.Martel M.A. In developing hippocampal neurons, NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) can mediate signaling to neuronal survival and synaptic potentiation, as well as neuronal death //Neuroscience. – 2009. – V. 158. – №. 1. – P. 334-343.
 - 239.Martino G. The therapeutic potential of neural stem cells //Nature Reviews Neuroscience. – 2006. – V. 7. – №. 5. – P. 395-406.
 - 240.Martins L.F. Mesenchymal stem cells secretome-induced axonal outgrowth is mediated by BDNF //Scientific reports. – 2017. – V. 7. – №. 1. – P. 1-13.
 - 241.Mason I. Regulation and function of FGF8 in patterning of midbrain and anterior hindbrain //Biochemistry and Cell Biology. – 2000. – V. 78. – №. 5. – P. 577-584.
 - 242.Matarrese P. Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties //International journal of cancer. – 2000. – V. 85. – №. 4. – P. 545-554.
 - 243.Matarrese P. Galectin-3 overexpression protects from cell damage and death by influencing mitochondrial homeostasis //FEBS letters. – 2000. – V. 473. – №. 3. – P. 311-315.
 - 244.Matjusaitis M. Programming and reprogramming neural cell types using synthetic transcription factors. – 2016.
 - 245.Matsumoto T. Small heat shock protein beta-1 (HSPB1) is upregulated and regulates autophagy and apoptosis of renal tubular cells in acute kidney injury //PLoS One. – 2015. – V. 10. – №. 5.
 - 246.Matsunaga E. Periostin, a neurite outgrowth-promoting factor, is expressed at high levels in the primate cerebral cortex //Development, growth & differentiation. – 2015. – V. 57. – №. 3. – P. 200-208.
 - 247.Mendes-Pinheiro B. Secretome of undifferentiated neural progenitor cells induces histological and motor improvements in a rat model of Parkinson's disease //Stem cells translational medicine. – 2018. – V. 7. – №. 11. – P. 829-838.
 - 248.Meuth S.G. CNS inflammation and neuronal degeneration is aggravated by impaired CD200–CD200R-mediated macrophage silencing //Journal of neuroimmunology. – 2008. – V. 194. – №. 1-2. – P. 62-69.
 - 249.Ming G. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system //Annu. Rev. Neurosci. – 2005. – V. 28. – P. 223-250.
 - 250.Mita T. Conditioned medium from the stem cells of human dental pulp improves cognitive function in a mouse model of Alzheimer's disease //Behavioural Brain Research. – 2015. – V. 293. – P. 189-197.
 - 251.Mitchell R.A. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2002. – V. 99. – №. 1. – P. 345-350.
 - 252.Mizutani R. Sorting nexin 3, a protein upregulated by lithium, contains a novel phosphatidylinositol-binding sequence and mediates neurite outgrowth in N1E-115 cells //Cellular signalling. – 2009. – V. 21. – №. 11. – P. 1586-1594.
 - 253.Moghadasali R. et al. The effect of Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) and retinoic acid on differentiation of mouse embryonic stem cells into neural cells. – 2006. – P. 125-133.
 - 254.Montaner J. Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke: temporal profile and relation to neurological impairment //Stroke. – 2001. – V. 32. – №. 8. – P. 1759-1766.
 - 255.Montaner J. Matrix metalloproteinases and ADAMs in stroke //Cellular and Molecular Life Sciences. – 2019. – V. 76. – №. 16. – P. 3117-3140.
 - 256.Monteforte A.J. Glypican-1 nanoliposomes for potentiating growth factor activity in therapeutic angiogenesis //Biomaterials. – 2016. – V. 94. – P. 45-56.

257. Moon C. Leukemia inhibitory factor promotes olfactory sensory neuronal survival via phosphoinositide 3-kinase pathway activation and Bcl-2 // *Journal of neuroscience research*. – 2009. – V. 87. – №. 5. – P. 1098-1106.
258. Moreno-Flores M.T. Ephrin-B1 promotes dendrite outgrowth on cerebellar granule neurons // *Molecular and Cellular Neuroscience*. – 2002. – V. 20. – №. 3. – P. 429-446.
259. Moreno-Flores M.T. Semaphorin 3C preserves survival and induces neuritogenesis of cerebellar granule neurons in culture // *Journal of neurochemistry*. – 2003. – V. 87. – №. 4. – P. 879-890.
260. Moskowitz M.A. The science of stroke: mechanisms in search of treatments // *Neuron*. – 2010. – V. 67. – №. 2. – P. 181-198.
261. Mosser D. D. et al. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis // *Molecular and cellular biology*. – 1997. – T. 17. – №. 9. – C. 5317-5327.
262. Mukai T. Nagamura-Inoue T. Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells contribute to neuroprotection in neonatal cortical neurons damaged by oxygen-glucose deprivation // *Frontiers in Neurology*. – 2018. – V. 9. – P. 466.
263. Muramatsu T. Midkine, a heparin-binding cytokine with multiple roles in development, repair and diseases // *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. – 2010. – V. 86. – №. 4. – P. 410-425.
264. Murtie J.C. PDGF and FGF2 pathways regulate distinct oligodendrocyte lineage responses in experimental demyelination with spontaneous remyelination // *Neurobiology of disease*. – 2005. – V. 19. – №. 1-2. – P. 171-182.
265. Newitt V.N. Utilizing iPS Cells to Advance Leukemia Research Via Human Models. – 2018. – V. 40. – №. 5. – P. 26-27.
266. Nicholls D.G. Mitochondrial calcium function and dysfunction in the central nervous system // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. – 2009. – V. 1787. – №. 11. – P. 1416-1424.
267. Niclis J.C. Efficiently specified ventral midbrain dopamine neurons from human pluripotent stem cells under xeno-free conditions restore motor deficits in parkinsonian rodents // *Stem cells translational medicine*. – 2017. – V. 6. – №. 3. – P. 937-948.
268. Niizuma K. Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. – 2010. – V. 1802. – №. 1. – P. 92-99.
269. Nishihara T. Activin A induces apoptotic cell death // *Biochemical and biophysical research communications*. – 1993. – V. 197. – №. 2. – P. 985-991.
270. Nizzardo M. Human motor neuron generation from embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells // *Cellular and molecular life sciences*. – 2010. – V. 67. – №. 22. – P. 3837-3847.
271. O'Brien J.S. Identification of prosaposin as a neurotrophic factor // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1994. – V. 91. – №. 20. – P. 9593-9596.
272. Olmo N. Pleiotrophin inhibits hippocampal long-term potentiation: a role of pleiotrophin in learning and memory // *Growth Factors*. – 2009. – V. 27. – №. 3. – P. 189-194.
273. Orrenius S. Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link // *Nature reviews Molecular cell biology*. – 2003. – V. 4. – №. 7. – P. 552-565.
274. Osterwalder T. The axonally secreted serine proteinase inhibitor, neuroserpin, inhibits plasminogen activators and plasmin but not thrombin // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – V. 273. – №. 4. – P. 2312-2321.
275. Palma-Tortosa S. Activity in grafted human iPS cell–derived cortical neurons integrated in stroke-injured rat brain regulates motor behavior // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2020. – V. 117. – №. 16. – P. 9094-9100.
276. Pan J. Reperfusion injury following cerebral ischemia: pathophysiology, MR imaging, and potential therapies // *Neuroradiology*. – 2007. – V. 49. – №. 2. – P. 93-102.
277. Panchision D.M. The control of neural stem cells by morphogenic signals // *Current opinion in*

- genetics & development. – 2002. – V. 12. – №. 4. – P. 478-487.
- 278.Park K.P. Plasma and brain matrix metalloproteinase-9 after acute focal cerebral ischemia in rats //Stroke. – 2009. – V. 40. – №. 8. – P. 2836-2842.
- 279.Parmar P.K. и. Neuroserpin regulates neurite outgrowth in nerve growth factor-treated PC12 cells // J. Neurochem. – 2002. – V. 82. – № 6. – P. 1406–1415.
- 280.Pawitan J.A. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine //BioMed research international. – 2014. – V. 2014.
- 281.Pellegrini S. Human-induced pluripotent stem cells (iPSC) as a source of insulin-producing cells //Transplantation, Bioengineering, and Regeneration of the Endocrine Pancreas. – Academic Press, 2020. – P. 381-396.
- 282.Perez-de-Puig I. Neutrophil recruitment to the brain in mouse and human ischemic stroke //Acta neuropathologica. – 2015. – V. 129. – №. 2. – P. 239-257.
- 283.Phani S. Gremlin is a novel VTA derived neuroprotective factor for dopamine neurons //Brain research. – 2013. – V. 1500. – P. 88-98.
- 284.Pike L.S. Inhibition of fatty acid oxidation by etomoxir impairs NADPH production and increases reactive oxygen species resulting in ATP depletion and cell death in human glioblastoma cells //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. – 2011. – V. 1807. – №. 6. – P. 726-734.
- 285.Pinheiro M.A. Immune cell trafficking across the barriers of the central nervous system in multiple sclerosis and stroke //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. – 2016. – V. 1862. – №. 3. – P. 461-471.
- 286.Pires A.O. The secretome of bone marrow and Wharton jelly derived mesenchymal stem cells induces differentiation and neurite outgrowth in SH-SY5Y cells //Stem cells international. – 2014. – V. 2014.
- 287.Powers W.J. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: 2019 update to the 2018 guidelines for the early management of acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association//American Stroke Association. – 2019. – V50. – №12. – P. 344-418.
- 288.Pre D. A time course analysis of the electrophysiological properties of neurons differentiated from human induced pluripotent stem cells (iPSCs) //PloS one. – 2014. – V. 9. – №. 7.
- 289.Prentice H. Mechanisms of neuronal protection against excitotoxicity, endoplasmic reticulum stress, and mitochondrial dysfunction in stroke and neurodegenerative diseases //Oxidative medicine and cellular longevity. – 2015. – v. 2015.
- 290.Presgraves S.P. Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists //Neurotoxicity research. – 2003. – V. 5. – №. 8. – P. 579-598.
- 291.Price J. Glial cell lineage and development //Current opinion in neurobiology. – 1994. – V. 4. – №. 5. – P. 680-686.
- 292.Radak D. Apoptosis and acute brain ischemia in ischemic stroke //Current vascular pharmacology. – 2017. – V. 15. – №. 2. – P. 115-122.
- 293.Rane M.J. Heat shock protein 27 controls apoptosis by regulating Akt activation //Journal of Biological Chemistry. – 2003. – V. 278. – №. 30. – P. 27828-27835.
- 294.Rani S. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: toward cell-free therapeutic applications //Molecular Therapy. – 2015. – V. 23. – №. 5. – P. 812-823.
- 295.Rao Z. Peroxiredoxin 4 inhibits IL-1 β -induced chondrocyte apoptosis via PI3K/AKT signaling //Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2017. – V. 90. – P. 414-420.
- 296.De Robertis E.M. Spemann's organizer and self-regulation in amphibian embryos //Nature reviews Molecular cell biology. – 2006. – V. 7. – №. 4. – P. 296-302.
- 297.Rodríguez-Traver E. A collection of integration-free iPSCs derived from Parkinson's disease patients carrying mutations in the GBA1 gene //Stem cell research. – 2019. – V. 38. – P. 101482.
- 298.Roof R.L. A comparison of long-term functional outcome after 2 middle cerebral artery

- occlusion models in rats //Stroke. – 2001. – V. 32. – №. 11. – P. 2648-2657.
- 299.Roussa E. Induction and specification of midbrain dopaminergic cells: focus on SHH, FGF8, and TGF- β //Cell and tissue research. – 2004. – V. 318. – № 1. – P. 23-33.
- 300.Di Ruscio A. Multiple sclerosis: getting personal with induced pluripotent stem cells //Cell death & disease. – 2015. – V. 6. – № 7. – P. 1806.
- 301.Ryu S. Human neural stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and enhance angiogenesis in ischemic rat brain //Neural regeneration research. – 2016. – V. 11. – № 2. – P. 298.
- 302.Sakamoto M. VGF, which is induced transcriptionally in stroke brain, enhances neurite extension and confers protection against ischemia in vitro //Translational stroke research. – 2015. – V. 6. – № 4. – P. 301-308.
- 303.Salinas P.C. Wnt signaling in the vertebrate central nervous system: from axon guidance to synaptic function //Cold Spring Harbor perspectives in biology. – 2012. – V. 4. – №. 2. – P. 8003.
- 304.Salinas P.C. Wnts in action: from synapse formation to synaptic maintenance //Frontiers in cellular neuroscience. – 2013. – V. 7. – P. 162.
- 305.Santos D.P. Generation of spinal motor neurons from human pluripotent stem cells //Synapse Development. – 2017. – P. 53-66.
- 306.Sasai Y. Endoderm induction by the organizer-secreted factors chordin and noggin in *Xenopus* animal caps //The EMBO Journal. – 1996. – V. 15. – № 17. – P. 4547-4555.
- 307.Sato S. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90 //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2000. – V. 97. – № 20. – P. 10832-10837.
- 308.Sattler R. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity //Journal of molecular medicine. – 2000. – V. 78. – № 1. – P. 3-13.
- 309.Savinkova I. G. Peptides analogous to tethered ligands liberated by activated protein C exert neuroprotective effects in glutamate-induced excitotoxicity //Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. – 2014. – V. 8. – №. 1. – P. 116-120.
- 310.Savitz S.I. Cell therapy for stroke //NeuroRx. – 2004. – V. 1. – №. 4. – P. 406-414.
- 311.Schaller B. Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy //Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 2004. – V. 24. – №. 4. – P. 351-371.
- 312.Scott C.W. Human induced pluripotent stem cells and their use in drug discovery for toxicity testing //Toxicology letters. – 2013. – V. 219. – №. 1. – P. 49-58.
- 313.Serafini T. Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system //Cell. – 1996. – V. 87. – №. 6. – P. 1001-1014.
- 314.Shaltouki A. Efficient generation of astrocytes from human pluripotent stem cells in defined conditions //Stem cells. – 2013. – V. 31. – №. 5. – P. 941-952.
- 315.Shi Y.N. Wnt5a and its signaling pathway in angiogenesis //Clinica Chimica Acta. – 2017. – V. 471. – P. 263-269.
- 316.Shi Y. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds //Cell stem cell. – 2008. – V. 3. – №. 5. – P. 568-574.
- 317.Shi Y. Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks //Nature protocols. – 2012. – V. 7. – № 10. – P. 1836.
- 318.Shiba Y. Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts //Nature. – 2016. – V. 538. – №. 7625. – P. 388-391.
- 319.Shih C.H. Astroglial-derived periostin promotes axonal regeneration after spinal cord injury //Journal of Neuroscience. – 2014. – V. 34. – №. 7. – P. 2438-2443.
- 320.Shimada I.S. Stem and progenitor cells for neurological repair: Minor issues, major hurdles, and exciting opportunities for paracrine-based therapeutics //Journal of cellular biochemistry. – 2011. – V. 112. – №. 2. – P. 374-380.
- 321.Shimazu T. A peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist reduces infarct size in transient but not in permanent ischemia //Stroke. – 2005. – V. 36. – №. 2. – P. 353-359.

- 322.Shipley M.M. Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line // *Journal of Visualized Experiments*. – 2016. – № 108. – P. 53193.
- 323.Shiue S.J. Mesenchymal stem cell exosomes as a cell-free therapy for nerve injury-induced pain in rats // *Pain*. – 2019. – V. 160. – №. 1. – P. 210-223.
- 324.Si D. Progesterone protects blood-brain barrier function and improves neurological outcome following traumatic brain injury in rats // *Experimental and therapeutic medicine*. – 2014. – V. 8. – № 3. – P. 1010-1014.
- 325.Sigoillot S.M. The secreted protein C1QL1 and its receptor BAI3 control the synaptic connectivity of excitatory inputs converging on cerebellar Purkinje cells // *Cell reports*. – 2015. – V. 10. – №. 5. – P. 820-832.
- 326.Silvestre J.S. Lactadherin promotes VEGF-dependent neovascularization // *Nature medicine*. – 2005. – V. 11. – №. 5. – P. 499-506.
- 327.Simion A. The Role of Antioxidant Treatment in Acute Ischemic Stroke: Past, Present and Future // *Neurol Res Surg*. – 2019. – V. 2. – №. 2. – P. 1-7.
- 328.Simon C.S. Top to Tail: Anterior-Posterior Patterning Precedes Regional Nervous System Identity // *Cell*. – 2018. – V. 175. – № 4. – P. 905-907.
- 329.Singh V.K. Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery // *Frontiers in cell and developmental biology*. – 2015. – V. 3. – P. 2.
- 330.Singhal A.B. Ischemic stroke: Basic pathophysiology and neuroprotective strategies // *Acute Ischemic Stroke: Imaging and Intervention*. – 2006. – P. 1–24.
- 331.Soeda S. Anti-apoptotic roles of plasminogen activator inhibitor-1 as a neurotrophic factor in the central nervous system // *Thrombosis and haemostasis*. – 2008. – V. 100. – № 12. – P. 1014-1020.
- 332.Son B. K. et al. Adiponectin antagonizes stimulatory effect of tumor necrosis factor- α on vascular smooth muscle cell calcification: regulation of growth arrest-specific gene 6-mediated survival pathway by adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase // *Endocrinology*. – 2008. – T. 149. – №. 4. – C. 1646-1653.
- 333.Song B. Human autologous iPSC-derived dopaminergic progenitors restore motor function in Parkinson's disease models // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2020. – V. 130. – № 2. – P. 904-920.
- 334.Stacpoole S.R. High yields of oligodendrocyte lineage cells from human embryonic stem cells at physiological oxygen tensions for evaluation of translational biology // *Stem cell reports*. – 2013. – V. 1. – № 5. – P. 437-450.
- 335.Stern C.D. Neural induction: 10 years on since the 'default model' // *Current opinion in cell biology*. – 2006. – V. 18. – №. 6. – P. 692-697.
- 336.Stoddard-Bennett T. Treatment of Parkinson's disease through personalized medicine and induced pluripotent stem cells // *Cells*. – 2019. – V. 8. – №. 1. – P. 26.
- 337.Strelau J. Growth/differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 is a novel trophic factor for midbrain dopaminergic neurons in vivo // *Journal of Neuroscience*. – 2000. – V. 20. – №. 23. – P. 8597-8603.
- 338.Stroke T. Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development // *Stroke*. – 1999. – V. 30. – № 12. – P. 2752.
- 339.Su Y. Silencing miR-21 induces polarization of astrocytes to the A2 phenotype and improves the formation of synapses by targeting glypican 6 via the signal transducer and activator of transcription-3 pathway after acute ischemic spinal cord injury // *The FASEB Journal*. – 2019. – V. 33. – №. 10. – P. 10859-10871.
- 340.Subramaniam S. Growth differentiation factor-15 prevents low potassium-induced cell death of cerebellar granule neurons by differential regulation of Akt and ERK pathways // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – V. 278. – №. 11. – P. 8904-8912.
- 341.Suk K. Combined analysis of the glia secretome and the CSF proteome: neuroinflammation and novel biomarkers // *Expert review of proteomics*. – 2010. – V. 7. – № 2. – P. 263-274.

- 342.Sun X. Modeling hallmark pathology using motor neurons derived from the family and sporadic amyotrophic lateral sclerosis patient-specific iPS cells //Stem cell research & therapy. – 2018. – V. 9. – № 1. – P. 1-14.
- 343.Szydlowska K. Calcium, ischemia and excitotoxicity //Cell calcium. – 2010. – V. 47. – №. 2. – P. 122-129.
- 344.Takagi S. Induced Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy of the Retina //Medical Applications of iPS Cells. –2019. – P. 133-147.
- 345.Takahashi K. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors //Cell. – 2007. – V. 131. – № 5. – P. 861-872.
- 346.Takahashi K. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors //Cell. – 2006. – V. 126. – № 4. – P. 663-676.
- 347.Takasago T. Neuroprotective efficacy of ebselen, an anti-oxidant with anti-inflammatory actions, in a rodent model of permanent middle cerebral artery occlusion //British journal of pharmacology. – 1997. – V. 122. – №. 6. – P. 1251-1256.
- 348.Takata N. Activation of Wnt/ β -catenin signaling in ESC promotes rostral forebrain differentiation in vitro //In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal. – 2016. – V. 52. – № 3. – P. 374-382.
- 349.Tamura A. Focal cerebral ischaemia in the rat: Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion //Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 1981. – V. 1. – № 1. – P. 53-60.
- 350.Tanaka M. Tiam1 mediates neurite outgrowth induced by ephrin-B1 and EphA2 //The EMBO journal. – 2004. – V. 23. – №. 5. – P. 1075-1088.
- 351.Tanaka T. Cobalt promotes angiogenesis via hypoxia-inducible factor and protects tubulointerstitium in the remnant kidney model //Laboratory investigation. – 2005. – V. 85. – №. 10. – P. 1292-1307.
- 352.Thor S. Nervous System Development: Temporal Patterning of Large Neural Lineages //Current Biology. – 2017. – V. 27. – № 10. – P. 392-394.
- 353.Tikka T. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia //Journal of Neuroscience. – 2001. – V. 21. – № 8. – P. 2580-2588.
- 354.Tsai M.J. Recovery of neurological function of ischemic stroke by application of conditioned medium of bone marrow mesenchymal stem cells derived from normal and cerebral ischemia rats //Journal of biomedical science. – 2014. – V. 21. – №. 1. – P. 5.
- 355.Tsuboi K. Prosaposin prevents programmed cell death of rat cerebellar granule neurons in culture //Developmental brain research. – 1998. – V. 110. – № 2. – P. 249-255.
- 356.Tulsawani R. Neuroprotective effect of peroxiredoxin 6 against hypoxia-induced retinal ganglion cell damage //BMC neuroscience. – 2010. – V. 11. – № 1. – P. 125.
- 357.Uemura R. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling //Circulation research. – 2006. – V. 98. – № 11. – P. 1414-1421.
- 358.Unal-Cevik I. Apoptotic and necrotic death mechanisms are concomitantly activated in the same cell after cerebral ischemia //Stroke. – 2004. – V. 35. – № 9. – P. 2189-2194.
- 359.Vaudel M. SearchGUI: An open-source graphical user interface for simultaneous OMSSA and X! Tandem searches //Proteomics. – 2011. – V. 11. – № 5. – P. 996-999.
- 360.Verkhatsky A. Astrocytes as secretory cells of the central nervous system: idiosyncrasies of vesicular secretion //The EMBO journal. – 2016. – V. 35. – № 3. – P. 239-257.
- 361.Wada K. Effect of basic fibroblast growth factor treatment on brain progenitor cells after permanent focal ischemia in rats //Stroke. – 2003. – V. 34. – № 11. – P. 2722-2728.
- 362.Wada M. Alteration of midkine expression in the ischemic brain of humans //Journal of the neurological sciences. – 2002. – V. 200. – № 1-2. – P. 67-73.
- 363.Wagner S.L. Protease nexin-1, an antithrombin with neurite outgrowth activity, is reduced in Alzheimer disease //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1989. – V. 86. – №. 21. – P. 8284-8288.

364. Waje-Andreassen U. IL-6: an early marker for outcome in acute ischemic stroke // *Acta Neurologica Scandinavica*. – 2005. – V. 111. – № 6. – P. 360-365.
365. Wang K.X. Osteopontin: role in immune regulation and stress responses // *Cytokine & growth factor reviews*. – 2008. – V. 19. – № 5-6. – P. 333-345.
366. Wang Y. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death // *Apoptosis*. – 2010. – V. 15. – № 11. – P. 1382-1402.
367. Wappler E.A. Dynamics of dystroglycan complex proteins and laminin changes due to angiogenesis in rat cerebral hypoperfusion // *Microvascular research*. – 2011. – V. 81. – № 2. – P. 153-159.
368. Waragai M. Ataxin 10 induces neuritogenesis via interaction with G-protein $\beta 2$ subunit // *Journal of neuroscience research*. – 2006. – V. 83. – № 7. – P. 1170-1178.
369. Watanabe T. A human neural stem cell line provides neuroprotection and improves neurological performance by early intervention of neuroinflammatory system // *Brain research*. – 2016. – V. 1631. – P. 194-203.
370. Wei L. Necrosis, apoptosis and hybrid death in the cortex and thalamus after barrel cortex ischemia in rats // *Brain research*. – 2004. – V. 1022. – № 1-2. – P. 54-61.
371. Wesselschmidt R.L. The teratoma assay: an in vivo assessment of pluripotency // *Human Pluripotent Stem Cells*. – 2011. – P. 231-241.
372. Williams A.J. Delayed treatment of ischemia/reperfusion brain injury: extended therapeutic window with the proteasome inhibitor MLN519 // *Stroke*. – 2004. – V. 35. – № 5. – P. 1186-1191.
373. Willis C.M. The neural stem cell secretome and its role in brain repair // *Brain Research*. – 2019. – P. 146615.
374. Willmund F. The cotranslational function of ribosome-associated Hsp70 in eukaryotic protein homeostasis // *Cell*. – 2013. – V. 152. – № 1-2. – P. 196-209.
375. Woltjen K. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells // *Nature*. – 2009. – V. 458. – № 7239. – P. 766-770.
376. Woodruff T.M. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke // *Molecular neurodegeneration*. – 2011. – V. 6. – № 1. – P. 11.
377. Wright K.T. Bone marrow stromal cells stimulate neurite outgrowth over neural proteoglycans (CSPG), myelin associated glycoprotein and Nogo-A // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2007. – V. 354. – № 2. – P. 559-566.
378. Wright K.T. Spinal motor neurite outgrowth over glial scar inhibitors is enhanced by coculture with bone marrow stromal cells // *The Spine Journal*. – 2014. – V. 14. – № 8. – P. 1722-1733.
379. Xie Q. Exogenous tetranectin protects against 1-methyl-4-phenylpyridine-induced neurotoxicity by inhibiting apoptosis and autophagy through ribosomal protein S6 kinase beta-1 // *World neurosurgery*. – 2019. – V. 122. – P. 375-382.
380. Xin H. Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth // *Stem cells*. – 2012. – V. 30. – № 7. – P. 1556-1564.
381. Xing C. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke // *International Journal of Stroke*. – 2012. – V. 7. – № 5. – P. 378-385.
382. Xiong X.Y. Functions and mechanisms of microglia/macrophages in neuroinflammation and neurogenesis after stroke // *Progress in neurobiology*. – 2016. – V. 142. – P. 23-44.
383. Xu C. NMR structure and regulated expression in APL cell of human SH3BGRL3 // *FEBS letters*. – 2005. – V. 579. – № 13. – P. 2788-2794.
384. Yabe T. NF κ B activation is required for the neuroprotective effects of pigment epithelium-derived factor (PEDF) on cerebellar granule neurons // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – V. 276. – № 46. – P. 43313-43319.
385. Yamada S. Identification of twinfilin-2 as a factor involved in neurite outgrowth by RNAi-based screen // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2007. – V. 363. – № 4. – P. 926-930.

- 386.Yamazaki H. Adipose-derived stem cell-conditioned medium ameliorates antidepressant-related behaviors in the mouse model of Alzheimer's disease // *Neurosci. Lett.* – 2015. – V. 609. – P. 53–57.
- 387.Yan Y. Pluripotent stem cell expansion and neural differentiation in 3-D scaffolds of tunable Poisson's ratio // *Acta biomaterialia.* – 2017. – V. 49. – P. 192-203.
- 388.Yang C. Effect of sonic hedgehog on motor neuron positioning in the spinal cord during chicken embryonic development // *Journal of cellular and molecular medicine.* – 2019. – V. 23. – № 5. – P. 3549-3562.
- 389.Yang H.N. Neural stem cell-conditioned medium ameliorated cerebral ischemia-reperfusion injury in rats // *Stem cells international.* – 2018. – V. 2018.
- 390.Yang Q. Potential neuroprotective treatment of stroke: targeting excitotoxicity, oxidative stress, and inflammation // *Frontiers in neuroscience.* – 2019. – V. 13. – P. 1036.
- 391.Yang S.H. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10 // *Experimental & molecular medicine.* – 2009. – V. 41. – № 5. – P. 315-324.
- 392.Yao A. Programmed death 1 deficiency induces the polarization of macrophages/microglia to the M1 phenotype after spinal cord injury in mice // *Neurotherapeutics.* – 2014. – V. 11. – № 3. – P. 636-650.
- 393.Yepes M. Neuroserpin reduces cerebral infarct volume and protects neurons from ischemia-induced apoptosis // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology.* – 2000. – V. 96. – № 2. – P. 569-576.
- 394.Yilmaz G. Cell adhesion molecules and ischemic stroke // *Neurological research.* – 2008. – V. 30. – № 8. – P. 783-793.
- 395.Yoder M.C. Differentiation of pluripotent stem cells into endothelial cells // *Current opinion in hematology.* – 2015. – V. 22. – № 3. – P. 252.
- 396.Yoshimatsu S. Evaluating the efficacy of small molecules for neural differentiation of common marmoset ESCs and iPSCs // *Neuroscience research.* – 2019.
- 397.Yu J. Efficient feeder-free episomal reprogramming with small molecules // *PloS one.* – 2011. – V. 6. – № 3. – P. 17557.
- 398.Zhai S. Dopaminergic modulation of striatal function and Parkinson's disease // *Journal of Neural Transmission.* – 2019. – V. 126. – № 4. – P. 411-422.
- 399.Zhang D. Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells // *Cell research.* – 2009. – V. 19. – № 4. – P. 429-438.
- 400.Zhang G.L. Neural stem cell transplantation therapy for brain ischemic stroke: Review and perspectives // *World journal of stem cells.* – 2019. – V. 11. – № 10. – P. 817.
- 401.Zhang H. Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax // *Nature cell biology.* – 2005. – V. 7. – № 9. – P. 909-915.
- 402.Zhang R.L. A rat model of focal embolic cerebral ischemia // *Brain research.* – 1997. – V. 766. – № 1-2. – P. 83-92.
- 403.Zhang S.C. Defining glial cells during CNS development // *Nature Reviews Neuroscience.* – 2001. – V. 2. – № 11. – P. 840-843.
- 404.Zhao H. Bcl-2 overexpression protects against neuron loss within the ischemic margin following experimental stroke and inhibits cytochrome c translocation and caspase-3 activity // *Journal of neurochemistry.* – 2003. – V. 85. – № 4. – P. 1026-1036.
- 405.Zhao Q. Intranasal administration of human umbilical cord mesenchymal stem cells-conditioned medium enhances vascular remodeling after stroke // *Brain research.* – 2015. – V. 1624. – P. 489-496.
- 406.Zhou H. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins // *Cell stem cell.* – 2009. – V. 4. – № 5. – P. 381-384.
- 407.Zhou J. High-efficiency induction of neural conversion in human ESCs and human induced pluripotent stem cells with a single chemical inhibitor of transforming growth factor beta superfamily receptors // *Stem Cells.* – 2010. – V. 28. – № 10. – P. 1741-1750.
- 408.Zhou S. Apolipoprotein E protects astrocytes from hypoxia and glutamate-induced apoptosis

- //FEBS letters. – 2013. – V. 587. – № 2. – P. 254-258.
- 409.Zhou W. Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells //Stem cells. – 2009. – V. 27. – № 11. – P. 2667-2674.
- 410.Zhu W. Disequilibrium of M1 and M2 macrophages correlates with the development of experimental inflammatory bowel diseases //Immunological investigations. – 2014. – V. 43. – № 7. – P. 638-652.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Реагенты и материалы исследования.

Базовые среды и добавки

DMEM (ПанЭко, Россия)

DMEM/F12 (ПанЭко, Россия)

Neurobasal Medium (Gibco, США)

Opti-MEM (Gibco, США)

Essential 8 Medium (Gibco, США)

Фетальная бычья сыворотка (FBS) (HyClone, США)

Заменитель сыворотки (KnockOut Serum Replacement) (Invitrogen, США)

L-глутамин (ПанЭко, РФ)

Смесь незаменимых аминокислот (NEAA) (Hyclone, США)

Пенициллин-стрептомицин (ПанЭко, Россия)

N2 добавка (Gibco, США)

B27 добавка (Gibco, США)

Рекомбинантные белки и низкомолекулярные соединения

FGF2 (Prospec, Израиль)

EGF (ProSpec, Израиль)

BDNF (PeproTech, США)

CNTF (PeproTech, США)

Пурморфамин (Stemcell Technologies, США)

SB431542 (Stemcell Technologies, США)

Дорсоморфин (Stemcell Technologies, США)

LDN193189 (Sigma-Aldrich, США)

ROCK ингибитор (Y27632) (Stemgent, США)

Дихлорид кобальта CoCl_2 (Sigma-Aldrich, США)

Глутамат натрия (Sigma-Aldrich, США)

NaCl (Sigma-Aldrich, США)

KCl (Sigma-Aldrich, США)

CaCl_2 (Sigma-Aldrich, США)

Глицин (Sigma-Aldrich, США)

HEPES (Sigma-Aldrich, США)

Глюкоза (Sigma-Aldrich, США)

MgCl_2 (Sigma-Aldrich, США)

Натрия додецилсульфат (AppliChem, Германия)

Полиакриламид (Serva, США)

Другие реактивы для работы с культурами клеток

Раствор Версена (ПанЭко, Россия)

Раствор Хэнкса (ПанЭко, РФ)

Раствор DPBS без Ca^{2+} и Mg^{2+} (ПанЭко, РФ)

Цефазолин (ПанЭко, РФ)

Колцемид (Sigma-Aldrich, США)

Матригель (BD Biosciences, США)

Коллаген I типа (Gibco, США)

Витронектин (Gibco, США)

Поли-DL-лизин (ПанЭко, РФ)

Растворы трипсина 0.05% и 0,25% (ПанЭко, РФ)

TrypLE Select (Gibco, США)

Диметилсульфоксид (ПанЭко, Россия)

β -меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich, США)

Желатин (Sigma-Aldrich, США)

Ретиноевая кислота (Gibco, США)

Calcein-AM (Biotium, США);

Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, США)

Йодид пропидия (Sigma-Aldrich, США)

МТТ (3-[4,5диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенил-тетразолийбромид) (ПанЭко, РФ)

Арабинозинмоноцитозида (Sigma-Aldrich, США)

Маркер молекулярных масс 14,4 - 116 кДа (Thermo Fisher Scientific, США)

Реактивы для молекулярной биологии

Фосфатно-солевой буфер (PBS) (ПанЭко, Россия)

Параформальдегид (Merck KGaA, Германия)

Тритон X-100 (Sigma-Aldrich, США)

DAPI (4',6-диамино-2-фенилииндол дигидрохлорид) (Sigma-Aldrich, США)

RNeasy Mini Kit (Qiagen, США)

RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, США)

qPCRMix-HS SYBR (Evrogen, РФ)

RNAlater (Invitrogen, США)

Раствор Гимза (ПанЭко, Россия)

ELISA kit for hBDNF (R&D systems, США)

ELISA kit for hGDNF (R&D systems, США)

ELISA kit for hNGF (R&D systems, США)

ELISA kit for hCNTF (R&D systems, США)

Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit (Sigma-Aldrich, США)

Anti-beta III Tubulin antibody (ab18207) (Abcam, США)

Anti-MAP2 antibody (ab183830) (Abcam, США)

Anti-S100 beta antibody (ab52642) (Abcam, США)

Anti-GFAP antibody (ab33922) (Abcam, США)

Anti-CD68 antibody (ab125212) (Abcam, США)

Anti- Sendai viral antibody (MBJ, Япония)

Anti-pan Cytokeratin antibody (ab7753) (Abcam, США)

Anti-Desmin antibody (ab32362) (Abcam, США)

Anti-alpha 1 Fetoprotein antibody (ab3980) (Abcam, США)

Anti-CD206 (ab64693) (Abcam, США)

Anti-Nestin antibody (ab105389) (Abcam, США)

StemLight™ Pluripotency Antibody Kit (Cell Signaling Technology, США)

Вторичные антитела Alexa Fluor 488 anti-rabbit (Invitrogen, США)

Вторичные антитела Alexa Fluor 555 anti-mouse (Invitrogen, США)

CTS CytoTune-iPS 2.1 Sendai Reprogramming Kit (Invitrogen, США)

Реактивы для гистологии

Tissue-Tek OCT Compound (Sakura, США)

Гематоксилин (Unisource, Индия)

Эозин (Dudley chemical, США)

Ксилол (Applichem, Германия)

Aqua-Poly/Mount (Polyscience, США)

Расходные материалы

Чашки Петри диаметром 35мм, 60мм и 100мм, многолуночные плашки (Corning, США)

Чашки Петри с низкой адгезией (Corning, США)

Центрифужные пробирки, одноразовые пипетки, криопробирки (Costar, США)

Встаки Transwell для 24-луночных планшетов (Corning, США)

Предметные и покровные стекла (Menzel, Германия)

Изофлураном (Minrad, США)

Мембраны Amicon Ultra 3 кДа (Sigma-Aldrich, США)